

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е.А. ВАГНЕРА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

Данченко Ирина Юрьевна

**ОЦЕНКА ФУНКЦИИ СЕМАФОРИНА SEMA4D/CD100 И ЕГО  
РЕЦЕПТОРА CD72 ПРИ РЕМИТТИРУЮЩЕМ РАССЕЯННОМ  
СКЛЕРОЗЕ**

14.01.11 – нервные болезни

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Татьяна Витальевна Байдина

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Елена Михайловна Куклина

Пермь – 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИХ СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА КАК АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СЕМАФОРИНА SEMA4D/CD100 В ЕГО ПАТОГЕНЕЗЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	16
1. Рассеянный склероз: современный взгляд на аутоиммунное заболевание нервной системы, актуальность изучения проблемы.....	16
1.1. Ключевые аспекты патогенеза рассеянного склероза.....	17
1.1.1. Взаимодействие нервной и иммунной системы при рассеянном склерозе.....	17
1.1.2. Роль Т- и В-клеток в патогенезе рассеянного склероза.....	18
1.1.3. Роль цитокинов при рассеянном склерозе.....	21
1.1.4. Представление о демиелинизации при рассеянном склерозе.....	22
1.1.5. Основополагающие механизмы ремиелинизации при рассеянном склерозе.....	23
1.2. Клинические аспекты ремиттирующего рассеянного склероза как основного типа течения заболевания.....	24
1.3. Диагностические критерии рассеянного склероза. Значение иммунологических исследований при рассеянном склерозе.....	25
2. Семафорины – ключ к пониманию иммунных ответов в нервной системе.....	28
2.1. Общая характеристика семейства семафоринов, их роль при патологических процессах.....	28
2.2. Участие семафоринов в функционировании нервной системы.....	29
2.3. Представление об иммунных семафоринах.....	30
2.4. Возможное участие семафоринов в патогенезе рассеянного склероза....	31
2.5. Представитель семафоринов - Sema4D/ CD100.....	31

2.6. Рецепторы Sema4D/CD100: plexin-B1, plexin-B2 и CD72.....	34
2.7. Роль Sema4D/CD100 в В-клеточных ответах.....	37
2.8. Роль Sema4D/CD100 в Т-клеточных ответах.....	37
2.9. Растворимая форма Sema4D/CD100 (sSema4D), ее биологические функции.....	38
2.10. Данные, полученные на животной модели рассеянного склероза (в условиях экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита), при изучении Sema4D/CD100.....	39
3. Актуальность проблемы поиска терапевтических стратегий при рассеянном склерозе и перспектива использования семафоринов в данном процессе.....	40
ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБЛЮДЕНИЙ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1. Дизайн исследования, объем наблюдений.....	43
2.2. Клиническая характеристика, субпопуляционный состав мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с рассеянным склерозом.....	45
2.3. Основные методы исследования.....	49
2.3.1. Психометрическое тестирование.....	49
2.3.2. Тестирование когнитивных функций.....	49
2.3.3. Интерпретация данных магнитно-резонансной томографии головного мозга.....	50
2.3.4. Лабораторные методы исследования.....	50
2.3.4.1. Показатели, оцененные <i>ex vivo</i> .....	53
2.3.4.2. Показатели, оцененные после культивирования клеток.....	53
2.3.4.3. Подготовка проб для цитометрического исследования.....	54
2.3.4.4. Алгоритм цитометрического исследования экспрессии Sema4D/CD100 субпопуляциями CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> и CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов.....	55

2.3.4.5. Алгоритм цитометрического анализа экспрессии Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами (CD3 <sup>+</sup> клетками) и экспрессии CD72 В-лимфоцитами (CD19 <sup>+</sup> клетками).....	59
2.3.4.6. Алгоритм цитометрического исследования экспрессии внутриклеточных цитокинов В-лимфоцитами (CD19 <sup>+</sup> клетками).....	63
2.3.4.7. Оценка уровня растворимого семафорина.....	65
2.3.5. Статистические методы, применяемые в исследовании.....	66
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РЕМИТТИРУЮЩИМ ТИПОМ ТЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА, НЕ ПОЛУЧАВШИХ ТЕРАПИЮ ПРЕПАРАТАМИ, ИЗМЕНЯЮЩИМИ ТЕЧЕНИЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА.....	68
3.1. Характеристика группы пациентов с рассеянным склерозом по клиническим показателям.....	68
3.2. Особенности нейровизуализационных данных в обследованной группе.....	80
3.3. Показатели когнитивного тестирования и психометрических шкал у пациентов с рассеянным склерозом.....	82
3.4. Применение гормональной терапии при лечении пациентов с рассеянным склерозом.....	94
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА РОЛИ СЕМАФОРИНА SEMA4D/CD100 В КОНТРОЛЕ ФУНКЦИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ.....	95
4.1. Экспрессия семафорина Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами <i>ex vivo</i> у пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров.....	95
4.2. Экспрессия семафорина Sema4D/CD100 интактными и активированными Т-лимфоцитами (CD3 <sup>+</sup> клетками) у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза и здоровых доноров <i>in vitro</i> (в культуре).....	99
4.3. Уровень растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови и культуре Т-лимфоцитов (CD3 <sup>+</sup> клеток) у пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров .....	109

4.4. Экспрессия рецептора для Sema4D/CD100 – CD72 – В-лимфоцитами (CD19 <sup>+</sup> клетками) у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза в сравнении с контрольной группой.....	118
4.5. Синтез ключевых про- и противовоспалительных цитокинов В-лимфоцитами у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза в сравнении с контрольной группой .....	122
4.6. Клинические примеры.....	129
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ (ЗАКЛЮЧЕНИЕ)....	141
ВЫВОДЫ.....	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	152
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	153

## СПИСОК ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИХ СОКРАЩЕНИЙ

АПК – антиген-презентирующие клетки

ГКС – глюкокортикостероиды

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ЗД – здоровые доноры

ИМТ – иммуномодулирующая терапия

КПО – клетки-предшественники олигодендроцитов

МПК – моноклеарные клетки периферической крови

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПИТРС – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза

РС – рассеянный склероз

ФМА – форболмиристатацетат

ЦНС – центральная нервная система

ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

CD – The Cluster of Differentiation, молекулы дифференцировки лимфоидных клеток

EDSS – Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала инвалидизации Курцке

FAMS – Functional Assessment of Multiple Sclerosis, функциональная оценка рассеянного склероза

FS – функциональная система

IL – interleukin, интерлейкин

LT- $\alpha$  – lymphotoxin-alpha, лимфотоксин-альфа

MFI – Mean Fluorence Intensity, средняя интенсивность свечения

MFI-20 – Mutidimensional Fatigue Inventory, шкала субъективной оценки астении

MSIS-29 – Multiple Sclerosis Impact Scale, шкала влияния рассеянного склероза

PASAT-3 – Paced Auditory Serial Addition Test, слуховой тест на сложение в заданном темпе

PI – Progression index, скорость прогрессирования заболевания

Sema4D – semaphorin, семафорин IV класса, известный также как CD100

sSema4D – soluble Sema4D, растворимая форма семафорина Sema4D

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor- $\alpha$ , фактор некроза опухоли-альфа

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность исследования**

В настоящее время рассеянный склероз (РС) признан частой причиной инвалидизации лиц молодого трудоспособного возраста [18, 24, 31]. Непредсказуемость медицинского и социального прогноза пациентов, их клинического ответа на иммуномодулирующую терапию (ИМТ) и времени трансформации заболевания во вторично-прогредиентное течение делают изучение патогенеза РС особенно актуальным.

Диагностика РС строго регламентирована диагностическими критериями [68, 69], куда не входят аспекты иммунологии. При этом исследование показателей иммунного статуса пациентов целесообразно для выявления возможных механизмов воздействия на патологический процесс [12, 32], который при РС непрерывно продолжается после инициации заболевания. На протяжении болезни у пациентов с РС имеют место изменения в системе иммунорегуляции [3, 163, 173] и по мере развития иммунологии меняются взгляды на роль различных звеньев иммунитета в индукции и прогрессии РС, в частности, на роль регуляторных Т-клеток (Tregs) или Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин (interleukin (IL)-17, Th17) [151], а также на участие в этом процессе В-лимфоцитов. Одним из разделов клинической и экспериментальной иммунологии является нейроиммунология [22].

Понимание патофизиологии РС необходимо для определения новых направлений терапии данного заболевания. В настоящий момент продолжается исследование молекул, участвующих в патогенезе РС, на экспериментальных моделях с использованием клеток человека [51], так как не все ключевые моменты иммунопатологии РС удается воспроизвести в условиях экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) [131,

152], модели РС у животных. Подвергнуты всестороннему изучению маркеры благоприятного или неблагоприятного прогноза заболевания [93].

Следует признать, что эффективность современной ИМТ несовершенна. Попытки синтеза таргетных препаратов для воздействия на новые точки приложения в патогенезе РС сталкиваются с побочными эффектами подобного вмешательства. Часть неудач влияния терапии на скорость прогрессирования РС связаны с ее воздействием на Т-клеточно-опосредованные механизмы заболевания, в то время как роль В-клеток можно рассматривать как равную [50, 71, 73, 119, 152, 191], хотя и являющуюся дискутабельной.

Учитывая, что инициация патогенеза РС происходит, как правило, на периферии, а не в центральной нервной системе (ЦНС), воздействие именно на это звено может приостановить последующее развитие заболевания и улучшить качество жизни пациентов [23, 31].

В качестве одного из возможных звеньев иммунопатологии демиелинизирующего процесса при РС можно рассматривать белковые молекулы семафорины и их рецепторы [58, 59, 78, 131, 136, 137, 165, 180]. Впервые открытые в 1992 году в качестве многочисленной группы молекул, направляющих рост аксонов [102, 141], они стали ключом к пониманию иммунных ответов в условиях физиологии и патологии [109]. Полагают, что повышенная экспрессия ряда семафоринов способна замедлять регенеративные процессы в ЦНС и способствовать развитию неврологических заболеваний [35, 41, 166]. В частности, обсуждается влияние данных молекул на активацию микроглии, ингибирование миграции и дифференцировки клеток-предшественников олигодендроцитов (КПО) [92] и разрушение формирующего гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) эндотелиальных соединений [166].

Особого внимания при изучении РС заслуживает семафорин Sema4D (семафорин IV класса, известный также как CD100). В литературе имеется целый ряд данных, указывающих на участие Sema4D в развитии РС. Во-

первых, Sema4D/CD100-дефицитные мыши испытывают нарушение продукции антител и устойчивы к развитию ЭАЭ [159], а трансгенная экспрессия укороченной формы Sema4D/CD100, обеспечивающая ее спонтанное отщепление от мембраны, способствует развитию данной патологии (ЭАЭ) [189]. Во-вторых, повышенные уровни Sema4D/CD100 определяются на поверхности Т-лимфоцитов и в сыворотке крови мышей, склонных к спонтанному развитию различных аутоиммунных заболеваний, а также у человека, в частности, при HTLV1-ассоциированной миелопатии, сопровождающейся, как и РС, демиелинизацией [169]. В третьих, растворимая форма Sema4D/CD100 согласно экспериментальным данным вызывает *in vitro* апоптоз нейрональных предшественников и незрелых олигодендроцитов – клеток, играющих ключевую роль в миелинизации нервных волокон [169].

Еще одним аргументом в пользу исследования роли Sema4D в патогенезе РС является тот факт, что рецептор для данного семафорина в иммунной системе, CD72, представлен преимущественно на В-лимфоцитах, причем Sema4D-CD72-зависимый сигнал контролирует активацию В-клеток [98]. Между тем, согласно современным представлениям, В-лимфоциты непосредственно участвуют в развитии аутоиммунного воспаления при РС, и истощение популяции этих клеток является одной из перспективных стратегий лечения данного заболевания [5, 50].

Изложенные выше факты указывают на высокую актуальность изучения диагностической и потенциальной терапевтической значимости семафорина Sema4D при РС. Несмотря на это, до сих пор подобных исследований не проводилось.

**Цель настоящей работы** – изучить значение экспрессии семафорина IV класса Sema4D (CD100) и рецептора для Sema4D, CD72, в иммунной системе для механизмов повреждения при рассеянном склерозе, а также роль Sema4D-CD72-зависимого сигнала в контроле функций иммунных клеток при данной патологии.

**Задачи исследования:**

1. Дать всестороннюю характеристику группы пациентов с ремиттирующим течением рассеянного склероза, не получавших иммуномодулирующей терапии, с балльной оценкой клинических и нейропсихологических особенностей для дальнейшего сопоставления с ними результатов лабораторных исследований иммунологических показателей.
2. Оценить экспрессию мембран-связанной формы семафорина Sema4D/CD100 различными субпопуляциями Т-лимфоцитов у пациентов с рассеянным склерозом *ex vivo* и в культуре (*in vitro*), в условиях поликлональной активации клеток.
3. Определить уровень растворимой формы семафорина Sema 4D/CD100 (sSema4D) в плазме крови пациентов с рассеянным склерозом и в культуре Т-лимфоцитов.
4. Определить экспрессию рецептора для семафорина Sema4D/CD100, CD72, В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup> клетками) пациентов с рассеянным склерозом.
5. Оценить роль Sema4D-CD72-зависимого сигнала в регуляции функций В-лимфоцитов при рассеянном склерозе, в частности, синтеза ключевых про- и противовоспалительных цитокинов В-лимфоцитами.
6. Провести клинико-иммунологическое сопоставление полученных данных.

**Связь с планом НИР**

Работа проведена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор – заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор И.П. Корюкина), номер государственной регистрации темы 1150.30310058.

**Научная новизна исследования**

Методом клинико-иммунологического сопоставления доказано участие новых иммунных механизмов в каскаде повреждающих реакций при РС. Впервые показано, что ремиттирующий РС ассоциирован с повышенной

экспрессией семафорина Sema4D/CD100 в иммунной системе. Впервые установлено повышение уровня экспрессии мембранного Sema4D/CD100 интактными Т-лимфоцитами *ex vivo* у пациентов с РС, а также показано ее изменение в ответ на поликлональную активацию Т-лимфоцитов: повышение на начальных стадиях культивирования и снижение при длительном культивировании. Впервые обнаружено повышение экспрессии растворимой формы семафорина в плазме крови пациентов с РС, а также в супернатантах Т-клеточных культур. Новыми являются данные по экспрессии рецептора для Sema4D/CD100, CD72, В-лимфоцитами пациентов с РС и участию Sema4D-CD72-зависимого сигнала в регуляции функции этих клеток, в частности, продукции В-лимфоцитами основных про- и противовоспалительных цитокинов. Обнаружено, что повышение уровня экспрессии семафорина Sema4D/CD100 характерно для пациентов с РС и не зависит от стадии заболевания, его продолжительности и уровня инвалидизации, а также особенностей нейропсихологического профиля пациентов. Доказано, что выявленные закономерности участвуют в повреждающих процессах при рассеянном склерозе, так как коррелируют с клиническими характеристиками заболевания: с компонентами EDSS и показателями, отражающими воспалительный компонент заболевания (меньшей длительностью заболевания и активностью демиелинизирующего процесса по данным нейровизуализации).

### **Практическая значимость работы**

Проведенное комплексное исследование вовлеченности семафорина Sema4D/CD100 в патогенез РС позволяет подтвердить целесообразность использования данного маркера в качестве возможной мишени при терапии данного заболевания, что требует дальнейших масштабных исследований с применением соответствующих моноклональных антител. Результаты исследования показывают гиперактивацию В-лимфоцитарного звена иммунитета у наивных пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом и роль рецептора семафорина Sema4D/CD100 – CD72 – в контроле В-

клеточной активности у пациентов с РС. Выявление повышенных показателей растворимой формы семафорина Sema4D/CD100 может являться отражением демиелинизирующего процесса, учитывая данные литературы о патологическом действии растворимого семафорина на выживаемость олигодендроцитов *in vitro*.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты исследования внедрены в практическую работу ГБУЗ Пермского края «Пермская краевая клиническая больница». Теоретические положения используются в программах обучения на кафедре неврологии имени В.П. Первушина ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Личный вклад диссертанта в исследование.** Этапы исследования, включая формирование групп пациентов, клиническое и нейропсихологическое обследование лиц с подтвержденным диагнозом «Рассеянный склероз» выполнены лично автором. Диссертантом сформирована база данных и выполнена статистическая обработка результатов исследования. Иммунологические исследования выполнены совместно с к.м.н., научным сотрудником И.В. Некрасовой в Лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь). Автор освоены принципы проведенных лабораторных исследований и работы с данными, полученными при цитометрическом исследовании. Автор благодарит заведующего Лабораторией иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, д.м.н., профессора, заслуженного деятеля науки РФ С.В. Ширшева и заведующего Лабораторией экологической иммунологии ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, к.м.н., доцента кафедры иммунологии ПГМУ Б.А. Бахметьева за сотрудничество.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Клинические и нейровизуализационные особенности наивных пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом ассоциированы с повышенной экспрессией семафорина Sema4D/CD100 (мембранной и растворимой формы) в иммунной системе.
2. У пациентов с рассеянным склерозом в ремиссию Т-лимфоциты в культуре демонстрируют повышенный уровень экспрессии Sema4D/CD100 на мембране, но в то же время более интенсивное отщепление от мембраны в ответ на активацию клетки, что может отражать процессы, имеющие место на периферии и в центральной нервной системе.
3. При рассеянном склерозе снижена экспрессия рецептора для Sema4D/CD100, CD72, на В-лимфоцитах периферической крови, а связывание его с семафоринем регулирует функции В-клеток, изменяя профиль синтезируемых цитокинов в направлении провоспалительных факторов, что может быть одним из механизмов гиперактивации В-клеточного звена и развития нейровоспаления, характерных для данной патологии.

**Апробация диссертации.** Основные положения диссертации отражены в докладах на VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции "Рассеянный склероз и другие аутоиммунные заболевания нервной системы" (08.02.2013-10.02.2013г., г. Новосибирск), XIX Всероссийской конференции "Нейроиммунология. Рассеянный склероз" (23.05.2013-26.05.2013, г. Санкт-Петербург), городской научной конференции "Аутоиммунитет в норме и патологии" (12.09.2013г., г. Пермь). Материалы диссертации изложены на Научной сессии Пермской государственной медицинской академии имени академика Е.А. Вагнера, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Я.С. Циммермана (2013г.), Объединенном Иммунологическом Форуме (30.06.2013 – 05.07.2013, Нижний Новгород), 15 International Congress of Immunology (Milan, Italy, Aug. 22-27, 2013), Российском научном форуме на Урале с международным участием

«Актуальные вопросы фундаментальной медицины» (XI Уральский съезд иммунологов, V Уральский съезд физиологов, Международная конференция по первичным иммунодефицитам, 23.10.2014 – 25.10.2014, г. Екатеринбург).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 7 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Работа поддержана Федеральной целевой программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 12-П-4-1019) и грантом РФФИ (проект № 14-04-96007).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация представляет рукопись на русском языке объемом 175 страниц машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», 2 глав собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы содержит 206 источников, в том числе 32 отечественных и 174 иностранных. Диссертация иллюстрирована 31 таблицей, 24 рисунками, 4 клиническими примерами.

# ГЛАВА 1. ОСОБЕННОСТИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА КАК АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СЕМАФОРИНА SEMA4D/CD100 В ЕГО ПАТОГЕНЕЗЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## **1. Рассеянный склероз: современный взгляд на аутоиммунное заболевание нервной системы, актуальность изучения проблемы**

Рассеянный склероз – это хроническое аутоиммунное заболевание нервной системы (из группы демиелинизирующих) с неуточненной этиологией, характеризующееся атакой белого вещества ЦНС компонентами иммунной системы [15, 19, 20, 25, 31, 32], нарушением проницаемости ГЭБ, разрушением миелина и дальнейшей нейрональной дегенерацией [40, 166]. Преимущественное поражение белого вещества при РС ведет к хронической инвалидизации пациентов юного возраста [18, 31, 62, 93]. РС является достаточно распространенным заболеванием ЦНС. Число пациентов с РС увеличивается ежегодно, что связано в том числе с улучшением качества и скорости диагностики данного заболевания. В России РС также является одной из ведущих неврологических причин инвалидизации среди лиц молодого и трудоспособного возраста. Количество пациентов с данной патологией в нашей стране составляет около 150.000, показатели заболеваемости РС в России варьируют по разным данным от 30 до 100 случаев на 100.000 населения [4], в Пермском крае – 35,1 на 100.000 населения на 01.01.2011г., что соответствует среднему риску развития РС [6]. РС значительно нарушает качество жизни пациентов. По данным ряда авторов у 80% больных с ремиттирующе-рецидивирующим РС со временем происходит трансформация во вторично-прогредиентный тип течения заболевания с формированием стойкого неврологического дефицита [148].

Согласно современной концепции РС представляет из себя мультифакториальное заболевание [15, 25], в развитии которого, вероятно,

играют роль как вирусная инфекция [15], так и наследственная предрасположенность ввиду определенного иммунного ответа [19]. По данным международных исследований наличие особенностей молекул HLA II класса связано, но не абсолютно, с предрасположенностью к данному заболеванию [15, 25, 33, 87, 93, 160]. Допустимо утверждать, что РС может возникнуть у генетически предрасположенного человека при воздействии какого-либо фактора, стимулирующего миелин-специфичные Т-клетки [43, 125]. Высказывается также гипотеза о высоком риске развития РС у людей, недополучивших инсоляцию во внутриутробном периоде развития [175].

Активность болезни сохраняется у большинства пациентов на протяжении всей жизни, нарушая ее качество, и при этом нарастает проявление изменений в системе иммунорегуляции [3].

## **1.1. Ключевые аспекты патогенеза рассеянного склероза**

### **1.1.1. Взаимодействие нервной и иммунной системы при рассеянном склерозе**

В норме информация от иммунной системы поступает к нервной через гуморальные и нервные пути, одновременно клетки иммунной системы восприимчивы к нейротрансмиттерам [17]. Сигналы, поступающие от иммунной системы, модулируют функции ЦНС. Нервная и иммунная система схожи по своим функциям [95, 137]: в обеих присутствует развитая сеть синаптических связей и уникальная система поддержания гомеостаза [22, 132, 137], для контакта этих систем используются медиаторы и цитокины. При таком заболевании, как РС, в организме человека нарушено взаимодействие между нервной и иммунной системой [25]. Ключевыми событиями в иммунологическом аспекте патогенеза РС можно считать срыв ауто толерантности к антигенам миелина [13, 32] и нарушение супрессорных механизмов, контролирующих толерантность Т- и В-лимфоцитов к аутоантигенам [19].

### 1.1.2. Роль Т- и В-клеток в патогенезе рассеянного склероза

Интересен тот факт, что аутореактивные Т- и В-клетки присутствуют и в здоровом организме человека [15, 95]. У пациентов с РС патогенез заболевания представляется крайне сложным и варьирует у индивидуумов [48, 67]. Большинство исследователей выделено 5 основных этапов патогенеза РС [13, 25, 29, 45]:

- 1) начальное Т-клеточное примирование, активация (сенсibilизация) аутореактивных иммунных клеток на периферии, например, в лимфатических узлах, при взаимодействии рецептора Т-клетки и аутоантигена, связанного с молекулами гистосовместимости II класса (МНС II) на антиген-презентирующих клетках (АПК), при этом ведущую роль в активации аутореактивных клеток играют специфические механизмы молекулярной мимикрии, двойственной экспрессии Т-клеточных рецепторов и стимуляции Т-лимфоцитов суперантигеном, а также неспецифические – в виде локально высокой концентрации цитокинов;
- 2) миграция аутореактивных клеток (провоспалительных Т-лимфоцитов, моноцитов) через ГЭБ и их последующее проникновение в ЦНС, чему способствуют синтезируемые ими матричные металлопротеиназы [15];
- 3) реактивация Th1-клеток аутоантигенами в ЦНС и дальнейшее формирование рецидивирующего или персистирующего иммунного локального воспаления с активацией АПК и вовлечением микроглии, высвобождение цитокинов, оксида азота, глутамата и других веществ; проникнув в ЦНС, активированные аутореактивные Т-лимфоциты распознают предполагаемые аутоантигены, презентруемые АПК, в составе тримолеклярного комплекса, при этом основную роль играет презентация антигена в составе МНС II класса; тримолеклярный комплекс может связывать предполагаемые аутоантигены (основной белок миелина, миелин-ассоциированный гликопротеид, протеолипидный белок, белок S-100), что приводит к запуску антиген-специфического ответа; Th-1 и Th-2 иммунный

ответ определяется цитокиновым окружением и костимулирующими молекулами при первичной и вторичной презентации антигена [15];

4) инвазия паренхимы ЦНС с последующей деструкцией миелина, демиелинизацией, гибелью олигодендроцитов и аксонов, поражением нейронов вследствие воздействия цитотоксических клеток, цитокинов, аутоантител;

5) полная/частичная ремиелинизация в очагах воспаления (при благоприятном завершении процесса) либо гибель в них нейронов и олигодендроцитов с формированием астроцитарных рубцов.

В патогенезе РС участвуют преимущественно  $CD4^+$  клетки (CD – молекула дифференцировки лимфоидных клеток) [32, 78, 99],  $CD8^+$  Т-лимфоциты киллеры [32], в том числе за счет механизма кросс-реактивности [15], а также макрофаги, клетки микроглии [106, 206] и представители гуморального иммунитета – В-лимфоциты (миелин-реактивные В-клетки) [191]. Т-лимфоциты хелперы и дендритные клетки имеют огромное значение в инициации и поддержании РС, способствуя формированию провоспалительного микроокружения [172].

После распознавания антигена происходит дифференцировка Т-лимфоцитов в Т-хелперы 1-ого типа, продуцирующие провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  и другие), и Т-хелперы 2-ого типа, продуцирующие противовоспалительные цитокины (интерлейкин IL-10 и другие). Также возможна дифференцировка клеток в Th17 (продуцирующие IL-17) и Treg-клетки (регуляторные лимфоциты). На сегодняшний день доказано, что как Th17 лимфоциты [25, 103, 166], так и Th1 клетки [174] вносят вклад в развитие РС. Большое внимание уделяется вовлечению в патогенез РС  $CD4^+CD25^+$  регуляторных Т-клеток (Treg) [15], соотношение которых с Th17 играет значимую роль при РС.

Роль В-клеточных механизмов в развитии аутоиммунных заболеваний в настоящее время рассматривается наряду с Т-клеточными [71]. Так, продемонстрировано, что инактивация В-лимфоцитов во время

экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) препятствует его развитию у мышей [82, 153], в то время как удаление CD20 клеток до индукции ЭАЭ вызывает резкое усиление его проявлений [153]. В-клетки в процессе развития дифференцируются в плазматические, продуцирующие антитела [15, 32, 119]. Они также проникают через ГЭБ, на что указывает наличие В-клеток в очагах демиелинизации и олигоклонального  $\gamma$ -глобулина в спинно-мозговой жидкости [50]. Нарушение В-клеточной толерантности при РС выражается в нарастании титра аутоантител к миелину [15, 19, 119].

Обсуждаются и альтернативные антителонезависимые В-клеточные механизмы в развитии РС. Несомненна антигенпрезентирующая роль В-клеток, подразумевающая их участие в активации аутореактивных Т-клеток [32, 50, 119]. Имеются данные о вовлечении В-лимфоцитов в процессы неолимфогенеза, что подтверждается обнаружением лимфоидных фолликулов в мягкой оболочке мозга пациентов с РС по данным аутопсии [66]. По-прежнему актуальна гипотеза о выполнении В-клетками роли резервуара для вируса Эпштейн-Барр [75], рассматриваемого в качестве одного из возможных инициаторов РС [80]. В-лимфоциты способны продуцировать провоспалительные цитокины [119], в частности, TNF- $\alpha$  [5, 73].

Множество стратегий терапии РС направлено на подавление В-клеточных механизмов [94, 191], поскольку В-лимфоциты могут выступать в качестве регулятора активности болезни [50]. Для терапии труднокурабельных пациентов с РС исследуется химерное моноклональное антитело против В-клеточного антигена CD20 ритуксимаб [2, 50, 121], продолжается III фаза клинических исследований препарата окрелизумаб («гуманизированная версия ритуксимаба») [50]. При этом CD20 отсутствует на плазматических клетках, происходящих из В-лимфоцитов и продуцирующих антитела [50]. А значит, высокая терапевтическая эффективность подобной терапии связана с другими механизмами воздействия на В-клетки, в частности, с воздействием на продукцию

внутриклеточных цитокинов и их антиген-презентирующую функцию в отношении Т-клеток.

В целом, роль В-лимфоцитов в патогенезе РС дискуссионна. Имеются данные о том, что В-лимфоциты могут стимулировать и репаративные процессы в ЦНС, подавляя иммунные ответы [50]. Например, введенные до индукции ЭАЭ В10-клетки подавляют развитие его агрессивного варианта у лишенных В-клеток мышей, используя для этого IL-10 – цитокин с иммуносупрессивной функцией [31, 152].

### **1.1.3. Роль цитокинов при рассеянном склерозе**

Цитокины являются важными медиаторами в иммунных ответах, в том числе и при РС. Со стороны иммунных механизмов цитокины модулируют АПК для презентации антигена CD4<sup>+</sup> Т-клеткам за счет регуляции молекул МНС II класса [32]. CD4<sup>+</sup> Т-клетки используют цитокины во время Т-клеточного примирования, что способствует адекватной дифференцировке наивных Т-клеток в типы Th1 и Th2 [32, 130]. Цитокины участвуют в транспортировке Т-клеток в ЦНС [130], нарушая проницаемость ГЭБ. Они вовлечены в нарушение дифференцировки КПО и активацию микроглии [130]. Определение содержания внутриклеточных цитокинов используется для уточнения иммунологического статуса пациентов [32].

В исследованиях установлено, что продукция Th1 провоспалительных цитокинов CD4<sup>+</sup> Т-клетками повышена при обострении РС (TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ ), в то время как в период ремиссии преобладают Th2 цитокины (IL-4, IL-10, IL-13) [130].

Цитокины, продуцируемые В-лимфоцитами, формируют локальную среду иммунных клеток [121]. В очагах демиелинизации обнаружено множество факторов, способствующих дифференциации В-клеток, включая цитокины TNF- $\alpha$  и IL-10 [44]. По данным экспериментов мыши, у которых В-лимфоциты были неспособны произвести IL-10, не могли «восстановиться» после ЭАЭ [119]. Это предполагает роль IL-10 в восстановлении после атаки аутоиммунного заболевания [119]. У пациентов с РС описаны некоторые

особенности в регуляции продукции цитокинов В-клетками, в частности, снижение способности продуцировать IL-10 [73, 150], и напротив, повышенная способность продуцировать провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$  и лимфотоксин (lymphotoxin-alpha, (LT- $\alpha$ ) [36].

#### **1.1.4. Представление о демиелинизации при рассеянном склерозе**

Процесс демиелинизации характерен для наиболее тяжелых неврологических заболеваний [111]. Согласно современной концепции патогенеза РС уже на ранних стадиях, даже на стадии первичной клинической атаки, развиваются одновременно как демиелинизация, так и нейродегенерация. При этом тип и масштабы демиелинизации крайне переменчивы у отдельных пациентов [85].

Демиелинизация является основной причиной аксонального повреждения, вызывая снижение трофики, эксайтотоксичность и митохондриальную дисфункцию [134]. Персистирующая демиелинизация ведет к потере аксонов независимо от выраженности воспаления [38]. Продолжается уточнение причин потери аксонов при РС [131].

Причина инициализации формирования очагов демиелинизации в ЦНС при РС до конца не выяснена. Начальным событием в формировании очагов демиелинизации при РС считается потеря олигодендроцитов. На границе очагов демиелинизации отмечено наличие большого числа зрелых олигодендроцитов, что предполагает нарушение в очагах процесса миграции КПО [70, 161]. Как известно, в миграции клеток олигодендроглиального происхождения принимают участие хемокины, внеклеточные матриксные молекулы, а также направляющие молекулы (нетрины и некоторые семафорины).

Следует отметить, что процессы демиелинизации и ремиелинизации при РС протекают одновременно [25] и патологический процесс продолжает развиваться и при затухании клинических проявлений обострения [31]. Степень каждого из процессов определяет резидуальный неврологический дефицит и время трансформации заболевания во вторично-прогредиентное

течение. Доказано, что воспалительный компонент заболеваний, присутствующий на ранних стадиях РС, способствуют не только демиелинизации, но и стабилизации процесса, ремиссии заболевания [19], то есть само по себе воспаление в ЦНС отчасти стимулирует ремиелинизацию [161].

#### **1.1.5. Основопологающие механизмы ремиелинизации при рассеянном склерозе**

Ремиелинизация преимущественно выражена на начальных этапах формирования очагов демиелинизации [14, 157]. Продолжительность процесса ремиелинизации различается у каждого индивидуума с РС, и на нее может влиять как размер, так и расположение очагов [157]. Низкая способность к ремиелинизации ассоциирована по данным отдельных исследований с более старшим возрастом животных особей и мужским полом [187].

КПО составляют до 5-8% популяции глиальных клеток ЦНС [161]. Функция КПО заключается в поддержании гомеостаза глиальных клеток в неизменном белом веществе головного мозга [161]. КПО по праву являются основной действующей силой ремиелинизации [25, 84, 111, 161], представляя из себя источник формирования зрелых олигодендроцитов [34, 84]. Они участвуют в этом процессе наряду с астроцитами, клетками микроглии, макрофагами и моноцитами.

Предшествующими этапами для успешной ремиелинизации стоит считать достаточный объем пролиферации, миграции и дифференциации КПО [131] с последующим установлением контакта с аксоном и синтезом липидных компонентов миелина.

Предполагается, что усиление ремиелинизации ведет и к функциональному восстановлению пациентов с РС, то есть клинической ремиссии [161]. При РС ремиссия в основном зависит от миграции КПО к местам повреждения миелина и их последующей дифференцировке в зрелые клетки [34, 56, 84, 86, 142, 190]. Блокирование ремиелинизации возможно на

любом ее этапе – выживание олигодендроцитов, их пролиферация и миграция, зрелость или формирование миелиновой оболочки [130]. Ограничение числа олигодендроцитов вероятно является основной причиной неудач ремиелинизации [48, 70].

Одной из возможной причин несовершенства ремиелинизации при РС можно считать тот факт, что часть аксонов не подает сигнал олигодендроцитам для своей ремиелинизации [61]. При массивных повторных поражениях той же области ЦНС нарушение ремиелинизации можно объяснить истощением КПО, но возможно – еще и нарушением миграции КПО в очаг воспаления, например, при нарушении экспрессии в нем сигнальных молекул – семафоринов Sema3F и Sema3A [25, 48]. Таким образом, можно утверждать, что как подавление ремиелинизации, так и отсутствие ее стимулирования, либо оба этих фактора способные привести к отсутствию успешной ремиелинизации [131].

Ремиелинизация, безусловно, имеет место при РС, однако ее особенностью при РС считается ее несовершенство. Лишь 10-20% хронических очагов полностью ремиелинизируются [155, 156]. Обширность ремиелинизации ограничена периферией очагов демиелинизации [118,158]. При РС зоны ремиелинизации располагаются в так называемых теневых бляшках [161]. Вновь сформированный благодаря процессу ремиелинизации миелин способен в дальнейшем предотвратить потерю аксонов при их повреждении [58]. Однако морфологически на ремиелинизированных аксонах выявлена меньшая толщина миелиновой оболочки, меньшая скорость проведения [25].

## **1.2. Клинические аспекты ремиттирующего рассеянного склероза как основного типа течения заболевания**

Воспалительно-демиелинизирующий компонент заболевания преобладает в большей степени на ранних стадиях РС. Клиническим признаком активации воспалительного процесса при РС служит обострение (рецидив, эксацербация) заболевания [30], проявляющееся появлением новых

или рецидивом уже имеющихся неврологических симптомов, подтвержденное при неврологическом осмотре, длительностью не менее 24 часов. Ремиттирующий РС – наиболее частый тип течения данного заболевания, до 75-85% на начальных этапах РС, при котором происходит чередование обострений (клинических проявлений заболевания) и ремиссий (практически полного регресса неврологического дефицита) [14, 31, 48]. Ввиду возникновения бляшек РС и демиелинизации в различных участках белого вещества головного и спинного мозга клиническая картина РС характеризуется возникновением разнообразных сочетаний пирамидных, координаторных, зрительных, стволовых, тазовых, когнитивных нарушений [19, 20, 21, 31].

К настоящему времени благодаря ретроспективным наблюдениям установлены предикторы благоприятного течения РС, такие как женский пол, дебют ранее 40 лет, начало с ремиттирующе-рецидивирующего типа течения, ретробульбарный неврит в дебюте, полное восстановление после первого неврологического эпизода, меньшее количество очаговых изменений на магнитно-резонансной томографии (МРТ) и отсутствие атрофических изменений, малое число обострений в течение первого года болезни, а также отсутствие ранних когнитивных расстройств [31, 148].

### **1.3. Диагностические критерии рассеянного склероза. Значение иммунологических исследований при рассеянном склерозе.**

Диагностика РС основывается на критериях McDonald (существуют варианты 2005 и 2010 года), включающих в себя данные неврологического осмотра и МРТ. К дополнительным обследованиям при РС можно отнести исследование ликвора на олигоклональные иммуноглобулины и исследование вызванных потенциалов.

Клиническое течение, характер симптомов, картина МРТ и лабораторные показатели гетерогенны у пациентов с РС, что, возможно, связано с наличием генетических предпосылок к иммунным отклонениям, повышенной чувствительностью ЦНС к воспалительному процессу или

малой способностью к репарации повреждений [25]. К сожалению, в дебюте РС невозможно предсказать его дальнейшее течение [31].

Следует отметить, что практически полная недоступность биопсийного материала у пациентов с начальными стадиями ремиттирующего РС ограничивает полное понимание механизмов развития данного заболевания [16]. На сегодняшний день не до конца изучены особенности развития РС на субклиническом этапе и актуальна трудность его диагностики на ранних стадиях развития до манифестации клинических проявлений заболевания [24]. Общеизвестно, что не существует ни единого диагностического теста, с уверенностью способного подтвердить возможность развития демиелинизирующего заболевания у индивидуума [51], как и не выявлено достоверного маркера крови и ликвора с абсолютной специфичностью и чувствительностью для оценки активности и течения РС [25, 93].

По-прежнему вызывает интерес поиск альтернативных маркеров благоприятного или неблагоприятного прогноза заболевания [93], особенно в связи с тем, что доминирующие механизмы при вторично-прогредиентном течении РС не до конца ясны: патология серого вещества, дегенерация аксонов, активация микроглии, оксидантный стресс, митохондриальное повреждение [118].

В целом биомаркеры терапевтического ответа при РС, чаще выявляемые в церебро-спинальной жидкости, можно разделить на несколько групп: нейтрализующие антитела, биомаркеры активности болезни (fetuin-A – alpha-2-HS-glycoprotein), прогностические биомаркеры (белок CHI3L1), биомаркеры оксидативного стресса (isoprostane 8-iso-prostaglandin F2a), биомаркеры аксонального повреждения (нейрофиламенты) [93].

Стоит обратить внимание на изучаемые биомаркеры В-клеточного вовлечения в ЦНС: CXCL13 (потенциальный хемоаттрактант В-лимфоцитов), олигоклональные полосы IgG в ликворе, индекс IgG [93].

Совокупность достижений молекулярной биологии и генной инженерии привели к уточнению иммунопатогенеза многих аутоиммунных

заболеваний, в том числе РС [26]. В последние годы большое количество работ посвящено нейроиммунологии РС. Нейроиммунология – один из актуальных разделов клинической и экспериментальной иммунологии [22], поскольку ускоряющиеся темпы развития неврологии и иммунологии вынуждают расширять круг участвующих в патогенезе РС структур иммунной системы [12]. В практическую медицину активнее входят методы иммунодиагностики [32]. В частности, для оценки характера течения РС возможно исследование периферической крови и оценки субпопуляций Т- (Treg, Th17) и В-клеток (Breg, B5) [20]. В клинической практике при оценке иммунного статуса пациентов часто используется фенотипирование клеток крови [8, 28]. И предпочтительным в этой связи является применение проточных цитофлуорометров-анализаторов за счет возможности одновременного анализа множества клеточных популяций, меньших затрат труда, большой разрешающей способности приборов, быстроты выполнения анализа, применения при выполнении анализа компьютерной техники [27, 28]. Проточная цитометрия по праву считается одним из классических методов для оценки субпопуляций лимфоцитов [11]. Антитела при этом фиксируются на поверхности лимфоцитов, что позволяет обнаружить соответствующие антигенные детерминанты [11]. При помощи моноклональных антител, меченых флуорохромом, мы имеем возможность провести количественный и качественный анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов [8]. В частности, для количественной оценки общей популяции В-клеток целесообразно исследование маркера CD19<sup>+</sup> [26]. Подвергается изучению и содержание цитокинов в активированных мононуклеарных клетках периферической крови (МПК) [11].

Известно, что иммунный ответ состоит из серий межклеточных контактов, включая взаимодействие между Т-клетками и АПК, такими как дендритные клетки, В-клетки и макрофаги [137]. Межклеточные контакты, включая взаимодействие между Т-клетками и АПК, активация Т-клеток, дифференциация клеток и миграция сквозь ГЭБ играют решающие роли в

патогенезе РС. Белковые молекулы семафорины регулируют эти процессы, и вероятно, что они вовлечены в индукцию или развитие РС [137].

## **2. Семафорины – ключ к пониманию иммунных ответов в нервной системе**

### **2.1. Общая характеристика семейства семафоринов, их роль при патологических процессах**

Впервые семафорины были обнаружены в 1990-х г.г. в качестве факторов, направляющих рост аксонов (молекул-гидов аксонов) в процессе нейронального развития [63, 64, 108, 113, 132, 139]. Сокращенное название группы данных белков – SEMAs [139].

Название данных молекул происходит от слова «семафор», обозначающего передачу информации при помощи сигналов [137]. Существует 8 классов семафоринов, выделенных по своим структурным различиям [113, 203]. Выделяют семафорины беспозвоночных (I и II класс), семафорины позвоночных (III-VII класс) и ДНК-вирусные ненейротропные семафорины [107, 113]. Изучено более 30 подобных молекул [110, 113, 149, 184, 186, 195]. Семейство семафоринов включает секретируемые и мембран-связанные белки [137]. Семафорины варьируют в размерах от 400 до 1000 аминокислотных остатков [137].

Представители семейства семафоринов способны функционировать как в нервной системе, так и вне ее [113, 172]. Семафорины могут выступать в роли акцепторов и проводить сигнал в клетку, а также выполнять функции костимулирующих молекул [10]. Семафорины известны своими плеоропными значимыми функциями в физиологических [205] и патологических процессах, включая развитие сердца [200], рост сосудов [107, 170], разрастание опухоли [52, 196] и регуляцию функций иммунных клеток [63, 109, 179, 182].

Семафорины вовлечены в ряд заболеваний человека, таких как образование опухолей (саркомы мягких тканей, хронический В-клеточный лейкоз, рак груди, почек, яичников, поджелудочной железы,

аденокарцинома простаты) [101], их метастазирование, нейродегенеративные заболевания, внезапная смерть [182] и иммунные нарушения [144]. Наличие повышенного уровня семафорина Sema4D, установленное методом иммуноблоттинга, предложено в качестве признака «плохого прогноза» при мелкоклеточном раке легкого [83].

Удаление семафорина Sema4D/CD100 у мышей защищает животных от атеросклероза, уменьшая гиперактивность тромбоцитов при гиперлипидемии или васкуляризацию интимы сосудов [101]. Исследование уровня растворимого семафорина (soluble Sema4D, sSema4D) у пациентов с сердечной недостаточностью выявили его повышение при данной патологии в сравнении со здоровыми донорами, особенно при наличии сопутствующего заболевания в виде сахарного диабета [101]. Несмотря на вышеописанные данные по вовлечению семафоринов в ряд заболеваний человека, функционирование семафоринов при них остается малоизученным [107].

## **2.2. Участие семафоринов в функционировании нервной системы**

Семафорины по праву можно считать самой многочисленной семьей молекул, участвующих в направлении роста аксонов [63, 64, 107, 202]. Наряду с семафоринами известно до 10 дополнительных молекул, направляющих и ингибирующих центральный рост аксонов *in vitro*: нетрины, эфрины и представители семейства Slit, протеогликаны и белки миелина [10, 57]. Внутриклеточные сигнальные механизмы семафоринов, эфринов и эндотелиальных ростковых факторов, представленных как в нейронах, так и в эндотелиальных клетках в процессе развития нервов и сосудов, схожи [89]. Другими исследователями выделено 5 миелин-ассоциированных ингибирующих факторов (MAIFs), мешающих регенерации аксонов во взрослом организме: MAG (Myelin-associated glycoprotein), MOG (Oligodendrocyte-myelin glycoprotein), Nogo-A, ephrin B3 и Sema4D/CD100 [130].

В нервной системе семафорины принимают участие в развитии нейронального окружения. Они вовлечены в руководство направления роста

аксонов, выполняя роль хеморепеллентов или хемоаттрактантов [110, 113, 185, 186]. Семафорины участвуют в формировании клеточных контактов, поляризации нейронов и сортировке аксонов, что значимо для установки нейрональных связей [139]. Семафорины ограничивают восстановление поврежденных аксонов в ЦНС после травмы, формируя микроокружение для подавления роста аксонов [35]. Семафорины способствуют направлению аксонов и дендритов в молодых нейронах [139]. Показана способность семафорина *Sema3A* управлять поляризацией корковых нейронов *in vivo* [167, 168]. *Sema6A* способен экспрессироваться на олигодендроцитах и регулировать их дифференцировку. Представители класса семафоринов способны устанавливать аксональные связи [63] в разнообразных системах и выполняют различные биологические функции в тканях организма. Повышенная экспрессия ряда семафоринов способна замедлять регенеративные процессы в ЦНС и способствовать развитию неврологических заболеваний [35, 64, 81, 124].

### **2.3. Представление об иммунных семафоринах**

Семафорины, участвующие в реакциях иммунной системы, получили название «иммунных семафоринов» [109, 113, 115, 116, 137, 178, 183]. Открытие молекул семафоринов считается поворотным моментом в понимании иммунных ответов [109].

Биологические функции семафоринов *Sema3A*, *Sema3E*, *Sema4D*, *Sema4A*, *Sema4B*, *Sema7A* в иммунной системе включают участие в транспортировке лейкоцитов, ответах иммунологической памяти и реакциях приобретенного иммунитета [182, 183].

Мембран-связанные семафорины *Sema4D*, *Sema4A*, *Sema6D* играют роль в поддержании иммунного гомеостаза и вовлечены в патогенез аутоиммунных заболеваний на животных моделях [137]. Показана способность передачи сигналов клеткам семафоринами при некоторых аутоиммунных заболеваниях, аллергических заболеваниях, а также заболеваниях костей (на примере животных мышинных моделей) [124, 182].

Sema4D и Sema4A функционируют как ко-стимулирующие молекулы, которые регулируют иммунологический синапс – особую структуру, необходимую для презентации антигена, формируемую с участием зрелой дендритной клетки (как предвестительницы АПК) и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита [32, 137, 183].

#### **2.4. Возможное участие семафоринов в патогенезе рассеянного склероза**

Суммируя вышесказанное, можно рассматривать роль семафоринов в неврологических нарушениях с 2-х позиций: как руководящие молекулы в развитии и регенерировании ЦНС и как иммунные регуляторы. Семафорин регулирует дифференциацию Т-клеток, в частности, Sema4A [59, 136]. По данным исследователей, уровень семафорина Sema4A увеличен в сыворотке крови пациентов с РС [78]. Предложена гипотеза, согласно которой пациенты с РС с высоким уровнем семафорина 4A в сыворотке хуже отвечают на терапию интерферонами-бета [78, 165]. На модели ЭАЭ, индуцированного миелин-олигодендроцитарным гликопротеином у мышей было показано, что его развитие может быть приостановлено внутривенным введением анти-Sema4A-блокирующих антител [59, 162]. Имеются экспериментальные данные, полученные на животных моделях, о способности семафорина Sema3F усиливать ремиелинизацию КПО [58, 131, 180], в противовес чему семафорин Sema3A при его повышенной экспрессии способен нарушить миграцию данных клеток [167]. Присутствие хеморепеллента Sema3A коррелировало с меньшим количеством КПО в очаге [49]. Еще один представитель семейства семафоринов, имеющий непосредственное отношение к РС – это семафорин IV класса Sema4D/CD100.

#### **2.5. Представитель семафоринов - Sema4D/CD100**

Семафорин – семейство молекул, которые содержат филогенетически консервативный “sema”-домен и первоначально были идентифицированы в ЦНС как факторы, участвующие в сигнальных процессах аксонального

наведения [110]. В отличие от остальных членов данного семейства, Sema4D, известный также как CD100, впервые был выявлен в иммунной системе [53, 97] позже на основании структурного анализа был отнесен к семафоринам IV класса [203] и в 1996г. признан первым семафорин с иммунными функциями [164]. Sema4D представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый в иммунной системе преимущественно Т-лимфоцитами и, в существенно меньшей степени, остальными лейкоцитарными популяциями.

Семафорин IV класса Sema4D был выделен в 1992 г. с помощью моноклональных антител у кузнечиков и птенцов как первый семафорин с иммунорегуляторными функциями [37, 53, 164, 189]. Затем в 1993г. он был назван CD100 по классификации кластеров дифференцировки [164, 171].

Следует подчеркнуть, что научный интерес к исследованию данной молекулы был волнообразным, пик научных работ по особенностям функционирования семафоринов, в том числе Sema4D/CD100, пришелся на начало 1990-х и 2000-х годов, новая волна исследований отмечена с 2010г.

Sema4D/CD100 – трансмембранный белок, гликопротеин димер, включающий в себя амино-концевую сигнальную последовательность, за которой следует «sema»-домен, массой 150 kDa [192], далее Ig-подобный домен, обогащенная лизином последовательность, гидрофобный трансмембранный участок и цитоплазматический домен [53, 96, 97, 137]. Sema4D/CD100 содержит в своем цитоплазматическом домене сайты для тирозинового и серинового фосфолирования, лежащего в основе внутриклеточной сигнализации. Гены Sema4D/CD100 у человека и мышей схожи на 88% [171].

Экспрессию мРНК Sema4D/CD100 выявляют во многих тканях человека: нелимфоидных, в том числе в головном мозге взрослого человека либо эмбриона, сердце, почках [96, 113], и лимфоидных, включая селезенку, лимфатические узлы и тимус [115].

Согласно данным, полученным на мышинной модели, Sema4D/CD100 может являться ингибитором регенерации аксонов после спинальной травмы

[198], в частности, отмечено повышение экспрессии Sema4D на зрелых олигодендроцитах мышей при травме ЦНС. Данную молекулу можно рассматривать в качестве миелин-ассоциированного ингибитора роста аксонов [14]. Sema4D/CD100 был обнаружен в миелине мышей методом вестерн-блота (белкового иммуноблоттинга), причем пик синтеза миелина приходился на период миелинизации [198]. Sema4D/CD100 способен вызывать апоптоз незрелых олигодендроцитов, что было установлено при культивировании активированных Т-клеток с человеческими мультипотентными нейрональными прекурсорами или первичными олигодендроцитами мозга крыс в присутствии растворимого семафорина Sema4D (sSema4D) [169].

Установлено, что Sema4D/CD100 экспрессируется на большинстве гемопоэтических клеток, за исключением эритроцитов и незрелых клеток костного мозга [53, 113]. В частности, Sema4D/CD100 экспрессируется на поющих Т-клетках, натуральных киллерах, слабее на В-клетках и АПК, таких как дендритные клетки [54, 109, 164]. Экспрессия РНК Sema4D/CD100 была выявлена в нейронах мышечных эмбрионов [97]. Была предположена, а затем подтверждена его физиологическая экспрессия на лимфоцитах человека [96, 97].

Sema4D/CD100 участвует в иммунном ответе и регулирует как миграцию иммунных клеток, подавляя ее [47, 53], так и межклеточные контакты и взаимодействие нервных и иммунных клеток [132]. Sema4D/CD100 способствует усилению *in vivo* продукции антител (Ig) и антигенспецифическим Т-клеточным ответам (примированию Т-клеток), что было показано на примере CD100-дефицитных мышей с введением им Т-клеточно-зависимого антигена либо гемоцианина морского моллюска фиссуреллии (Keyhole limpet haemocyanin - KLH), высоко иммуногенного белкового носителя, и приводило к пониженной способности данных мышей к гуморальным иммунным ответам [189]. Для оценки схожести функционирования CD100 при его взаимодействии с рецептором CD72 у

мышей и человека учеными из Японии была сконструирована модель растворимого рекомбинатного CD100 из экстрацеллюлярной области CD100, скомбинированной с человеческим иммуноглобулином. При этом было выяснено, что Sema4D/CD100 играет роль в активации моноцитов и макрофагов, усиливая продукцию провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8 [105, 113], что подтверждало возможность функционирования человеческого CD100 в качестве лиганда при взаимодействии с человеческим CD72 и его роль в воспалении. Эти данные были получены при использовании метода иммуноблоттинга.

Sema4D/CD100 способен вызывать многочисленные биологические эффекты на нейрональные, эпителиальные и иммунные клетки благодаря использованию в качестве рецепторов плексина-B1 [54], плексина-B2 и CD72 [96, 113, 145], вызывая внутриклеточную передачу сигнала [107].

### **2.6. Рецепторы Sema4D/CD100: plexin-B1, plexin-B2 и CD72**

Биологические функции Sema4D/CD100 заключаются в способности выступать в роли лиганда через рецепторы CD72 и plexin-B1, воздействуя на нейрональные клетки, эпителиальные клетки, а также иммунные клетки, представленные В-клетками, дендритными клетками и моноцитами [47, 79, 88, 98, 113, 141, 146, 159, 189, 196, 197].

Следует отметить, что плексины наряду с их лигандами семафоринами существуют только у мультিকлеточных эукариотов и вирусов [143]. Как и другие белки роста нервов и направления аксонов (нейротрофические факторы, нетрины, WNT и NOGO), рецепторы семафоринов представляют собой модель рецепторов мультисубъединиц [55]. Можно утверждать, что нейропилины и плексины являются ведущими рецепторами для семафоринов [114, 147]. В геноме млекопитающих выделено 2 вида нейропилинов и 9 видов плексинов [113].

Подтверждено, что в нейронах семафорины передают сигнал через плексины (сокращенно PLXN или plex) и нейропилины (сокращенно NRP) [135, 176, 197]. Связывание семафорина с этими рецепторами вызывает

активацию GTPase-активирующего белка (GAP) домена и дальнейшее сигнализирование через протеинкиназы, GTPазы и цитосклет-связанные белки [197]. Взаимодействие семафоринов с рецептором плексином относят к внешнему механизму нейрональной миграции [39, 113]. В то же время плексин-B2, также рецептор семафорина, вовлечен в разнообразные аспекты кортикального развития [90] и поддержание целостности эпителиальных барьеров [164]. Нейроны могут регулировать состав подъединиц рецепторов семафоринов и использовать их и в качестве лиганда, и в качестве рецептора [139].

Установлено, что в нервной и сердечно-сосудистой системе взаимодействие семафорина Sema4D/CD100 с плексином вызывает адгезию клеток и сокращение мышечного волокна [112], что важно для движения клеток, регуляции цитоскелета [107, 123]. Передача сигнала с семафорина на плексин-B1 способствует миграции лимфоцитов через сосудистый эндотелий к месту воспаления [182], а также активации микроглиальных клеток [106, 137, 162]. Plexin-B2 обладает меньшей афинностью к Sema4D/CD100 [166], чем plexin-B1, и способен регулировать миграцию кортикальных нейронов [39].

Основным рецептором для Sema4D/CD100 в иммунной системе является трансмембранный протеин второго типа CD72 массой 45-kDa, представитель С-типа семейства лектинов, известный также как Lyb-2 [98, 113, 133, 177]. Цитоплазматический домен CD72 содержит 2 иммуно-рецепторных тирозин-содержащих ингибиторных мотива (ITIMs), ассоциированных с фосфотазой SHP1 [98, 137]. Основная популяция иммунных клеток, несущая CD72 – В-лимфоциты. CD72 наряду с plexin-B2 рецептором обладает меньшей афинностью к CD100, нежели plexin-B1 [164].

Взаимодействие Sema4D/CD100 с CD72 играет роль а развитии гломерулонефрита, ЭАЭ и аллергических заболеваний [101], оно также является критическим моментом для нервной системы [88]. Сниженная экспрессия CD72 была обнаружена при волчаночном нефрите, ассоциируясь

с тяжестью заболевания [135]. Учеными из отделения молекулярной иммунологии г. Осака (Япония) экспрессия CD72 была прослежена во время дифференциации В-клеток со снижением по мере перехода В-клеток в плазматические клетки [113]. АПК, представленные дендритными клетками и макрофагами, а также тромбоциты экспрессируют CD72 [113, 138]. CD72 играет негативную роль в активации В-лимфоцитов [189].

Эксперименты доказывают, что В-клетки мышей, имеющих дефицит CD72, отвечают на стимуляцию повышенной пролиферацией [113, 138]. Анти-CD72-моноклональные антитела способствуют пролиферации и выживанию В-клеток и увеличению экспрессии молекул МНС II класса, а также продукции IL-12 дендритными клетками [113].

При этом взаимодействие Sema4D/CD100 с CD72 усиливает В-клеточные ответы [105], снимая CD72-опосредованные негативные сигналы [189]. Это подтверждается тем фактом, что моноклональные антитела против CD72 действуют аналогично с Sema4D/CD100. Таким образом, модель взаимодействия между Sema4D/CD100 и его рецептором CD72 представляет из себя связывание лиганда с «отрицательным» регулятором с выходом в «положительную» реакцию [113]. На внутриклеточном уровне связывание Sema4D/CD100 с CD72 вызывает диссоциацию SHP-1 от CD72 и выключение ингибирующего эффекта CD72, что дает В-клетке возможность активации в ответ на антиген [137]. Sema4D/CD100-дефицитные мыши демонстрируют снижение ответа В-клеток и продукции антител, в то время как у мышей, имеющих дефицит CD72, наблюдается гиперактивация В-клеток к различным стимулам [189]. Следует сказать, что у Sema4D/CD100-дефицитных мышей также серьезно нарушена продукция специфических антител против Т-зависимых антигенов, но не Т-независимых антигенов [88].

Исследование регуляции функции семафоринов и их рецепторов в организме человека продолжают в настоящее время [123, 139].

## 2.7. Роль Sema4D/CD100 в В-клеточных ответах

Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что CD72 играет потенциальную роль в качестве негативного регулятора В-клеточного ответа [113]. Также показано, что экзогенная экспрессия Sema4D/CD100 или лечение рекомбинантными растворимыми белками Sema4D/CD100 стимулирует активацию В-клеток [79, 88, 98, 113]. Исследователями из США и Франции в 1996г. было выявлено, что экспрессирующие Sema4D/CD100 трансфектанты, созданные для оценки иммунологической функции CD100 и имитирующие активированные Т-клетки, несущие CD100, стимулируют агрегацию В-клеток селезенки и миндалин, а также их выживаемость *in vitro* [96]. У мышей с дефицитом Sema4D/CD100 снижена продукция антител, что также указывает на влияние данного семафорина на активность В-клеток [189].

Таким образом, в исследованиях на мышинных моделях *in vivo* и *in vitro* была показана способность семафоринов усиливать В-клеточную активацию при взаимодействии Т- и В-клеток [98,135].

## 2.8. Роль Sema4D/CD100 в Т-клеточных ответах

Sema4D/CD100, экспрессируемый на Т-клетках, взаимодействует с рецептором CD72 на дендритных клетках и обеспечивает начальную активацию Т-клеток (примирование) за счет влияния на созревание дендритных клеток, ведя в результате к усиленной Т-клеточной активации [113, 137].

Было показано уменьшение антиген-специфичного Т-клеточного ответа у Sema4D/CD100-дефицитных мышей, что косвенно доказывало роль этого семафорина в примировании Т-клеток [189]. При этом добавление растворимой формы семафорина (sSema4D) приводило к усилению примирования, что предполагает роль Sema4D/CD100 в этом процессе в качестве и лиганда, и рецептора.

## 2.9. Растворимая форма Sema4D/CD100 (sSema4D), ее биологические функции

Было показано, что как человеческий, так и мышинный семафорин Sema4D/CD100 протеолитически отщепляется от мембраны, переходя в растворимую форму 120-kDa [88]. Выявлено, что расщеплению молекулы Sema4D/CD100 могут способствовать металлопротеиназы [46, 113, 171]. Утверждается, что протеолитическое расщепление Sema4D/CD100 является значимым моментом для регуляции функций данной молекулы [46, 113]. Показано изменение экспрессии Sema4D/CD100 при клеточной активации [98, 113, 116, 159].

В 2001г. учеными из Японии было установлено, что растворимая форма Sema4D/CD100 сохраняет биологическую активность [88], будучи вовлеченной в иммунные ответы на примере физиологии и патологии [88, 113]. Уровень sSema4D считается равнозначным у мышей, крыс и людей в сыворотке крови в пределах 10-20 нг/мл [166]. Следует сказать, что уровень sSema4D в экспериментальных исследованиях коррелировал с титром аутоантител в сыворотке мышей [88].

Повышенный уровень sSema4D был обнаружен в супернатантах культуры активированных лимфоцитов [88, 144]. Показано, что рекомбинантный sSema4D подавляет миграцию моноцитов [47].

Интересным представляется обнаружение повышенного уровня растворимого Sema4D/CD100 при других аутоиммунных заболеваниях: в сыворотке мышей с системной красной волчанкой [88], а также у пациентов со склеродермией [144]. Выявлено, что у мышей уровни растворимого Sema4D/CD100 коррелируют с уровнем антиген-специфических антител [88, 113]. Применение растворимого рекомбинантного мышинового Sema4D/CD100, как показано *in vivo*, ускоряет продукцию антиген-специфических антител [98, 113]. Повышенные уровни растворимого семафорина выявлены в церебро-спинальной жидкости у пациентов с HTLV-1-ассоциированной миелопатией (тропическим спастическим тетрапарезом)

[169], что указывает на участие sSema4D в процессах демиелинизации.

## **2.10. Данные, полученные на животной модели рассеянного склероза (в условиях экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита), при изучении Sema4D/CD100**

Известно, что ЭАЭ отражает некоторые из патогенетических, клинических и терапевтических характеристик РС [137], тем самым обеспечивая частичное понимание молекулярных и клеточных основ этого заболевания [153]. ЭАЭ представляет из себя животную модель РС, вызываемую иммунизацией мышей или крыс очищенными белками миелина, со сходными иммунными нарушениями [51, 137], при которой миелин-реактивные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты проникают в спинной и головной мозг. Представляется, что полностью экстраполировать полученные в подобных экспериментах данные на человека нельзя с учетом специфичности заболевания РС для человеческой популяции [131].

Согласно экспериментальным данным Sema4D/CD100-дефицитные мыши испытывают нарушение продукции аутоантител и устойчивы к развитию ЭАЭ ввиду дефицита Т-клеточного примирования [137], при этом введение sSema4D приводило к восстановлению функции Т-лимфоцитов [189]. На модели ЭАЭ было показано, что введение Sema4D/CD100-блокирующих антител значительно подавляло нейровоспаление [159].

Следует учесть, что, несмотря на активное изучение модели ЭАЭ, лишь небольшая часть экспериментальных данных, полученные на мышах, была в дальнейшем взята за основу для создания новых терапевтических подходов к лечению РС [51, 206]. Таким образом, перспективным представляется изучение как можно большего числа молекул, участвующих в патогенезе РС, на клетках человека [51].

### **3. Актуальность проблемы поиска терапевтических стратегий при рассеянном склерозе и перспектива использования семафоринов в данном процессе**

Актуальность проблемы лечения РС связана с молодым трудоспособным возрастом пациентов – преимущественно от 18 до 45 лет [4]. Расшифровка иммунных механизмов патогенеза РС способствует разработке препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС) [13]. Учитывая, что начало патогенеза РС происходит, как правило, на периферии, а не в ЦНС, воздействие именно на этот первичный процесс может приостановить последующее развитие заболевания и улучшить качество жизни пациентов [23, 31]. Основные задачи терапии подразумевают уменьшение частоты и выраженности клинических exacerbаций и активности болезни по данным МРТ [50]. Для купирования exacerbаций применяется курс гормональной терапии. Однако при доминировании В-клеточного компонента заболевания эффективнее применение плазмафереза в период обострения РС [119].

Постоянная ИМТ на сегодняшний день – способ предотвращения потери аксонов и прогрессирования РС [42, 77]. Первые препараты для терапии РС – интерфероны-бета – успешно используются с доказанной эффективностью и безопасностью более 20 лет [76]. Не исчерпывающая совокупность вариантов терапевтического вмешательства при РС включает в себя: иммуномодуляторы (интерфероны-бета, глатирамера ацетат); ингибиторы проникновения иммунных клеток через ГЭБ (натализумаб); вещества, вызывающие секвестрацию иммунных клеток (финголимод); стимуляторы уничтожения иммунных клеток (митоксантрон). Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA, USFDA) был также одобрен препарат терифлюномид для терапии РС. На сегодняшний день большинство стратегий терапии РС направлено на подавление воспалительного компонента заболевания, нежели на поддержание и пролонгирование

ремиелинизации. Однако лишь 2/3 пациентов отвечают должным образом, например, на ИМТ первого ряда интерферонами-бета [42]. По другим данным, до 40% пациентов считаются нон-респондерами на терапию интерферонами-бета [65, 165, 181]. Стоит подчеркнуть, что все вышеописанные препараты способны в различной мере воздействовать на В-клетки при РС, что улучшает клиническую ситуацию [50].

К настоящему времени постоянно развиваются новые пути разработки следующих поколений препаратов для лечения РС [15]. Современные терапевтические стратегии все больше ориентированы на использование специфических молекулярных мишеней-маркеров РС [2], что достигается использованием гуманизированных моноклональных антител [94]. Оправданно создание как можно большего числа терапевтических стратегий, направленных на усиление процессов ремиелинизации при РС [85]. Представляется, что эффективным явилось бы выявление молекул, способных усиливать дифференцировку КПО в очагах демиелинизации, тем самым способствуя ремиелинизации [34, 70] либо замедлению темпов демиелинизации и нарастания атрофии мозга [24]. Данные по разноплановому влиянию семафоринов на функцию КПО рассматриваются как многообещающее звено для процессов восстановления при РС [58].

Следует акцентировать внимание и на аспекте индивидуального течения РС у каждого пациента и клинического ответа на проводимую терапию [93, 94]. В частности, в последние годы определенная доля ИМТ нейровоспалительных заболеваний нервной системы выбирает в качестве мишени дендритные клетки [172] либо В-клетки [191].

Полученные на мышинных экспериментальных моделях данные по подавлению функции Sema4D/CD100 с дальнейшей устойчивостью к ЭАЭ указывают на его возможное участие в патогенезе РС и выдвигают Sema4D/CD100 на роль терапевтической мишени при данной патологии [140, 183]. Полагают, что Sema4D/CD100 способен предотвратить продукцию энцефалитогенных Т-клеток и уменьшить воспаление и нервное

повреждение. Остается также не до конца изученной, но перспективной возможность регенерации аксонов путем блокирования семафоринов у человека [127, 161]. Экспрессия Sema4D/CD100 в иммунной системе при РС и его роль в развитии РС не исследована, в связи с чем эта тема становится особенно актуальной.

## ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБЛЮДЕНИЙ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящее исследование проведено в период с 2011 по 2014 г.г. в условиях Пермского краевого центра рассеянного склероза на лечебной базе поликлиники Пермской краевой клинической больницы (ГБУЗ Пермского края «Ордена Знак Почета» Пермская краевая клиническая больница»). Иммунологические исследования проводили в Лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (г. Пермь).

### 2.1. Дизайн исследования, объем наблюдений

Общая совокупность обследуемых составила 76 человек, из которых 52 человека являлись пациентами с диагнозом РС и 24 – здоровыми донорами (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Дизайн исследования.

Основными критериями отбора пациентов в исследуемую группу явились: достоверный диагноз РС, возраст пациентов от 18 до 55 лет, рецидивирующе-ремиттирующее течение заболевания РС согласно критериям Lublin-Rheingold [120], отсутствие в анамнезе воздействия ИМТ (ПИТРС), самостоятельное подписание добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

Критериями исключения для набора в основную группу явились: возраст моложе 18 либо старше 55 лет, вторично-прогредиентное течение заболевания, тяжелая сопутствующая патология, значимые отклонения от нормы результатов стандартных методов исследования (общеклинический анализ крови, биохимический анализ крови (содержание глюкозы, общего билирубина, прямого билирубина, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, мочевины, креатинина, общего белка), электрокардиограмма, флюорография), установленный факт беременности, наличие других уточненных аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также наличие в анамнезе системного воздействия кортикостероидов в течение как минимум 30 дней до взятия образцов периферической крови, учитывая их возможное иммунодепрессивное воздействие на клеточное звено иммунной системы, в частности, на снижение числа  $CD4^+$  Т-лимфоцитов в периферической крови [100].

Достоверный диагноз РС основывался на критериях McDonald пересмотра 2005 года [68], включающих определенное сочетание клинических, анамнестических данных и результатов МРТ-исследований головного и реже спинного мозга [11], направленное на доказательство распространенности процесса во времени и пространстве при исключении альтернативных диагнозов [201].

Определение стадии обострения РС для набора соответствующей группы пациентов осуществлялось клинически. Обострением (рецидивом, атакой, эксацербацией РС) считалось появление новых или усиление проявления уже имевшихся неврологических симптомов, не

сопровождающееся лихорадкой, не связанное с острым психоэмоциональным стрессом, длительностью не менее 24 часов, которое наступило после периода улучшения или стабилизации симптоматики длительностью не менее 30 дней, возникновение которого не имеет другого альтернативного объяснения, и подтверждено данными объективного осмотра квалифицированного врача невролога [69, 91, 199]. При этом в большинстве случаев на МРТ удавалось обнаружить очаги демиелинизации с характерным накоплением контраста по типу кольца, полукольца либо со сплошным накоплением (свидетельствовало об активности заболевания) [20, 31]. Большинству пациентов (35 из 52 чел.) МРТ головного мозга была проведена с использованием контрастного препарата, что является золотым стандартом диагностики и оценки течения демиелинизирующего заболевания [7, 104, 161, 201].

Исследование было открытым, одномоментным, контролируемым. Все пациенты с диагнозом РС, принявшие участие в исследовании, удовлетворяли критериям включения. Пациенты с РС были в дальнейшем поделены на 2 подгруппы в зависимости от стадии заболевания на момент обследования – ремиссии или обострения (рис. 2.1).

## **2.2. Клиническая характеристика, субпопуляционный состав моноклеарных клеток периферической крови пациентов с рассеянным склерозом**

Обследование пациентов было одобрено Локальным Этическим Комитетом ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России. Всеми пациентами было подписано информированное согласие перед забором образцов периферической крови. Клинико-лабораторному обследованию подверглись 76 человек, из них 52 человека с диагнозом РС. Средний возраст всех пациентов с РС составил 29,0 (24,0;35,5) лет. Возраст пациентов в стадии ремиссии варьировал от 18 до 55 лет, медиана 30,0 (24,0;38,0); в стадии обострения – от 22 до 52 лет, медиана 26,0 (23,0;37,0),  $p=0,450$ . Длительность заболевания к моменту начала исследования в группе

пациентов с РС составила 2,25 (1,00;6,50) лет, при этом в стадии ремиссии – 4,0 (1,5; 8,0) года, в стадии обострения – 1,0 (0,5;2,5) год,  $p=0,005$ . Пациенты находились в стадии ремиссии на протяжении 117 (78;243) дней до момента забора материала для исследования. Срок ремиссии исчислялся на основании собранных анамнестических сведениях о дате стабилизации состояния после последней эксацербации РС. Продолжительность периода от проявления симптомов обострения РС до забора образцов крови варьировала в промежутке от 5 до 74 дней, медиана 30 (15;30).

Группу контроля составили практически здоровые лица («условно здоровые доноры», обозначенные нами как здоровые доноры, ЗД) без анамнестических сведений о наличии неврологических или аутоиммунных заболеваний и без данных о наличии инфекционного или аллергического заболевания на момент забора биообразцов, средний возраст которых составил 30 (27;35) лет. Распределение обследуемых лиц по основным характеристикам представлено в табл. 2.1.

Таблица 2.1

**Основные характеристики групп обследуемых; Me [LQ;UQ]**

Сравниваемые показатели		Группы обследуемых	
		Пациенты с РС n=52	Контрольная группа (Здоровые доноры) n=24
Возраст (годы)		29,0 (24,0;37,5)	30,0 (27,0;35,0)
Пол	Женский	35	20
	Мужской	17	1
Уровень EDSS (баллы)		2,5 (2,0;4,0)	–
Длительность заболевания (год)		2,3 (1,0;6,5)	–

Нами не было прослежено гендерных отличий у пациентов с рассеянным склерозом в данных нейропсихологических и

иммунологических и исследований, поэтому мы считали группы пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров сопоставимыми.

Клиническое обследование пациентов включало сбор данных об анамнезе заболевания, виде дебюта, количестве предшествующих обострений. В соответствии с порядком проведения объективного осмотра выполнялось физикальное обследование органов и систем. Пациентам с РС была проведена оценка неврологического статуса, уровня инвалидизации по шкале EDSS (Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала нарушений жизнедеятельности Курцке) [117], являющейся классическим вариантом оценки среди подобных показателей на протяжении более 20 лет [72, 91]. Она включала оценку 8-ми функциональных систем (FS), в том числе способности к ходьбе. Уровень инвалидизации по шкале EDSS варьировал для пациентов в стадии ремиссии в диапазоне от 1,5 до 4,0 баллов, медиана 2,0 (1,5;3,5), в то время как для пациентов в стадии обострения – от 1,5 до 5,5 баллов, медиана 3 (2,0;4,5), отмечено отличие по баллу EDSS в данных группах ( $p=0,036$ ).

Субпопуляционный состав мононуклеарных клеток периферической крови и соотношение основных субпопуляций лимфоцитов пациентов с РС и ЗД представлены в табл. 2.2.

**Численность и соотношение основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов с рассеянным склерозом в сопоставлении со здоровыми донорами; Me [LQ;UQ]**

Показатели		Пациенты с РС	Здоровые доноры	p
Субпопуляционный состав мононуклеарных клеток периферической крови, %	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	47,0 (35,6;49,9) (n=37)	47,0 (37,3;55,3) (n=20)	0,405
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	25,0 (20,3;27,5) (n=37)	31,0 (22,9;38,6) (n=20)	0,015*
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	1,9 (1,4;2,3) (n=37)	1,5 (1,0;2,4) (n=20)	0,284
	CD3 <sup>-</sup>	29,1 (20,9;34,0) (n=37)	22,0 (17,6;29,9) (n=20)	0,113
	CD19 <sup>+</sup>	17,3 (14,1;23,5) (n=24)	9,4 (7,9;10,9) (n=15)	0,000*

Здесь и далее: \* – значимые различия между группами; n – количество обследованных

Субпопуляционный состав МПК не отличался у пациентов с РС и ЗД для CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, а также для неТ-клеточной субпопуляции клеток, обозначенной нами как CD3<sup>-</sup> и включавшей В-клетки, естественные киллеры и моноциты (табл. 2.2). Исключение составляли субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, процент этих клеток был выше у ЗД, чем у больных РС (табл. 2.2), и субпопуляция CD19<sup>+</sup>, процент этих клеток был выше у пациентов с РС в сравнении со ЗД (табл. 2.2). Повышение процентного содержания В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup> клеток) в периферической крови у пациентов с РС (табл. 2.2) может свидетельствовать о гиперактивации В-клеточного звена иммунной системы при данной патологии, что согласуется с данными литературы [71, 75, 94, 119, 191].

## **2.3. Основные методы исследования**

### **2.3.1. Психометрическое тестирование**

Пациенты и здоровые доноры самостоятельно заполняли опросники по соответствующим шкалам:

- по госпитальной шкале тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale по Zigmond A.S., Snaith R.P, 1983, Wade D., 1993; Бевз И.А.) [1] для оценки аффективных расстройств у пациентов с РС и группы контроля;
- по шкале MFI-20 (Multidimensional Fatigue Inventory) [194] для определения усталости у пациентов с РС и группы контроля.

Также было проведено однократное обследование по селективным для пациентам с РС шкалам:

- по шкале MSIS-29 (Multiple Sclerosis Impact Scale) [126, 129, 193], предназначенной для оценки влияния РС на физическое и психическое состояние пациента на протяжении последних 2-х недель. Тест состоит из шкалы оценки физического состояния (20 вопросов) и психического состояния (9 вопросов). Большой балл означает худшее состояние;
- по опроснику FAMS (Functional Assessment of Multiple Sclerosis, Функциональная оценка РС) [204] для оценки качества жизни при РС.

### **2.3.2. Тестирование когнитивных функций**

Использовался слуховой тест на сложение в заданном темпе PASAT-3 (Paced Auditory Serial Addition Test). Тест призван оценить скорость обработки цифровой информации, воспринимаемой на слух и гибкость мышления в сочетании со способностью к вычислению [128]. Тест представлен на CD-диске, где на стандартной аудиозаписи перечислен ряд числе с разницей в 3 секунды каждая (всего 10 цифр для тренировочного теста и 60 цифр для основного теста). Тест проводился в тихой комнате, его нельзя было прерывать, запрещено было отвлекаться во время теста. Сначала пациенту предлагалось пройти тренировочный вариант теста,

включающий набор из 10 цифр, не более 3-х раз, пока пациент не был в состоянии дать хотя бы 2 правильных ответа при сложении цифр. Пациент слушал первые 2 цифры, складывал и вслух называл только ответ. Далее каждый раз следующую цифру, называемую диктором, складывал к предыдущей названной им же, диктором, цифре. Необходимости запоминать свои ответы у обследуемого не было. Ответы пациента были зафиксированы на отдельном бланке. Правильные ответы обведены в круг и подсчитано набранное количество баллов из 60 максимально возможных.

### **2.3.3. Интерпретация данных магнитно-резонансной томографии головного мозга**

Данное исследование проведено пациентам для установления диагноза в условиях г. Перми, в отдельных случаях г. Ижевска, г. Екатеринбурга амбулаторно, самостоятельно или по квотам в рамках обязательного медицинского страхования, на томографах мощностью не менее 1,5 Тесла. Целесообразность учета данных МРТ головного мозга при анализе совокупности наблюдений обусловлена тем, что она позволяет не только подтвердить диагноз РС, но и является одним из объективных методов оценки активности демиелинизирующего заболевания [91, 122, 161, 201].

### **2.3.4. Лабораторные методы исследования**

Лабораторному исследованию подверглись лимфоциты периферической крови пациентов с РС. В качестве контроля использовали лимфоциты здоровых доноров. Венозная кровь была забрана из кубитальной вены в стерильные пластиковые пробирки, содержащие гепарин (25 ед/мл крови). Забор крови происходил в первую половину дня (до 13.00). Исследования проводили в Лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук.

Часть крови (1,5 мл) центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут для получения плазмы, которую собирали и хранили при -20°C для дальнейшего использования (в частности, для анализа уровня

растворимого семафорина). Из остальной крови выделяли мононуклеарные клетки центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ) (рис. 2.2).

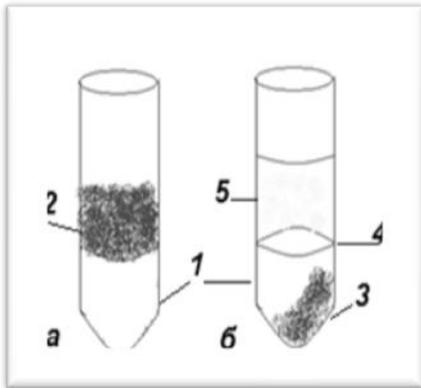


Рис. 2.2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови в градиенте плотности фиколла-верографина.

а – до центрифугирования крови.

б – после центрифугирования крови

1 – раствор фиколла-верографина (плотность  $1,077 \text{ г/см}^3$ )

2 – кровь

3 – эритроциты

4 – мононуклеарные клетки периферической крови (в том числе лимфоциты)

5 – плазма крови

Для этого кровь была разведена в 2-3 раза стерильной питательной средой RPMI-1640 («Биолот», РФ). Далее разведенную таким образом кровь наслаивали на 3 мл фиколла (ООО «Медика», РФ) и центрифугировали (Centrifuge MPW-340, "Mechanika Precyzyjna", Польша) со скоростью 1750 оборотов в минуту в течение 40 минут.

Мононуклеарные клетки периферической крови собирали пипеткой с интерфазы (с поверхности фиколла) и отмывали от фиколла средой RPMI 1640 центрифугированием при 1500 об./мин. X 10 мин. (дважды), после чего ресуспензировали клетки в физиологическом растворе (для исследований *ex vivo*) или в полной питательной среде (ППС) – для дальнейшего культивирования.

Алгоритм лабораторных исследований представлен на рис. 2.3.

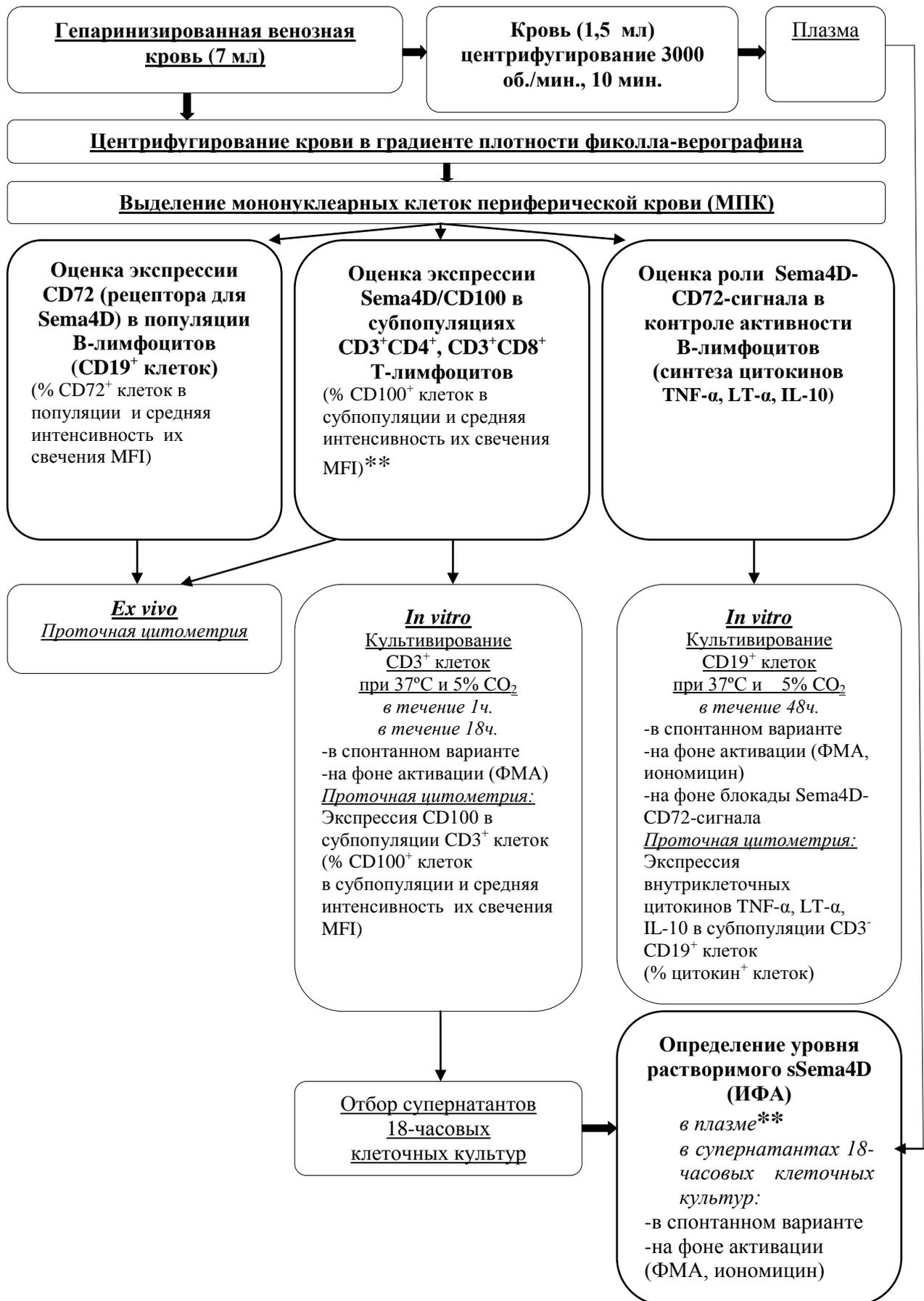


Рис. 2.3. Алгоритм лабораторных исследований.

\*\* – исследования, проведенные у пациентов в стадии обострения РС

У пациентов в стадии обострения (экзацербации) рассеянного склероза, обследованных нами на завершающем этапе нашего исследования, мы вынужденно изучали только 2 иммунологических аспекта – экспрессию семафорина Sema4D/CD100 на Т-лимфоцитах периферической крови *ex vivo* и уровень растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови.

#### **2.3.4.1. Показатели, оцененные *ex vivo***

Выделенные МПК использовали для оценки экспрессии семафорина Sema4D/CD100 *ex vivo* – Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup> клетками) и отдельно субпопуляциями CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов. Наряду с этим, *ex vivo* определяли экспрессию рецептора для Sema4D/CD100 – CD72 – В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup> клетками).

#### **2.3.4.2. Показатели, оцененные после культивирования клеток**

МПК культивировали ( $2 \times 10^6$  кл./мл) в плоскодонных иммунологических планшетах в полной питательной среде на основе среды RPMI-1640 (“Gibco”), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Serva”), 300 мкг/мл L-глутамин (“Serva”), 0,01М HEPES (“Sigma”) и 100 мкг/мл гентамицина (“Pharmacia”, Швеция), при 37° и 5% CO<sub>2</sub> – без активатора (спонтанный вариант) и в условиях активации. В качестве активатора клеток использовали фторболмиристатацетат (ФМА, Sigma; 10 нг/мл), один или в комбинации с иономицином (Sigma; 2 мкМ). ФМА является неспецифическим активатором протеинкиназы C, иономицин – кальциевым ионофором, они способствуют активации клетки в обход антигенраспознающих рецепторов [32].

Для определения экспрессии Sema4D/CD100 интактными (спонтанный вариант) и активированными Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup> клетками) МПК культивировали в течение 1 часа и 18 часов. По окончании культивирования клетки отмывали от полной питательной среды (1500 оборотов в минуту, 10 минут), с последующим определением коэкспрессии мембранных молекул CD3/CD100 – проточной цитометрией, с использованием соответствующих моноклональных антител. Одновременно с этим для 18-часовой клеточной

культуры отбирали супернатанты для дальнейшего использования и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для определения экспрессии внутриклеточных цитокинов В-лимфоцитами клетки культивировали в течение 48 часов, после чего отмывали от ППС и оценивали экспрессию TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$  и IL-10 в CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> клетках – проточной цитометрией, с использованием соответствующих моноклональных антител.

### 2.3.4.3. Подготовка проб для цитометрического исследования

Клетки, отмывые от фикола (в исследованиях *ex vivo*) или от ППС (в исследованиях *in vitro*), инкубировали с моноклональными антителами 20 минут в темноте при комнатной температуре. Антитела были использованы в рекомендованной производителями концентрации.

Для определения экспрессии Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами были использованы следующие моноклональные антитела: анти-CD100\*PE (Biolegend), анти-CD3\*PE\_PC7 (BeckmanCoulter), анти-CD4\*FITC (BeckmanCoulter) и анти-CD8\*FITC (BeckmanCoulter).

Для оценки экспрессии рецептора для Sema4D/CD100, CD72, на В-лимфоцитах использовали следующие моноклональные антитела: анти-CD72 человека\*FITC (BioLegend) и анти-CD19\*PE (BioLegend). Для стандартизации исследования проводили изотипический контроль к Sema4D/CD100, для чего использованы моноклональные контрольные мышиные антитела IgG1, меченые PE, а также изотипический контроль к CD72 – с помощью моноклональных мышиных антител IgG2b, меченых FITC.

Производителями моноклональных антител были использованы следующие флуоресцентные красители (флюорохромы):

- флуоресцеина изотиоцианат – FITC, зеленая метка, канал FL1-Н;
- фикоэритрин – PE, оранжевая метка, канал FL2-Н;
- тандемный краситель – PE\_PC7, красная метка, канал FL3-Н.

Пробы отмывали от несвязавшихся антител с помощью буфера Cell Wash (Becton Dickinson) центрифугированием при 1500 об./мин. в течение 10 минут и анализировали на цитометре (проточном цитофлюориметре FACS Calibur ("Becton Dickinson", США).

При оценке экспрессии внутриклеточных цитокинов В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup> клетками) клетки, отмывые от ППС, ресуспензировали в буфере Cell Wash, окрашивали поверхностными антителами анти-CD19\*PE/Cy5 (BioLegend), инкубировали 20 минут в темноте. После этого фиксировали клетки добавлением 1 мл фиксирующего буфера, инкубировали 15 мин. в темноте, отмывали 2 раза в 1 мл CellWash, добавляли в пробирки по 500 мкл пермеабилзирующего буфера, инкубировали 1 час в темноте. После этого клетки окрашивали антителами к цитокинам (анти-TNF- $\alpha$ \*PE (Biolegend), анти-LT- $\alpha$ \*PE (Biolegend), анти-IL-10\*PE (Biolegend), инкубировали 30 мин. в темноте, отмывали клетки от антител в 1 мл CellWash и анализировали на проточном цитофлюориметре.

Вклад Sema4D-зависимого сигнала в регуляцию синтеза В-клеточных цитокинов определяли ингибиторным анализом за счет внесения в культуру за 1 час до активации блокирующего пептида для Sema4D/CD100 (Santa Cruz Biotechnology) в конечной концентрации 10 мкг/мл, а также блокатора рецептора для данного семафорина, CD72 (Santa Cruz Biotechnology), в концентрации 10 мкг/мл.

#### **2.3.4.4. Алгоритм цитометрического исследования экспрессии Sema4D/CD100 субпопуляциями CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов**

Алгоритм анализа включал вариант для неокрашенной пробы и вариант для окрашенной пробы. Неокрашенные пробы (то есть пробы, не обработанные моноклональными антителами, мечеными флуорохромом) ставились для того, чтобы убедиться, что клетки сами не светятся. Кроме того, чтобы учесть возможное неспецифическое связывание, для Sema4D/CD100 и CD72 использовали изотипические контроли, то есть моноклональные антитела того же изотипа, что и основные, меченые тем же

флуорохромом, но не связывающие соответствующие антигены – Sema4D/CD100 и CD72.

На первом этапе в соответствии с параметрами переднего (FSC-H) и бокового (SSC-H) светорассеяния выделяли лимфоцитарный гейт (рис. 2.4а, 2.5а).

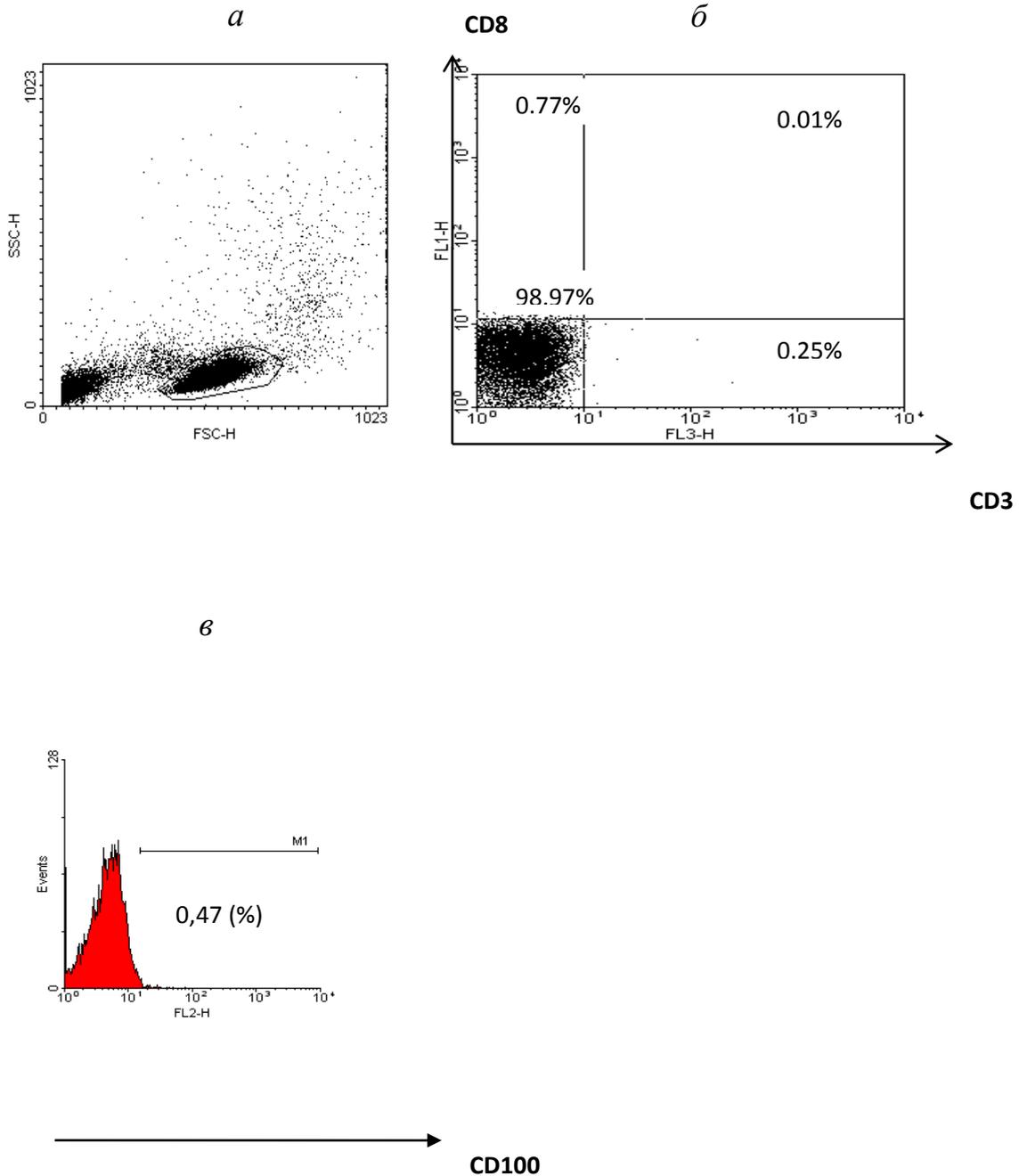


Рис. 2.4 (а,б,в). Стратегия анализа результатов цитометрических исследований при оценке экспрессии Sema4D/CD100 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами периферической крови (неокрашенные пробы). Представлены данные одного из 57 аналогичных экспериментов.

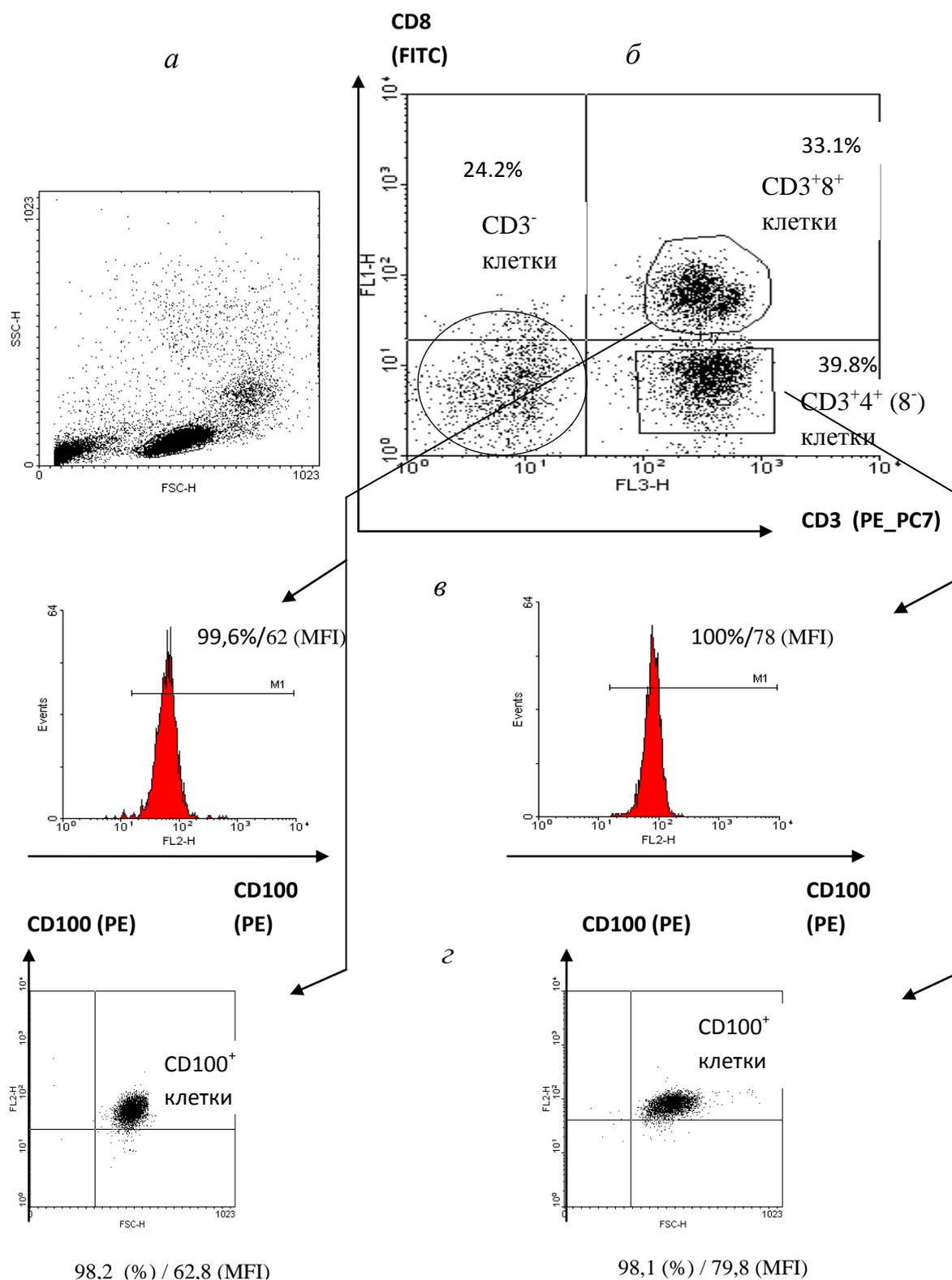


Рис. 2.5 (а,б,в,г). Стратегия анализа результатов цитометрических исследований при оценке экспрессии Sema4D/CD100 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами периферической крови (окрашенные пробы). Представлены данные одного из 57 аналогичных экспериментов.

На втором этапе в лимфоцитарном гейте идентифицировали  $CD3^+CD4^+$  и  $CD3^+CD8^+$  Т-лимфоциты. Для этого строили двумерный график: по оси абсцисс – экспрессия CD3 (анти-CD3-антитела, меченые PE\_PC7, FL3-H), по оси ординат – экспрессия CD8 (анти-CD8-антитела мечены FITC, FL1-H). На графике (рис. 2.4б, 2.5б) идентифицировали субпопуляции  $CD3^+CD8^+$  Т-лимфоцитов (овальный гейт) и  $CD3^+CD8^-$  Т-лимфоцитов (прямоугольный гейт). Следует отметить, что в первых десяти образцах крови мы отдельно оценивали процент  $CD100^+$  клеток среди  $CD3^+CD8^+$  и  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцитов, и, поскольку показатели для субпопуляции  $CD3^+CD4^+$  клеток практически совпадали с соответствующими показателями для  $CD3^+CD8^-$  клеток, далее определяли  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоциты как  $CD3^+CD8^-$  клетки в соответствии с общепринятой практикой [151].

На третьем этапе в каждой из Т-клеточных субпопуляций определяли экспрессию Sema4D/CD100, для чего использовали один из двух вариантов:

- 1) строили гистограмму: по оси абсцисс – экспрессия Sema4D/CD100 (анти-CD100-антитела мечены PE, FL2-H), по оси ординат – число клеток (рис. 2.4в, 2.5в);
- 2) строили двумерный график: по оси абсцисс – величина переднего светорассеяния (FSC-H), по оси ординат – экспрессия Sema4D/CD100 (анти-CD100-антитела мечены PE, FL2-H) (рис. 2.5г); клетки в верхнем правом квадранте на этих графиках –  $CD100^+$  Т-клетки.

Процент клеток, несущих те или иные маркеры, логичнее определять на двумерном графике, тогда как изменение уровня экспрессии конкретного маркера, определяемого как средняя интенсивность свечения клеток (Mean Fluorescence Intensity, MFI), более наглядно представлено на гистограмме. Как видно из рис. 2.5в и 2.5г, значения, получаемые этими двумя путями, аналогичны.

В немногочисленных предшествующих работах экспрессия семафорина Sema4D/CD100 на мембране клеток определялась с помощью иммуноблоттинга. Вопрос об оценке уровня экспрессии (MFI) семафорина

Sema4D на Т-лимфоцитах возник после того, как мы выяснили, что он конститутивно экспрессируется на данных клетках. Уровень экспрессии тех или иных факторов (MFI) используется в современных научных исследованиях, особенно в отношении молекул, которые конститутивно присутствуют на мембране или внутри клеток, но существенно повышают экспрессию при тех или иных воздействиях, например, HLA-DR при активации или цитокины. Определяется он как средняя интенсивность свечения клеток, обработанных моноклональными антителами к конкретному маркеру, и характеризует, как предполагается, плотность соответствующих молекул на мембране или внутри клетки. Нормативных или нормальных значений у этого показателя нет. Он напрямую зависит от уровня свечения антител, то есть, фактически – метки, поэтому при использовании моноклональных антител с разной меткой или антител с одной меткой, но от разных производителей, значения MFI будут существенно различаться. Как следствие, данный показатель не используется в клинических исследованиях и не может рассматриваться в качестве маркера, но он активно используется в экспериментальных работах для выяснения тех или иных процессов и механизмов. Все эксперименты ставились нами на одних и тех же антителах (одной партии), и поэтому мы имели право сопоставлять их между собой.

#### **2.3.4.5. Алгоритм цитометрического анализа экспрессии Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup> клетками) и экспрессии CD72 В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup> клетками)**

В культуре экспрессия Sema4D/CD100 и ее уровень (MFI) определялись нами для CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. На первом этапе в лимфоцитарном гейте (рис. 2.6а, 2.7а) идентифицировали Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup> клетки). Для этого строили двумерный график: по оси абсцисс – величина переднего светорассеяния (FSC-H), по оси ординат – экспрессия CD3 (анти-CD3-антитела мечены PE\_PC7, FL3-H) (рис. 2.6б, 2.7б).

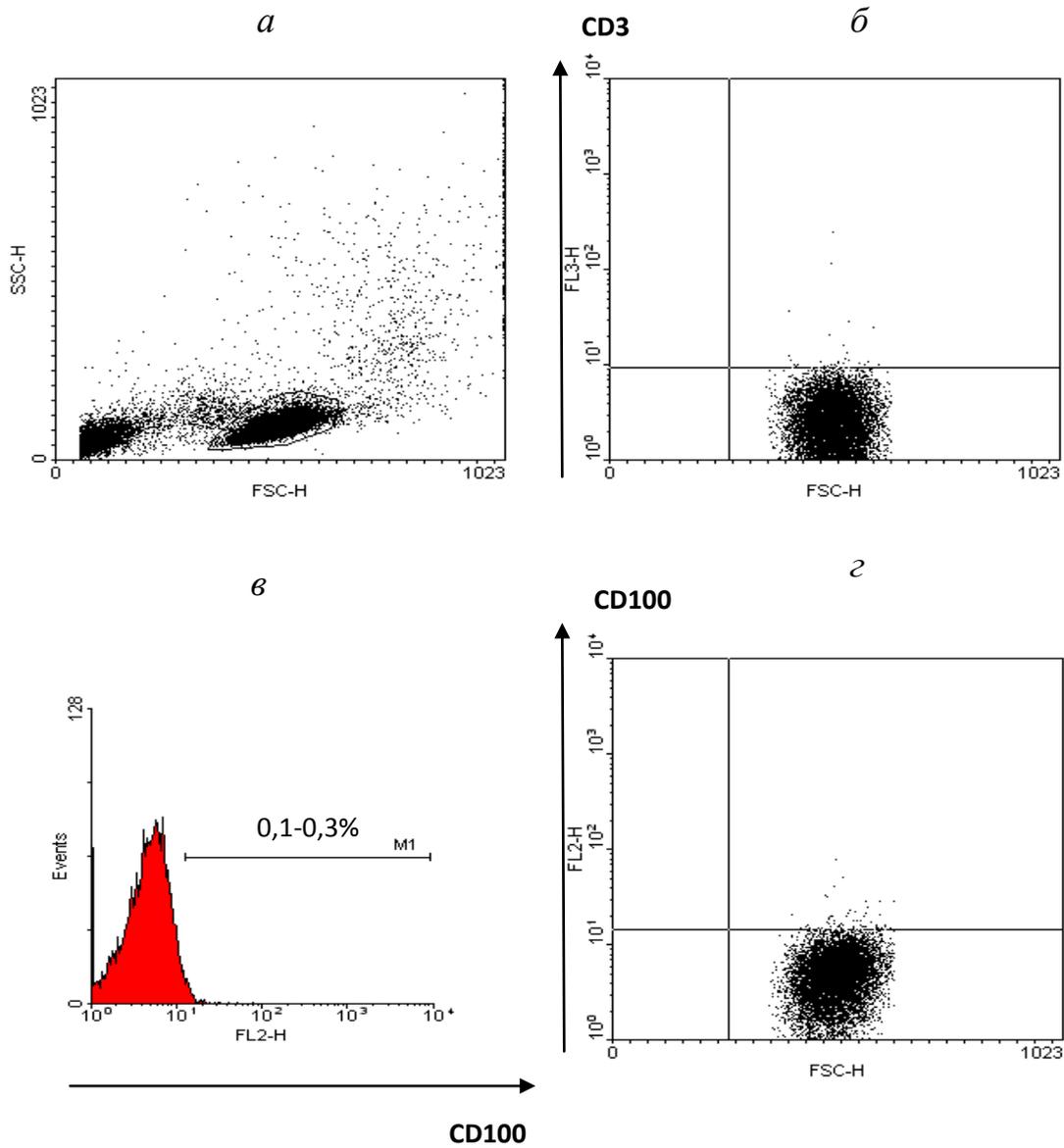


Рис. 2.6 (а,б,в,г). Стратегия анализа результатов цитометрических исследований при оценке экспрессии Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup> клетками) (неокрашенные пробы). Представлены данные одного из 19 аналогичных экспериментов.

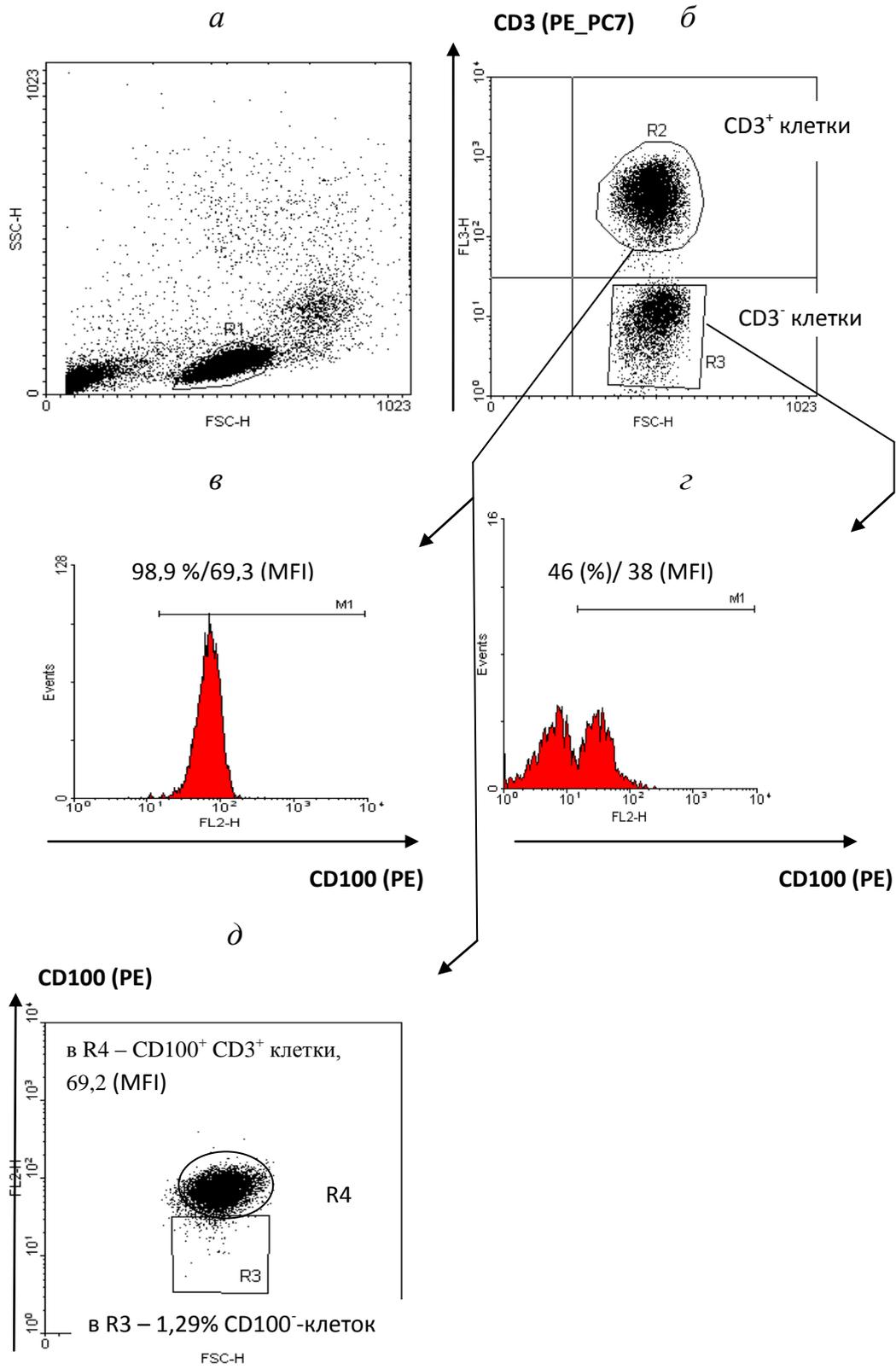


Рис. 2.7 (а,б,в,г,д). Стратегия анализа результатов цитометрических исследований при оценке экспрессии Sema4D /CD100 Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup> клетками) (окрашенные пробы). Представлены данные одного из 19 аналогичных экспериментов.

На втором этапе в популяции  $CD3^+$  клеток (овальный гейт) (рис. 2.7б) определяли экспрессию Sema4D/CD100, для чего использовали один из двух вариантов:

- 1) для популяции  $CD3^+$  клеток строили гистограмму (рис. 2.7в, 2.7в): по оси абсцисс – экспрессия Sema4D/CD100 (анти-CD100-антитела мечены PE, FL2-H), по оси ординат – число клеток;
- 2) строили двумерный график (рис. 2.7д): по оси абсцисс – величина переднего светорассеяния (FSC-H), по оси ординат – экспрессия Sema4D/CD100 (анти-CD100-антитела мечены PE, FL2-H); прямоугольный гейт (R3) на этом графике (рис. 2.7д) – процент  $CD100^-$  клеток в популяции  $CD3^+$  лимфоцитов, овальный гейт (R4) на этом графике (рис. 2.7д) – процент  $CD100^+$  клеток в популяции  $CD3^+$  лимфоцитов.

Как видно из рис. 2.7в и 2.7д, значения, получаемые этими двумя путями, аналогичны.

Для определения экспрессии Sema4D/CD100 в популяции  $CD3^-$  клеток строили гистограмму (рис. 2.7з): по оси абсцисс – экспрессия Sema4D/CD100 (анти-CD100-антитела мечены PE, FL2-H), по оси ординат – число клеток. Также использовался альтернативный вариант в виде построения соответствующего двумерного графика, сходного с таковым для определения экспрессии Sema4D/CD100 для  $CD3^+$  клеток (рис. 2.7д).

Алгоритм цитометрического исследования экспрессии рецептора для Sema4D/CD100 – CD72 – В-лимфоцитами ( $CD19^+$  клетками) был аналогичным: на первом этапе в лимфоцитарном гейте на основе параметров переднего светорассеяния (FSC-H) и бокового светорассеяния (SSC-H) идентифицировали В-лимфоциты ( $CD19^+$  клетки); на втором этапе в популяции  $CD19^+$  клеток определяли экспрессию CD72 – также одним из двух способов: на гистограмме (экспрессия CD72) или на двумерном графике (по параметрам переднего светорассеяния FSC-H и экспрессии CD72).

### 2.3.4.6. Алгоритм цитометрического исследования экспрессии внутриклеточных цитокинов В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup> клетками)

На первом этапе в лимфоцитарном гейте (рис. 2.8*а*, рис. 2.9*а*) идентифицировали В-лимфоциты (CD19<sup>+</sup> клетки). Для этого строили двумерный график: по оси абсцисс – величина переднего светорассеяния (FSC-H), по оси ординат – экспрессия CD19 (анти-CD19-антитела мечены, PE/Cy5, FL3-H) (рис. 2.8*б*, 2.9*б*, 2.9*в*, 2.9*г*).

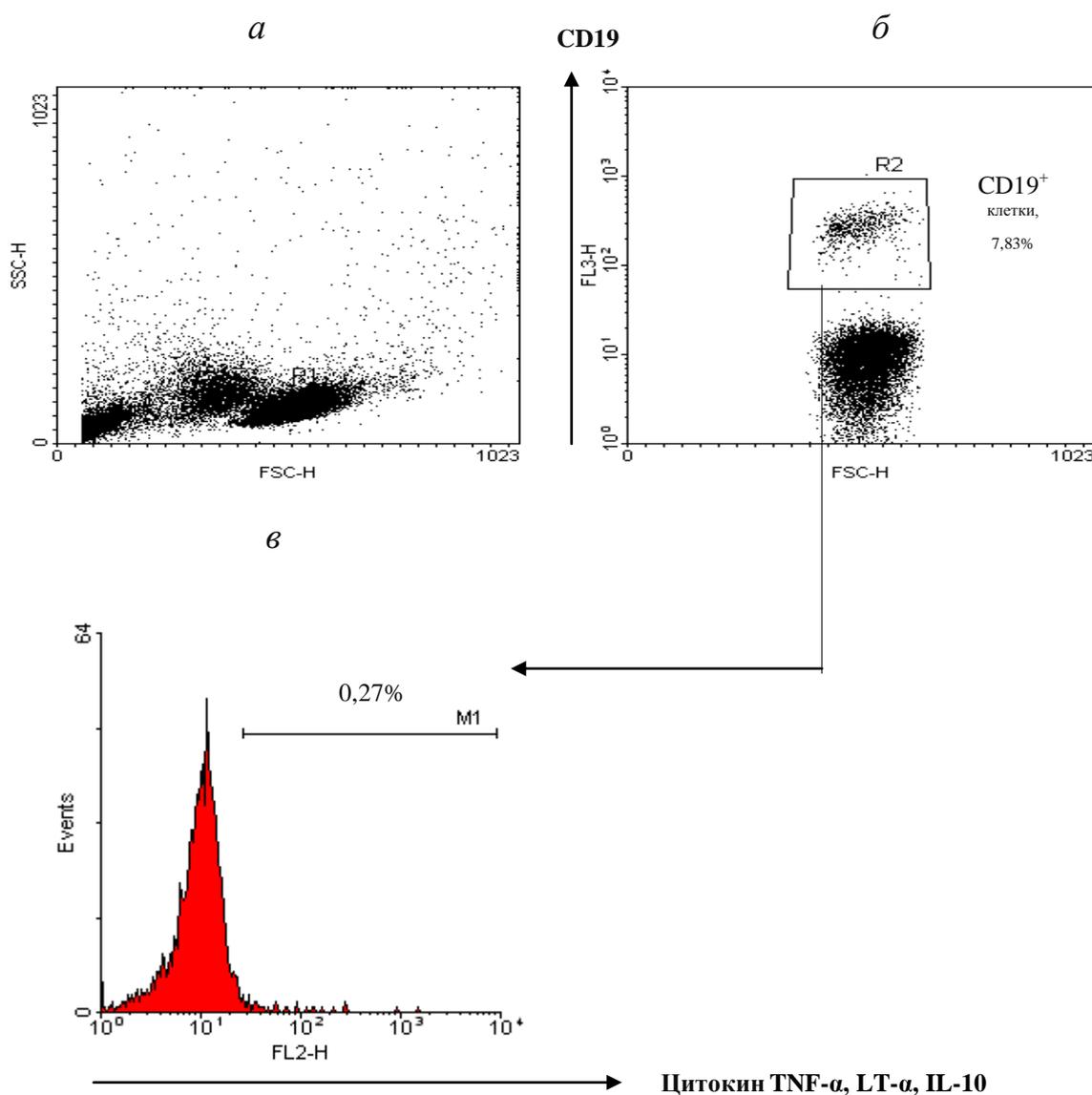


Рис. 2.8 (а, б, в). Стратегия анализа результатов цитометрических исследований при оценке экспрессии цитокинов в популяции CD19<sup>+</sup> клеток (неокрашенные пробы). Представлены данные одного из 22 аналогичных экспериментов.

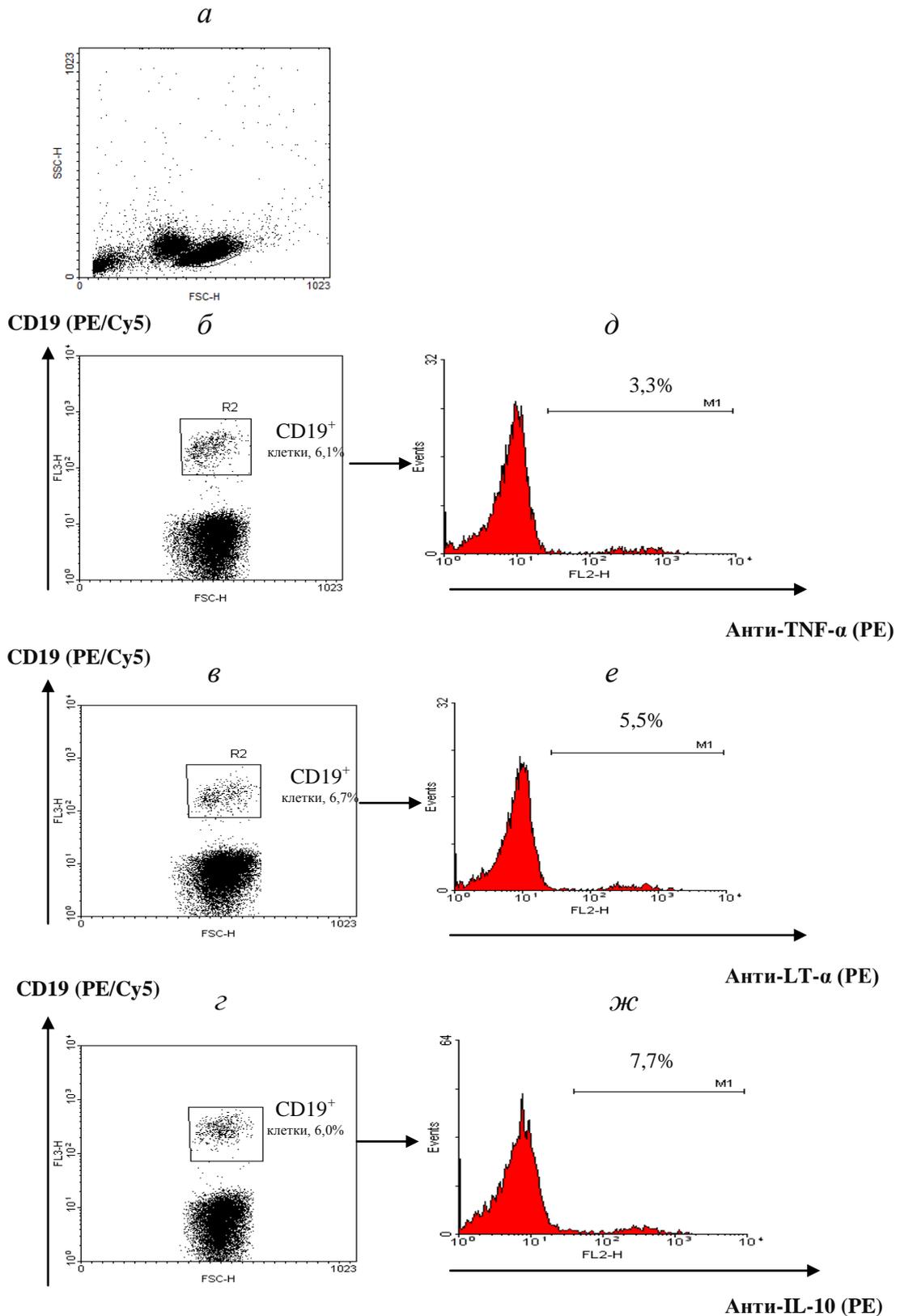


Рис. 2.9 (*а, б, в, г, д, е, ж*). Стратегия анализа результатов цитометрических исследований при оценке экспрессии цитокинов в популяции CD19<sup>+</sup> клеток (окрашенные пробы). Представлены данные одного из 22 аналогичных экспериментов.

На втором этапе в популяции CD19<sup>+</sup> клеток (прямоугольный гейт) (рис. 2.9б, 2.9в, 2.9г) определяли экспрессию конкретного цитокина (рис. 2.8в), для чего строили гистограмму: по оси абсцисс – экспрессия цитокина (анти-TNF- $\alpha$ -антитела мечены PE, анти-LT- $\alpha$ -антитела мечены PE, анти-IL-10-антитела мечены PE, FL2-H), по оси ординат – число клеток (рис. 2.9д – гистограмма для определения экспрессии цитокина TNF- $\alpha$ , рис. 2.9е – гистограмма для определения экспрессии цитокина LT- $\alpha$ , рис. 2.9ж – гистограмма для определения экспрессии цитокина IL-10).

#### **2.3.4.7. Оценка уровня растворимого семафорина**

Нами был оценен уровень не только мембранного, но и растворимого Sema4D (sSema4D) в плазме крови пациентов и супернатантах клеточных культур (спонтанный вариант и вариант с активатором), полученных по окончании 18-часового культивирования Т-лимфоцитов. Содержание sSema4D оценивали иммуноферментным методом (ИФА). ИФА был проведен с помощью соответствующего набора («ELISA Kit for Semaphorin 4D (SEMA4D)», Cloud-Clone Corp, USA). Использовался твердофазный вариант метода – Enzyme-linked immunosorbent assay) в соответствии с рекомендациями производителя. Твердофазным носителем являлся пластиковый 96-луночный планшет с прозрачным дном ячеек, что было необходимо для дальнейшего проведения фотометрии. Проводился двусайтовый вариант анализа, основанный на наличии у антигена более одного типа эпитопов. На внутренней поверхности лунок предварительно были фиксированы антитела к одному эпитопу человеческого sSema4D. Исследуемые образцы плазмы и супернатантов клеточных культур добавлялись в лунки, производилась инкубация в течение 2 часов при 37°C. К образцам добавлялись биотин-конъюгированные антитела (вторые антитела – к другому эпитопу антигена), специфичные к sSema4D (реагент А), производилась инкубация в течение 1 часа при 37°C с последующей 3-кратной отмывкой образцов. Далее была добавлена авидин-конъюгированная пероксидаза хрена (Реагент В). Производилась инкубация в течение 30 мин.

при 37°C с последующей 5-ти-кратной отмывкой образцов. Затем добавляется субстрат, расщепление которого дает цветную реакцию (образцы окрашивались в голубой цвет), производилась инкубация 15 минут при 37°C. Цветную реакцию останавливали стоп-реагентом (серной кислотой). Интенсивность желтой окраски была пропорциональна концентрации определяемого антигена, количеству связавшихся меченых антител (цветную реакцию давали образцы, содержащие sSema4D, биотин-конъюгированное антитело и фермент-конъюгированный Авидин). Измерялась оптическая плотность раствора в лунках спектрофотометром при длине волны  $450 \pm 10$  нм. Для пробы рассчитывалась величина  $B - B_0$ , где  $B$  – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу,  $B_0$  – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу «0 нг/мл». Был построен график зависимости оптической плотности в единицах оптической плотности от концентрации sSema4D в нг/мл. На основании калибровочной кривой рассчитывалась концентрация sSema4D в образцах плазмы и супернатантах клеточных культур.

### **2.3.5. Статистические методы, применяемые в исследовании**

Статистическая обработка данных исследования проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoftInc., USA). Для проверки статистических гипотез о виде распределения был применен критерий Шапиро-Уилка. Применялись непараметрические методы ввиду несоответствия данных закону нормального распределения и особенностей объема выборок в исследовании. Описательные характеристики количественных признаков представлены в виде медианы с верхней и нижней квартилью –  $Me$  (UQ;LQ). Качественные признаки подсчитаны по абсолютной частоте проявления признака и частоте его проявления в процентах. Сравнительный анализ полученных в ходе исследования количественных данных в 2-х независимых группах был выполнен с использованием  $U$  критерия Манна-Уитни. При сравнении частот

бинарных качественных признаков в двух независимых группах использованы критерий  $\chi^2$  и точный критерий Фишера. При сравнении 2-х зависимых групп использован критерий Вилкоксона. При сравнении количественных показателей в трех независимых группах проведен дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису (Kruskall-WallisANOVA) с последующим попарным сравнением групп с использованием критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ произведен с использованием рангового коэффициента Спирмена (R). При этом слабой корреляция считалась при значении  $R \leq 0,25$ , умеренной – при  $0,25-0,75$ , сильной – при  $\geq 0,75$ . Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. При значении p меньше 0,001, производили указание в формате  $p=0,000$ .

**ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РЕМИТТИРУЮЩИМ  
ТИПОМ ТЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА, НЕ ПОЛУЧАВШИХ  
ТЕРАПИЮ ПРЕПАРАТАМИ, ИЗМЕНЯЮЩИМИ  
ТЕЧЕНИЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

**3.1. Характеристика группы пациентов с рассеянным склерозом по клиническим показателям**

Нами проведено клиническое обследование пациентов с РС, не получавших ИМТ. Данная группа представлена 52 наивными пациентами с ремиттирующим типом течения РС. В исследование было включено 35 женщин (67,3%) и 17 мужчин (32,7%), в соотношении 2,1:1, в возрасте от 18 до 55 лет. Клиническая характеристика пациентов с РС представлена в табл. 3.1.

Таблица 3.1

**Клиническая характеристика пациентов с РС; Me [LQ;UQ]**

Показатели	Пациенты с РС (n=52)
Возраст на момент обследования (лет) Ж/М	29,00 (24,00; 37,50) 30,00 (23,00;39,00)/ 27,00 (24,00;36,00)
Пол (n) (Ж/М)	35/17
Возраст дебюта РС (лет)	25,00 (20,00;29,50)
Длительность первой ремиссии (мес.)	13,50 (6,00;48,00)
Количество обострений	2,50 (2,00;3,00)
Продолжительность заболевания (лет)	2,25 (1,00;6,50)
EDSS (баллы)	2,50 (2,00;4,00)
PI	0,43 (0,30;1,00)

Средний возраст пациентов на момент обследования составил 29,0 (24,0;37,5) лет. По возрасту пациенты были разделены нами на 3 группы (табл. 3.2):

- 1) 18-30 лет – 28 чел.;
- 2) 31-40 лет – 17 чел.;
- 3) 41-55 лет – 7 чел.

Таблица 3.2

**Распределение пациентов с РС по группам**

Выделенные группы градации показателей			Пациенты с РС (n=52)		Из всех пациентов с РС женщин/мужчин, (n)	Из всех пациентов с РС в стадии ремиссии/обострения, (n)
			n	%		
Возраст (лет)	1	18-30	28	53,8	18/10	21/7
	2	31-40	17	32,7	12/5	14/3
	3	41-55	7	13,5	5/2	6/1
Дебют РС (лет)	1	16-29	39	75,0	27/12	32/7
	2	≥30	13	25,0	8/5	9/4
Длительность первой ремиссии (лет)	1	≤ 1	29	55,8	21/8	20/9
	2	1-5	12	23,1	7/5	10/2
	3	≥ 5	11	21,2	7/4	11/0
Длительность заболевания (лет)	1	≤2	26	50,0	17/9	18/8
	2	2-5	11	21,2	7/4	8/3
	3	≥5	15	28,8	11/4	15/0
EDSS (балл)	1	1,5-2,0	24	46,2	17/7	21/3
	2	2,5-3,5	13	25	10/3	10/3
	3	4,0-5,5	15	28,8	8/7	10/5
Величина PI (для 33-х пациентов)	1	≤0,25	6	18,2	5/1	–
	2	0,25-0,75	16	48,5	11/5	–
	3	≥0,75	11	33,3	7/4	–

Средний возраст женщин составил 30 (23;39) лет, возраст мужчин - 27 (24;36) лет без значимой разницы (p=0,840).

Городскими жителями из числа обследуемых являлись 45 чел. (86,5%), жителями сельской местности – 7 чел. (13,5%). По уровню полученного

образования обследуемые распределялись следующим образом: 13 человек имели высшее образование (25%), 29 человек – средне-специальное (55,8%), 1 пациент – основное общее образование (1,9%). Студентами на момент обследования являлись 9 чел. (17,3%). Из всех обследуемых только 16 чел. (30,8%) имели группу инвалидности, из них 11 чел. - 3 группу (21,2%), 5 – 2 группу (9,6%). Работали 33 чел. (63,5%) из числа обследуемых, из них 7 чел. имели 3 группу инвалидности.

Наряду с диагнозом РС у части пациентов имела место сопутствующая патология (табл. 3.3), представленная как одной нозологической единицей, так и их сочетанием, не влиявшая, по нашему мнению, на течение заболевания.

Таблица 3.3

### Сопутствующие заболевания у пациентов с РС

Нозология	Количество пациентов (n)
1	2
хронический тонзиллит	3
закрытая черепно-мозговая травма по типу сотрясения головного мозга	3
симптоматическая эпилепсия с редкими первично-генерализованными приступами	1
хроническая герпетическая инфекция	2
Lues I (первичный сифилис) в анамнезе	1
вирусный гепатит В	1
головная боль напряжения	3
невротическое расстройство	3
гипертоническая болезнь I–III ст., 2-3 ст., риск 2-3	5
миопия I-III ст. обоих глаз	14
сложный миопический астигматизм	4
ангиопатия сетчатки обоих глаз	2
операция LASIK для коррекции миопии	2
гиперметропический астигматизм	1
центральный хореоретинит обоих глаз	1
дистрофия Штаргардта обоих глаз	1
периферическая дистрофия сетчатки обоих глаз	1
амблиопия I ст.	1
пресбиопия обоих глаз	1
хронический адгезивный отит	2

## Продолжение таблицы 3.3

1	2
хронический ринит	2
хронический мезотимпанит	1
полип правой верхнечелюстной пазухи	1
гемисинузит слева	1
нейросенсорная тугоухость	1
хронический гастродуоденит	3
язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки	2
хронический гастрит	3
эрозивный гастрит	1
эрозивный бульбит	1
рубцовая деформация двенадцатиперстной кишки	1
рефлюкс-эзофагит	1
дорсопатия пояснично-крестцового отдела	2
дорсопатия шейного отдела	1
кокцигодия	1
подагрический артрит	1
деформирующий полиостеоартроз	1
коксартроз компенсированный I ст.	1
удаление доброкачественного образования околоушной железы слева	1
перелом левой лодыжки	1
компрессионный перелом грудных и пояснично-крестцовых позвонков	1
хронический пиелонефрит	1
хронический простатит	1
бесплодие	1
поликистоз яичников	1
опсоменорея	1
синдром вегетативной дистонии	1
пролапс митрального клапана	1
нейтропения в анамнезе	1
логоневроз	1

Следует отметить, что хронический тонзиллит, считающийся довольно частым анамнестическим фактом для пациентов с РС [19, 20], встречался лишь у 3 (5,8%) пациентов из 52. Сезоном дебюта РС в обследуемой группе преимущественно явились весна (28,8%) и лето (25,0%), реже он был представлен зимой и осенью. В большинстве случаев провоцирующими

фактором развития своего заболевания пациенты считали значимый стресс (14 чел., 26,9%), что соответствует литературным данным [19, 31, 154]. Остальные факторы, в том числе в разных сочетаниях в порядке убывания, включали перенесенные ОРВИ перед дебютом РС, ЗЧМТ в виде сотрясения головного мозга, вакцинации против бешенства и гриппа, беременность и послеродовый период, частые рецидивы герпетической инфекции, переутомление, резкое снижение массы тела (как стрессовый фактор). Часть пациентов – 28 чел. (53,8%) – не могли предположить какой-либо провоцирующий фактор развития своего заболевания.

Интересным мы считаем обнаружение в выборке семейных случаев развития РС: четверо обследуемых (7,7% от числа наблюдений) указали на наличие родственников с аналогичной патологией (пары в виде родных сестер, отца-сына, матери-дочери, двоюродных сестер), что подтверждает вклад генетических факторов в развитие заболевания. Следует отметить, что все четверо пациентов характеризовались разными симптомами дебюта (сенсорные, мозжечковые, зрительные, пирамидные), разной продолжительностью 1-й ремиссии (6, 15, 60, 72 месяца) и разным возрастом дебюта заболевания (19, 24, 35, 36 лет).

Возраст дебюта РС у обследуемых варьировал от 16 до 49 лет с медианой 25,0 (20,0;29,5), на основании чего нами было выделено 2 группы пациентов – с ранней манифестацией заболевания и более поздним дебютом РС (табл. 3.2):

- 1) 16-29 лет;
- 2) 30 и более лет.

Возраст дебюта РС не отличался у женщин и мужчин ( $p=0,646$ ). Он имел положительные корреляционные связи умеренной силы с величиной EDSS ( $R=0,368$ ,  $p=0,007$ ), показателем FS8 передвижения ( $R=0,308$ ,  $p=0,026$ ), а также показателями FS5 Курцке чувствительности ( $R=0,505$ ,  $p=0,000$ ) и когнитивных функций ( $R=0,448$ ,  $p=0,000$ ).

Для удобства дальнейшего сопоставления клинических данных и иммунологических показателей пациенты также были разделены нами на 3 группы в зависимости от длительности первой ремиссии, 3 группы в зависимости от продолжительности заболевания, 3 группы по величине балла EDSS, 3 группы по величине скорости прогрессирования (progression index, PI) (табл. 3.2).

Количество обострений РС у пациентов в анамнезе к моменту обследования составило 2,5 (2,0;3,0), в диапазоне от 1 до 6, без отличий по половому признаку ( $p=0,295$ ) и от возраста дебюта ( $p=0,939$ ). Количество обострений не имело статистически значимых отличий в зависимости от продолжительности 1-й ремиссии ( $p=0,361$ ).

Продолжительность первой ремиссии, как важного проспективного фактора для оценки вероятности благоприятного прогноза заболевания [74], составила 13,5 (6,0;48,0) месяцев, без различий у женщин и мужчин ( $p=0,253$ ). Она варьировала от 1 месяца до 8 лет. Длительность первой ремиссии не отличалась в группах с более ранним дебютом РС и дебютом РС в возрасте  $\geq 30$  лет ( $p=0,920$ ). Продолжительность первой ремиссии не отличалась в группах, выделенных нами в зависимости от величины балла EDSS ( $p=0,721$ ).

Согласно одному из чаще всего используемых определений, течение РС можно назвать относительно доброкачественным при инвалидизации не более 3-х баллов по шкале EDSS по истечении как минимум 10 лет болезни [31]. Такими пациентами из числа обследуемых мы считали 3-х человек (5,8%).

Стоит отметить, что у части пациентов (6 чел., 11,5%) к моменту обследования имела место единственная клиническая эксацербация РС с разной давностью заболевания (от 6 мес. до 5 лет) и разным типом дебюта (многоочаговая симптоматика – 2 чел., ретробульбарный неврит – 2 чел., в остальных случаях сенсорные или пирамидные нарушения). Таким

пациентам диагноз РС был поставлен с учетом результатов повторной МРТ головного мозга.

Вид дебюта заболевания был представлен разнообразной симптоматикой. Однако преобладающими вариантами у наших пациентов являлись сенсорные нарушения и ретробульбарный неврит, которые считаются наиболее мягкими вариантами дебюта заболевания [31] (рис. 3.1).

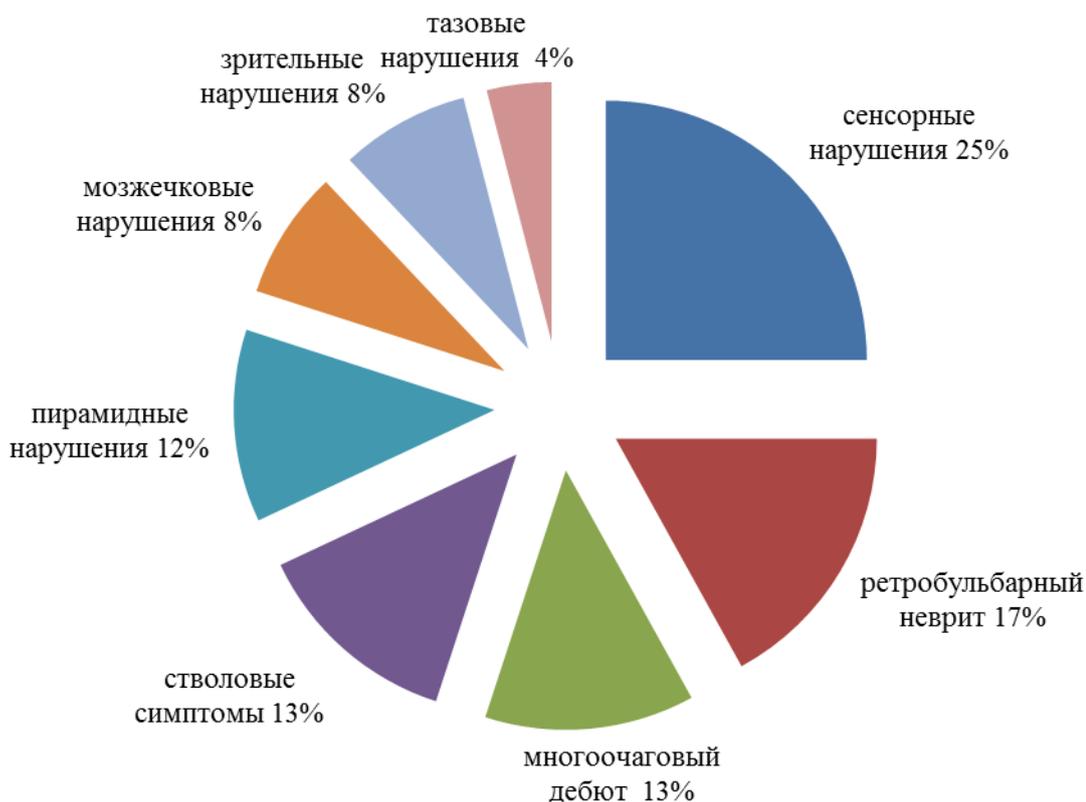


Рис. 3.1. Виды дебюта РС в обследуемой группе.

У представительниц женского пола ( $n=35$ ) дебют заболевания был чаще представлен сенсорными нарушениями ( $n=12$ ), ретробульбарным невритом ( $n=8$ ), другими зрительными нарушениями ( $n=4$ ) и лишь затем пирамидными, стволовыми и многоочаговыми, тазовыми нарушениями. У обследованных мужчин ( $n=17$ ) в дебюте присутствовали многоочаговые симптомы ( $n=4$ ), стволовые ( $n=4$ ), пирамидные ( $n=3$ ), мозжечковые ( $n=3$ ) и реже – ретробульбарный неврит ( $n=1$ ), тазовые и сенсорные нарушения (в обоих случаях  $n=1$ ), что также соответствует литературным данным о преобладании пирамидной симптоматики в мужской популяции пациентов с

РС [31]. Не отмечено различий в возрасте на момент дебюта в зависимости от симптомов дебюта ( $p=0,164$ ).

Что касается связи продолжительности 1-й ремиссии и вида дебюта РС (у тех лиц, у которых было фиксировано 2-ое обострение РС,  $n=46$ ), то не было обнаружено различия длительности 1-й ремиссии в месяцах при 4-х наиболее часто встречающихся видах дебюта ( $p=0,966$ ): для сенсорных нарушений она составила 12 (9;33), для ретробульбарного неврита – 12 (6;60), для стволовых – 24 (2;60) и для многоочаговых симптомов – 12 (6;24) месяцев.

Продолжительность болезни составила к моменту обследования 2,25 (1,00;6,50) лет, в интервале от 6 мес. до 24 лет и не отличалась у женщин и мужчин ( $p=0,761$ ).

Средний балл по шкале инвалидизации EDSS у обследуемых составил 2,5 (2,0;4,0) в пределах от 1,5 до 5,5 баллов. Выявлена положительная корреляция данного показателя умеренной силы с возрастом на момент обследования ( $R=0,516$ ,  $p=0,000$ ), возрастом дебюта ( $R=0,368$ ,  $p=0,007$ ), длительностью заболевания ( $R=0,370$ ,  $p=0,006$ ) и количеством обострений ( $R=0,411$ ,  $p=0,002$ ) (рис. 3.2).

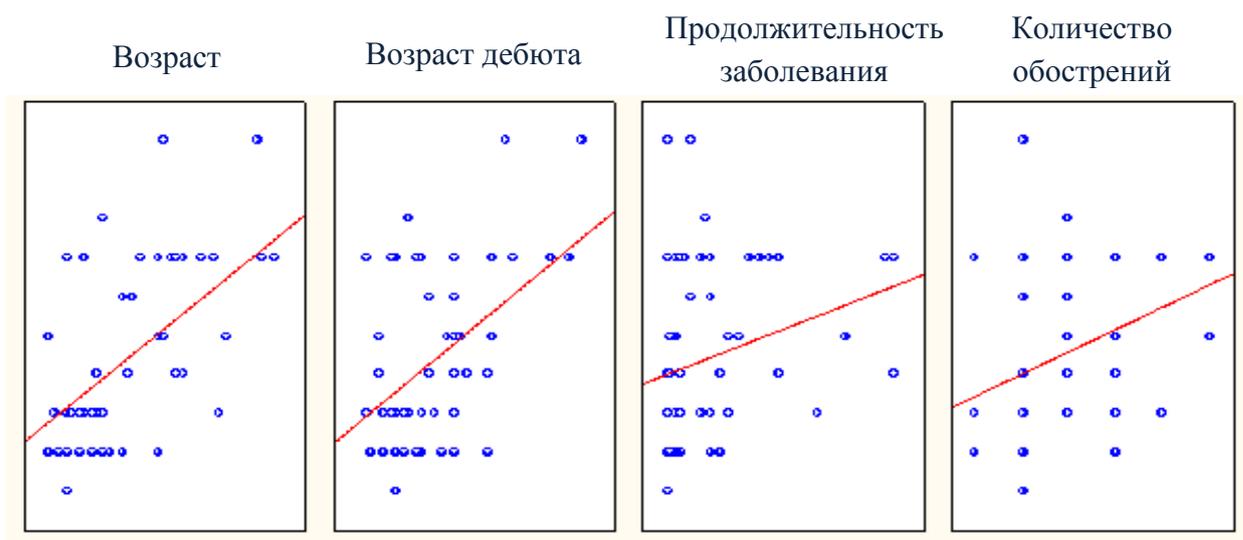


Рис. 3.2. Положительные корреляции уровня инвалидизации по шкале EDSS с клиническими характеристиками пациентов с РС.

Величины деления пациентов на группы по показателю EDSS были выбраны нами исходя из особенностей группы, включавших достаточно молодой контингент пациентов с ремиттирующим (самым ранним) типом течения заболевания с небольшой давностью, обозначая следующее:

- 1) 1,5-2,0 балла – расценено как легкая степень инвалидизации;
- 2) 2,5-3,5 балла – расценено как средняя степень инвалидизации;
- 3) 4,0-5,5 баллов – расценено как выраженная инвалидизация.

Уровень инвалидизации по шкале EDSS имел отличия в 3-х выделенных по возрасту на момент обследования группах (табл. 3.4) по тесту Краскела-Уоллиса.

Таблица 3.4

**Вариабельность уровня инвалидизации по шкале EDSS в зависимости от клинических характеристик пациентов с РС; Me [LQ;UQ]**

Группы сравнения		Уровень EDSS	p
Возраст (лет)	1 18-30 (n=28)	2,0 (1,5;2,3)	0,002 <sup>1</sup> 0,003 <sup>3</sup>
	2 31-40 (n=17)	3,0 (2,5;4,0)	
	3 41-55 (n=7)	4,0 (3,0;4,0)	
Дебют РС (лет)	1 16-29 (n=39)	2,0 (1,5;3,5)	0,017 <sup>1</sup>
	2 ≥30 (n=13)	4,0 (2,5;4,0)	
Длительность заболевания (лет)	1 ≤2 (n=26)	2,0 (1,5;2,5)	0,020 <sup>1</sup> 0,007 <sup>3</sup>
	2 2-5 (n=11)	3,5 (2,0;4,0)	
	3 ≥5 (n=15)	3,0 (2,5;4,0)	

Здесь и далее: 1–значимые различия между 1 и 2 группами  
 2 – значимые различия между 2 и 3 группами  
 3 – значимые различия между 1 и 3 группами

Значимые отличия в уровне инвалидизации по шкале EDSS были выявлены также и в зависимости от возраста дебюта РС и от длительности

заболевания (табл. 3.4). Не выявлено отличий в балле EDSS в зависимости от группы ранжирования длительности 1-й ремиссии ( $p=0,790$ ).

Произведен подсчет значений поражения нервной системы по 8 функциональным системам (FS), включая способность к ходьбе. Не выявлено отличий в показателях EDSS и FS у мужчин и женщин, за исключением показателя функций ствола мозга FS2 – 1 (0;1) у женщин и 1 (1;2) у мужчин ( $p=0,037$ ). Классический для РС симптом Лермитта [31], не учитываемый при подсчете балла FS5 чувствительности и суммарного балла EDSS, имел место у 3 человек (5,8%) из числа обследуемых. Атрофия зрительных нервов, влияющая на балл FS1 зрительных функций, подтвержденная осмотром офтальмолога, имела место у 5 чел. (9,6%).

Отмечены положительные корреляции FS с длительностью заболевания для пирамидной FS3 ( $R=0,276$ ,  $p=0,047$ ), мозжечковой FS4 ( $R=0,343$ ,  $p=0,012$ ), FS6 кишечника и мочевого пузыря ( $R=0,521$ ,  $p=0,000$ ). Корреляции этих же FS неврологического статуса отмечены и с суммарным количеством обострений в анамнезе у пациентов: пирамидной FS3 ( $R=0,283$ ,  $p=0,042$ ), мозжечковой ( $R=0,459$ ,  $p=0,000$ ), FS6 тазовых функций ( $R=0,509$ ,  $p=0,000$ ), а также FS8 передвижения ( $R=0,299$ ,  $p=0,032$ ).

Скорость прогрессирования заболевания (Progression index, PI), отражающую нарастание неврологического дефицита, определяли как отношение суммы показателей FS индивидуума к длительности заболевания в годах [60]. PI пациентов с РС составил 0,43 (0,30;1,00) для 33 из всей совокупности пациентов, что соответствует умеренной выраженности прогрессирования заболевания. При оценке данного показателя в подсчет не были включены пациенты в стадии ремиссии с длительностью заболевания год и менее ( $n=8$ ) и пациенты в периоде эксацербации болезни ( $n=11$ ), что считается некорректным ввиду получения в противном случае необоснованно высоких показателей [161].

Из общего числа наблюдений пациентов с РС ( $n=52$ ) было выделено 2 подгруппы пациентов по стадии заболевания:

- 1) пациенты в стадии ремиссии РС (n=41);
- 2) пациенты в стадии обострения РС (n=11).

Распределение лиц в стадии ремиссии и обострения в группах возраста на момент обследования, дебюта РС, длительности первой ремиссии, продолжительности заболевания, величине балла EDSS и их клинические характеристики представлен в табл. 3.5.

Таблица 3.5

**Клиническая характеристика пациентов в стадии ремиссии и обострения РС; Me [LQ;UQ]**

Показатели	Количество обследованных лиц (n=52)		p
	Пациенты с РС в стадии ремиссии (n=41)	Пациенты с РС в стадии обострения (n=11)	
Возраст на момент обследования (лет)	30,0 (24,0;38,0)	26,0 (23,0;37,0)	0,452
Ж/М	30,5 (24,0;39,0)/ 27,0 (24,0;38,0)	26,0 (22,0;37,0)/ 25,5 (24,0;31,0)	0,541/ 0,651
Возраст дебюта РС (лет)	26,0 (20,0;29,0)	24,0 (21,0;37,0)	0,500
Ж/М	26,5 (20;29)/ 24,0 (20,0;34,0)	25,0 (21,0;37,0)/ 24,0 (22,0;31,0)	0,636/ 0,544
Длительность первой ремиссии (мес.)	21,0 (12,0;60,0)	6,0 (2,0;12,0)	0,007*
Количество обострений	3,0 (2,0;4,0)	2,0 (2,0;3,0)	0,520
Продолжительность заболевания (лет)	4,0 (1,5;8,0)	1,0 (0,5;2,5)	0,005*
EDSS	2,0 (1,5;3,5)	3,0 (2,0;4,5)	0,036*

Здесь и далее: \* – значимые различия между группами

При анализе относительных частот распределений данных с использованием таблиц расхождения нами выявлено отличие в количестве пациентов по продолжительности заболевания более 5 лет (15 человек в

стадии ремиссии и ни одного с такой длительностью в стадии обострения,  $p=0,022$ ).

Пациенты не отличались в группах ремиссии РС и обострения РС по наличию или отсутствию работы ( $\chi^2$   $p=0,390$ , двусторонний критерий Фишера  $p=0,497$ ), а также по соотношению в группах женщин и мужчин – 30 женщин и 11 мужчин в стадии ремиссии, 5 женщин и 6 мужчин в стадии обострения РС ( $\chi^2$ :  $p=0,082$ , 2-сторонний критерий Фишера:  $p=0,145$ ). Установлено, что пациенты в стадии обострения РС имели меньшую продолжительность первой ремиссии и меньшую продолжительность болезни, но более высокий балл EDSS (табл. 3.5).

У 11 пациентов с обострением РС на момент обследования симптоматика была представлена сенсорными нарушениями (3 чел., 27,3%), многоочаговой симптоматикой (2 чел., 18,2%) и по 1 случаю (по 9,1%) включала ретробульбарный неврит, вертиго, пирамидную, стволовую симптоматику, зрительные и тазовые нарушения. Подробные отличия пациентов в стадии ремиссии и обострения по FS неврологического статуса представлены в табл. 3.6.

Таблица 3.6

**Показатели функциональных систем (FS) и уровня инвалидизации по шкале EDSS у пациентов в стадии ремиссии и обострения РС;  
Me [LQ;UQ]**

Показатели	Пациенты с РС в стадии ремиссии (n=41)	Пациенты с РС в стадии обострения (n=11)	p
1	2	3	4
FS1 (зрительные функции)	0 (0;0)	0 (0;0)	0,623
FS2 (функции ствола мозга)	1,0 (1,0;1,0)	1,0 (1,0;2,0)	0,216
FS3 (пирамидные функции)	2,0 (1,0;2,0)	2,0 (1,0;3,0)	0,661

Продолжение таблицы 3.6

1	2	3	4
FS4 (мозжечковые функции)	2,0 (1,0;2,0)	2,0 (1,0;3,0)	0,541
FS5 (сенсорные функции)	0 (0;2,0)	2,0 (0;3,0)	0,014*
FS6 (функции кишечника и мочевого пузыря)	0 (0;2,0)	0 (0;2,0)	0,638
FS7 (мыслительные функции)	0 (0;1,0)	1,0 (0;2,0)	0,074
FS8 (передвижение, ambulation score)	1,0 (0;1,0)	1,0 (1,0;2,0)	0,028*
EDSS, балл	2,0 (1,5;3,5)	3,0 (2,0;4,5)	0,036*

Можно заключить, что принципиальный вклад в различие в степени инвалидизации данных подгрупп пациентов внесли выраженность сенсорных расстройств, а также значимых ограничений в ходьбе (показатель FS8, «Передвижение», Ambulation score).

### **3.2. Особенности нейровизуализационных данных в обследованной группе**

Всем 52 пациентам для подтверждения диагноза проводилась МРТ головного мозга на томографе мощностью 1,5 Тесла в условиях г. Перми, Ижевска, Екатеринбурга. Следует отметить, что пациентам для уточнения диагноза, отслеживания течения болезни проводились неоднократные МРТ головного мозга – единожды (21 чел, 40,4%), дважды (25 чел., 48,1%), трижды (4 чел., 7,7%) и четырежды (2 чел., 3,8%).

Возникали и случаи дифференциальной диагностики по данным МРТ, что не является редкостью в клинической практике [122]. В частности, при псевдотуморозном дебюте РС у мужчины 35 лет лишь дальнейшие исследования прояснили ошибочную интерпретацию первоначальных

данных. В другом случае у пациента мужского пола 21 года после развития симптомокомплекса Броун-Секара были обнаружены изменения на уровне шейного отдела спинного мозга (С2-С3), которые трактовались как новообразование, однако выполнение МРТ головного мозга позволило оценить клиническую картину в отличной плоскости и установить верный клинический диагноз.

Для оценки МРТ-активности заболевания в данном наблюдении во внимание принимались данные последней томографии. Последняя МРТ головного мозга проводилась в диапазоне от 1 до 1061 дней, медиана 95 (65;149) дней, перед клинико-лабораторным обследованием пациентов, при этом у пациентов в стадии ремиссии – в диапазоне от 14 до 1061 дней, медиана 104 (81;152) дня, у пациентов в стадии обострения – от 1 до 146 дней, медиана 5 (4;21) дней,  $p=0,000$ .

Количество описываемых радиологами очагов демиелинизации варьировало. Можно выделить следующие градации количества очагов по данным МРТ, конечно, условные:  $\geq 9$  очагов демиелинизации представлено у 13 пациентов,  $\geq 20$  очагов – у 37 пациентов. У одной из пациенток в фазе ремиссии описано 40 очагов демиелинизации, у другой в фазе обострения – до 72 очагов демиелинизации на МРТ.

Активность РС по данным МРТ головного мозга была выявлена у 20 из 35 чел., которым вводился контрастный препарат (57,1% от числа исследований проведено с введением контрастного препарата). Следует отметить, что частота введения контраста при проведении МРТ в группах ремиссии и обострения не отличалась: введен контраст 28 из 41 пациента в ремиссию и 7 из 11 пациентов в обострение ( $\chi^2$ :  $p=0,770$ , 2-сторонний критерий Фишера:  $p=1,000$ ). Количество контрастируемых очагов составило 1 (0;4), варьируя от 0 до 23, при этом оно отличалось в группах ремиссии 0,5 (0;2,0) и обострения 4,0 (2,0;10,0),  $p=0,026$ , и не имело отличий в группе пациентов с РС среди женщин 1 (0;4) и мужчин 2 (0;4),  $p=0,844$ . Контрастируемые субтенториальные очаги представлены у 4 пациентов.

Преимущественный тип накопления контрастного препарата – изолированный диффузный (10 чел.), отражающий свежую активность заболевания [31], в том числе у 7 пациентов в клинической ремиссии, что соответствует литературным данным о сохранении активности процесса в данную стадию РС [31]. Типы накопления контраста представляли из себя сочетание диффузного и кольцевидного накопления (7 случаев), диффузного, кольцевидного и полукольцевидного (2 случая), кольцевидного и полукольцевидного (1 случай). Кольцевидное накопление контрастного препарата отражает, как известно, несвежую активность демиелинизирующего процесса [31].

Двенадцати пациентам с РС проведена также МРТ спинного мозга (в 7-ми случаях с использованием контрастного препарата) с выявлением у 10-ти из обследованных очагов демиелинизации на разных уровнях (С2-С7, Th1-Th4, Th6-Th7, Th10-Th11), в том числе с признаками активности демиелинизирующего процесса в 4-х случаях.

При МРТ-обследовании убедительные признаки атрофии мозга описаны у 6-ти пациентов, очаги в сером веществе – у одного. У одной пациентки описана аномалия по типу платибазии по данным МРТ.

### **3.3. Показатели когнитивного тестирования и психометрических шкал у пациентов с рассеянным склерозом**

#### **Слуховой тест на сложение в заданном темпе PASAT-3**

Количество правильных ответов в трехсекундном слуховом тесте PASAT в группе пациентов с РС составило 44,0 (37,0;53,0), в то время как в группе контроля – 49,0 (45,5;52,0), без значимых отличий ( $p=0,209$ ) (табл. 3.7).

**Результаты когнитивного и психометрического тестирования пациентов с РС и здоровых доноров; Me [LQ;UQ]**

Показатели (баллы)		Пациенты с РС	Здоровые доноры	p
PASAT		44,0 (37,0;53,0) (n=39)	49,0 (45,5;52,0) (n=12)	0,209
Госпитальная шкала тревоги и депрессии	тревога	7,5 (5,0;10,0) (n=40)	4,5 (2,5;5,0) (n=12)	0,004*
	депрессия	4,5 (2,0;7,0) (n=40)	3,5 (3,0;6,0) (n=12)	0,541
MFI-20	общая астения	11,0 (8,5;15,5) (n=40)	11,0 (9,5;13,0) (n=12)	0,578
	физическая астения	11,0 (8,0;13,0) (n=40)	8,0 (7,0;11,0) (n=12)	0,221
	снижение мотиваций	9,0 (8,0;12,5) (n=40)	10,0 (9,0;11,5) (n=12)	0,947
	пониженная активность	11,0 (5,5;14,5) (n=40)	12,0 (8,0;13,0) (n=12)	0,844
	психическая астения	8,5 (5,5;11,5) (n=40)	7,0 (5,0;12,0) (n=12)	0,585
	общий балл	53,0 (35,0;68,0) (n=40)	52,5(45,0;53,5) (n=12)	0,551

Не выявлены отличия в выполнении этого теста пациентами с РС в зависимости от пола ( $p=0,522$ ) и занятости ( $p=0,223$ ). Показатели теста также не отличались в группах с разными значениями возраста на момент обследования ( $p=0,562$ ), продолжительности заболевания ( $p=0,312$ ), балла EDSS ( $p=0,347$ ), и скорости прогрессирования ( $p=0,701$ ) при анализе по Краскел-Уоллису.

Выявлены отрицательная корреляционная связь между результатом теста PASAT-3 и показателем FS4 мозжечковых функций ( $R=-0,332$ ,  $p=0,039$ ) и слабая положительная – с показателем общего благополучия по шкале FAMS ( $R=0,374$ ,  $p=0,025$ ). При сопоставлении результатов этого вида

когнитивного обследования пациентов в стадии ремиссии и обострения РС отличий выявлено не было ( $p=0,198$ ).

### **Психометрическое тестирование**

#### ***Госпитальная шкала тревоги и депрессии***

Госпитальная шкала тревоги и депрессии у пациентов с РС представлена показателем 7,5 (5,0;10,0) по шкале тревоги и 4,5 (2,0;7,0) по шкале депрессии. Таким образом, у пациентов с РС отмечен уровень тревоги на уровне субклинической, что превышает таковой у здоровых лиц (табл. 3.7). Не выявлено отличий в уровне тревоги и депрессии у мужчин и женщин ( $p=0,276$ ), работающих и неработающих лиц ( $p=0,875$ ). Показатель тревоги не зависел от градации пациентов по возрасту ( $p=0,554$ ), продолжительности заболевания ( $p=0,638$ ), но отличался в группах EDSS по критерию Краскел-Уоллиса ( $p=0,033$ ). Различия были выражены между пациентами со степенью инвалидизации  $\leq 2$  баллов (6,0;5,0-9,5) и  $\geq 4$  баллов (9,0;8,0-12,0),  $p=0,017$ , а также между пациентами со степенью инвалидизации 2,5-3,5 балла (4,5;3,0-10,0) и  $\geq 4$  баллов (9,0;8,0-12,0),  $p=0,037$ . Таким образом, по нашим данным, тревога преобладала у пациентов с большей выраженностью степени инвалидизации.

Показатели депрессии не различались в группах, выделенных по возрасту ( $p=0,835$ ) и продолжительности заболевания (0,226). Были выражены отличия в уровне депрессии между пациентами со степенью инвалидизации  $\leq 2$  баллов (3,0;1,0-6,0) и  $\geq 4$  баллов (7,5;4,0-9,0),  $p=0,014$ . Группе пациентов с большей степенью инвалидизации была свойственна и большая выраженность депрессии.

Показатель тревоги коррелировал с показателем EDSS ( $R=0,336$ ,  $p=0,034$ ), пирамидной FS3 ( $R=0,341$ ,  $p=0,031$ ), мозжечковой F4 ( $R=0,406$ ,  $p=0,009$ ), FS6 кишечника и мочевого пузыря ( $R=0,444$ ,  $p=0,004$ ), FS8 передвижения ( $R=0,332$ ,  $p=0,036$ ) и скоростью прогрессирования ( $R=0,455$ ,  $p=0,022$ ).

Количество баллов по показателю депрессии (госпитальная шкала тревоги и депрессии) положительно коррелировало с количеством обострений ( $R=0,378$ ,  $p=0,016$ ), величиной балла EDSS ( $R=0,475$ ,  $p=0,002$ ), стволовой FS2 ( $R=0,433$ ,  $p=0,005$ ), пирамидной FS3 ( $R=0,409$ ,  $p=0,008$ ), мозжечковой FS4 ( $R=0,474$ ,  $p=0,002$ ), FS6 кишечника и мочевого пузыря ( $R=0,359$ ,  $p=0,023$ ) и FS8 передвижения ( $R=0,423$ ,  $p=0,006$ ) (рис. 3.3).

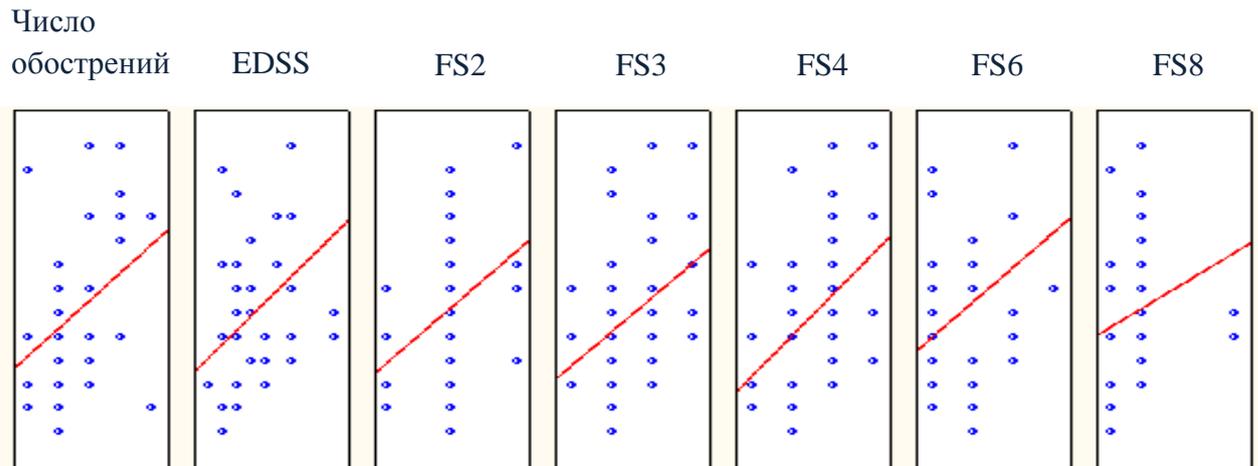


Рис. 3.3. Положительные корреляции показателя депрессии (шкалы госпитальной шкалы тревоги и депрессии) с клиническими характеристиками пациентов.

### ***Шкала MFI-20***

При проведении исследования выраженности астении по тесту MFI-20 проводился подсчет баллов по пяти шкалам: общая астения, пониженная активность, снижение мотиваций, физическая астения, психическая астения. Как и в случае с показателем депрессии, не отмечено различий в показателях теста MFI-20 в группах РС и контроля по всем шкалам (табл. 3.7).

Не выявлено отличий в общем показателе MFI-20 в зависимости от пола ( $p=0,988$ ) и занятости пациентов ( $p=0,660$ ).

Имели место отличия в 3-х возрастных группах по показателю «Физическая астения» ( $p=0,012$ ), в частности, между 1-ой (9,0;6,0-12,0) и 3-ей (15,0;13,0-17,5) возрастными группами,  $p=0,007$ , а также между 2-ой (11,5;9,0-13,0) и 3-ей (15,0;13,0-17,5) возрастными группами,  $p=0,028$ . Показатель «Физическая астения» MFI-20 был выше в группе пациентов с

наибольшей длительностью заболевания – 12,5 (11,0;13,0), нежели в 1-ой (9,0;5,0-11,0),  $p=0,032$  и 2-ой (12,0;10,0-13,5),  $p=0,045$  группах продолжительности заболевания. Отмечены различия большинства показателей шкалы MFI-20 в 3-х группах в зависимости от величины балла EDSS (табл. 3.8).

Таблица 3.8

**Различия показателей теста MFI-20 зависимости от уровня инвалидизации по шкале EDSS; Me [LQ;UQ]**

Шкалы теста MFI-20	Группы по величине балла EDSS			p
	1 (1,5-2,0 балла) n=20	2 (2,5-3,5 балла) n=10	3 (4,0-5,5 баллов) n=10	
Общая астения	9,0 (7,5;12,5)	14,0 (12,0;15,0)	13,0 (11,0;16,0)	0,018 <sup>1</sup> 0,039 <sup>3</sup>
Физическая астения	8,0 (5,5;11,0)	12,0 (10,0;13,0)	13,5 (11,0;15,0)	0,011 <sup>1</sup> 0,001 <sup>3</sup>
Снижение мотиваций	8,0 (8,0;12,0)	10,0 (8,0;12,0)	12,0 (10,0;13,0)	0,026 <sup>3</sup>
Пониженная активность	6,5 (5,0;9,5)	13,5 (12,0;15,0)	14,0 (13,0;15,0)	0,007 <sup>1</sup> 0,013 <sup>3</sup>
Психическая астения	6,0 (5,0;10,5)	10,0 (8,0;12,0)	12,0 (6,0;14,0)	–

Выявлены положительные корреляции показателя «Физическая астения» с возрастом пациентов ( $R=0,357$ ,  $p=0,023$ ), количеством обострений ( $R=0,408$ ,  $p=0,008$ ). С количеством обострений были также связаны показатели «Пониженная активность» ( $R=0,332$ ,  $p=0,035$ ,) и «Психическая астения» ( $R=0,355$ ,  $p=0,024$ ). Все без исключения подшкалы данного теста коррелировали с величиной EDSS: «Общая астения» ( $R=0,470$ ,  $p=0,002$ ), «Физическая астения» ( $R=0,685$ ,  $p=0,000$ ), «Снижение мотиваций» ( $R=0,449$ ,  $p=0,003$ ), «Пониженная активность» ( $R=0,611$ ,  $p=0,000$ ), «Психическая астения» ( $R=0,362$ ,  $p=0,021$ ).

**Тест MSIS-29**

Отличий по показателю физического компонента шкалы MSIS-29 между группами ремиссии и обострения не выявлено – 33,0 (24,0;41,0) и 41,5 (33;56,5),  $p=0,067$ . Не обнаружено гендерных отличий в выполнении теста MSIS-29 пациентами и в зависимости от наличия работы. Пациенты имели большие показатели по шкале влияния РС в старших возрастных группах и при возрастании продолжительности заболевания (табл. 3.9).

Таблица 3.9

**Показатели теста MSIS-29 в зависимости от клинических характеристик пациентов с РС; Me [LQ;UQ]**

Группы сравнения			Физический компонент	Психический компонент	Общий балл
Возраст (лет)	1 n=21	18-30	29,0 (24,0;33,0)	16,0 (12,0;22,0)	47,0 (39,0;54,0)
	2 n=14	31-40	41,5 (30,0;52,0)	19,5 (14,0;23,0)	57,0 (49,0;81,0)
	3 n=4	41-55	56,5 (33,5;72,0)	21,5 (16,5;28,0)	78,0 (51,5;98,5)
			$p=0,043^1$ $p=0,041^3$	–	$p=0,042^1$
Длительность заболевания (лет)	1 n=21	$\leq 2$	31,0 (24,0;34,0)	14,0 (12,0;17,0)	47,0 (36,0;54,0)
	2 n=8	2-5	39,0 (24,5;54,0)	21,5 (20,0;22,5)	62,5 (51,5;76,0)
	3 n=10	$\geq 5$	21,0 (14,0;27,0)	21,0 (14,0;27,0)	57,0 (42,0;81,0)
			–	$p=0,015^1$	$p=0,025^1$

В группах с ранним ( $n=10$ ) и более поздним ( $n=29$ ) возрастом дебюта РС показатели шкалы физического ( $p=0,114$ ) и психического компонентов ( $p=0,439$ ) шкалы влияния РС MSIS-29 не отличались.

В группах, выделенных по величине балла EDSS, отмечены различия по общему баллу MSIS-29. Показатели как физического, так и психического состояния, а также общий балл по шкале MSIS-29 возрастают при увеличении балла EDSS (рис. 3.4).

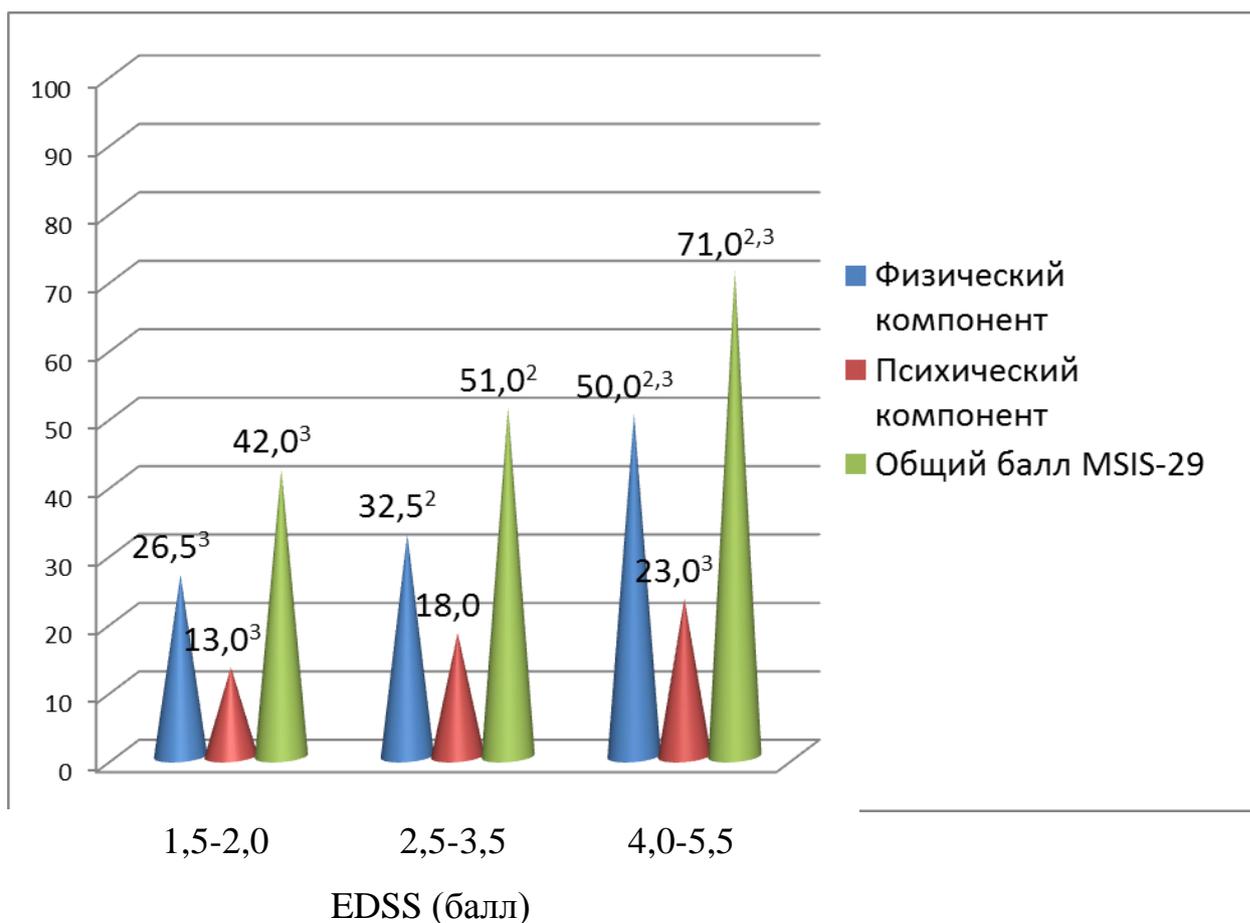


Рис. 3.4. Динамика показателей шкалы MSIS-29 (Me) у пациентов с РС в зависимости от величины балла EDSS.

Выявлены положительные корреляции значения физического состояния по шкале MSIS-29 с возрастом пациентов ( $R=0,330$ ,  $p=0,039$ ). Как физическая ( $R=0,556$ ,  $p=0,000$ ), так и психическая ( $R=0,500$ ,  $p=0,001$ ) составляющая теста MSIS-29, а также общий балл по данной шкале ( $R=0,555$ ,  $p=0,000$ ) имели положительную корреляционную связь с количеством обострений. Аналогичные корреляции прослежены и с баллом EDSS: физическая ( $R=0,680$ ,  $p=0,000$ ), психическая ( $R=0,521$ ,  $p=0,000$ ) составляющая, общий балл ( $R=0,683$ ,  $p=0,000$ ).

### ***Шкала FAMS***

Для уточнения пациентами субъективной оценки своего состояния и влияния демиелинизирующего заболевания на их физические,

психологические и социальные функции был использован известный опросник FAMS [9], включающий несколько разделов.

Тест FAMS по пункту «Симптомы» выявил половые различия – в группе женщин 23,0 (20,0;25,0) и в группе мужчин 26,5 (20,0;28,0),  $p=0,028$ , что указывает на то, что в данной выборке пациентов качество жизни женщин по данному показателю было ниже. Работающие ( $n=25$ ) и неработающие лица ( $n=14$ ) не отличались по общему показателю качества жизни ( $p=0,548$ ). Лица с инвалидностью (2, 3 группа) и без нее не имели отличия по общему баллу качества жизни (по Краскел-Уоллису),  $p=0,067$ . Но по показателю «Мышление и утомляемость» выявлены отличия при сравнении лиц со 2, 3 группой инвалидности и без нее ( $p=0,032$ ), особенно между пациентами без группы инвалидности, у которых качество жизни в этом аспекте было выше – 29,0 (24,0;34,0), нежели у пациентов с 3 группой инвалидности – 21,5 (16,0;25,0),  $p=0,015$ . Данные группы различались также по показателю «Общее благополучие» ( $p=0,020$ ). По показателям шкал теста FAMS «Подвижность», «Симптомы», «Эмоциональное благополучие» и «Семейное и социальное благополучие» обследуемые лица не имели отличий в зависимости от наличия группы инвалидности.

Медиана значения общего показателя качества жизни по селективной для пациентов с РС шкале FAMS составила 131 (110;151) балл, при максимально принятом возможном значении 176 баллов (в подсчет не включали дополнительные вопросы). При этом не отмечено различия в результатах между группами ремиссии ( $n=31$ ) и обострения ( $n=9$ ) (рис. 3.5., табл. 3.10).

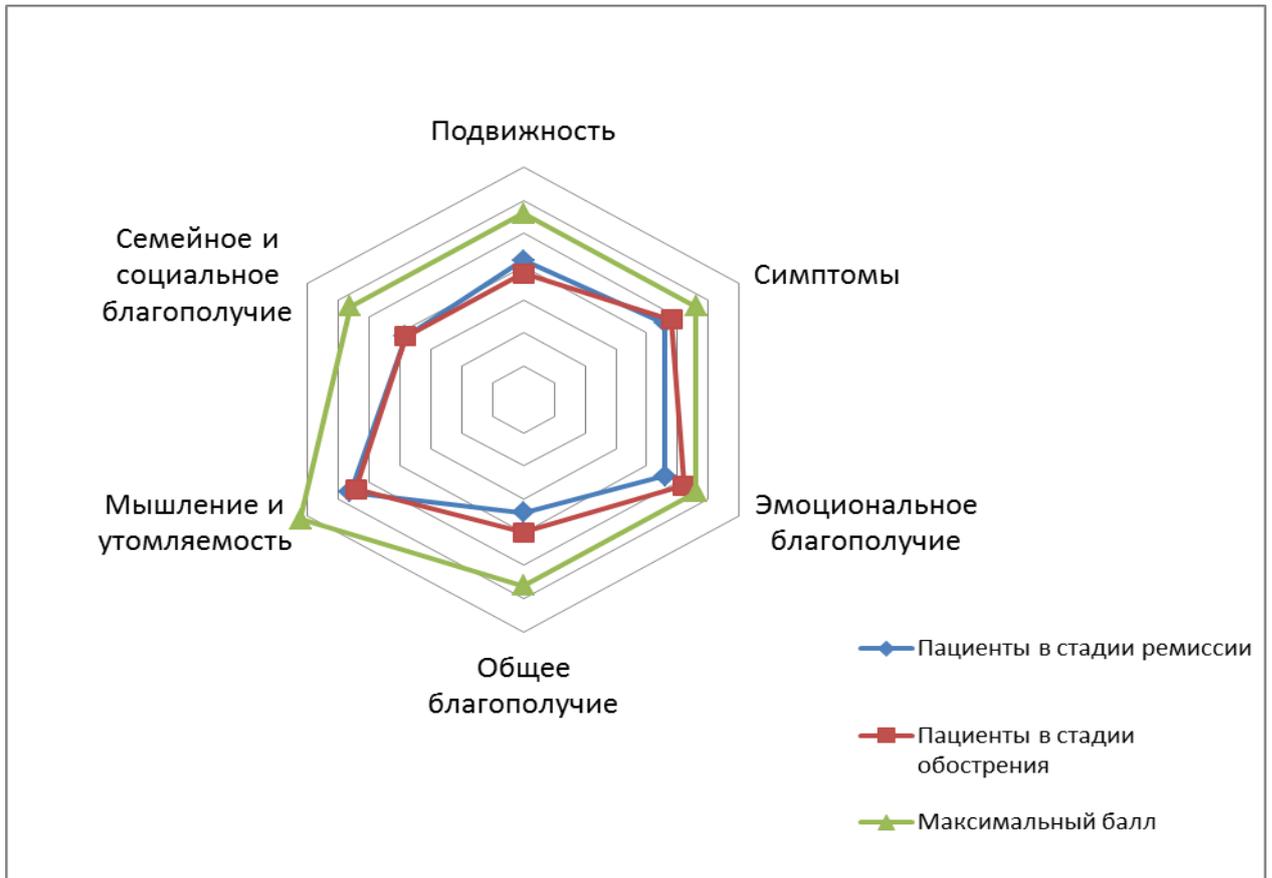


Рис. 3.5. Показатели качества жизни по шкале FAMS (Me) у пациентов с РС в стадии ремиссии и обострения в сравнении с контрольными значениями.

Таблица 3.10

**Результаты когнитивного и психометрического тестирования пациентов с РС в стадии ремиссии и обострения; Me [LQ;UQ]**

Показатели		Пациенты с РС (ремиссия)	Пациенты с РС (обострение)	p
1		2	3	4
PASAT-3		44 (35;50) (n=31)	50,5 (40,5;53,5) (n=8)	0,198
Госпитальная шкала тревоги и депрессии	Тревога	8 (5;10) (n=31)	7 (4;8) (n=9)	0,484
	Депрессия	5 (2;8) (n=31)	4 (4;6) (n=9)	0,871
MFI 20	Общая астения	12 (9;16) (n=31)	11 (8;14) (n=9)	0,526
	Физическая астения	11 (8;13) (n=31)	11 (9;13) (n=9)	0,580
	Снижение мотиваций	9 (8;13) (n=31)	11 (8;12) (n=9)	0,693

Продолжение таблицы 3.10.

1	2	3	4	
	Пониженная активность	10 (5;14) (n=31)	14 (8;15) (n=9)	0,216
	Психическая астения	9 (6;11) (n=31)	6 (4;15) (n=9)	0,660
MSIS-29	Физический компонент	33 (24;41) (n=31)	41,5 (33;56,5) (n=8)	0,067
	Психический компонент	19 (13;23) (n=31)	16,5 (13,5;20) (n=8)	0,519
	Общий балл	49 (39;64) (n=31)	57,5 (46,5;76) (n=8)	0,230
FAMS	Подвижность	21 (19;25) (n=31)	19 (12;24,5) (n=8)	0,589
	Симптомы	23(19;25) (n=31)	24 (21,5;25,5) (n=8)	0,575
	Эмоциональное благополучие	23 (18;26) (n=31)	26 (18;26,5) (n=8)	0,302
	Общее благополучие	17 (13;22) (n=31)	20 (16;24,5) (n=8)	0,304
	Мышление и утомляемость	28 (19;32) (n=31)	27 (20;35) (n=8)	0,651
	Семейное и социальное благополучие	19 (15;23) (n=31)	19 (13,5;25) (n=8)	0,944
	Общий балл	129 (110;151) (n=31)	135 (107;155) (n=8)	0,566

Нами проведена оценка показателя качества жизни при распределении пациентов по группам возраста, продолжительности заболевания и величине балла EDSS, выявляющая его вариабельность с течением заболевания преимущественно по шкалам «Подвижность» и «Симптомы» и не отличающаяся по пунктам «Семейное и социальное благополучие» и «Эмоциональное благополучие». Значимых отличий в группах возраста пациентов по общему показателю качества жизни по шкале FAMS выявлено не было ( $p=0,067$ ), однако он также имел тенденцию к уменьшению с увеличением возраста пациентов. Учитывая отсутствие значимых различий разделов опросника качества жизни между 2 и 3 группами EDSS мы

предполагаем, что с нарастанием уровня инвалидизации разница в субъективной оценке пациентами качества жизни сглаживается.

Выявлена отрицательная корреляция показателя «Подвижность» по шкале FAMS ( $R=-0,387$ ,  $p=0,014$ ), а также показателя «Симптомы» по шкале FAMS ( $R=-0,333$ ,  $p=0,037$ ) с возрастом пациентов. Обнаружена отрицательная корреляционная связь между показателями «Подвижность» ( $R=-0,571$ ,  $p=0,000$ ), «Симптомы» ( $R=-0,364$ ,  $p=0,022$ ), «Мышление и утомляемость» ( $R=-0,334$ ,  $p=0,037$ ), общим баллом FAMS ( $R=-0,325$ ,  $p=0,043$ ) и количеством обострений у пациентов с РС. Величина балла EDSS имела отрицательную корреляционную связь с показателями подшкал «Подвижность» ( $R=-0,747$ ,  $p=0,000$ ), «Симптомы» ( $R=-0,453$ ,  $p=0,003$ ), «Эмоциональное благополучие» ( $R=-0,411$ ,  $p=0,009$ ), «Общее благополучие» ( $R=-0,518$ ,  $p=0,000$ ), «Мышление и утомляемость» ( $R=-0,524$ ,  $p=0,000$ ) и общим баллом FAMS ( $R=-0,606$ ,  $p=0,000$ ) (рис. 3.6).

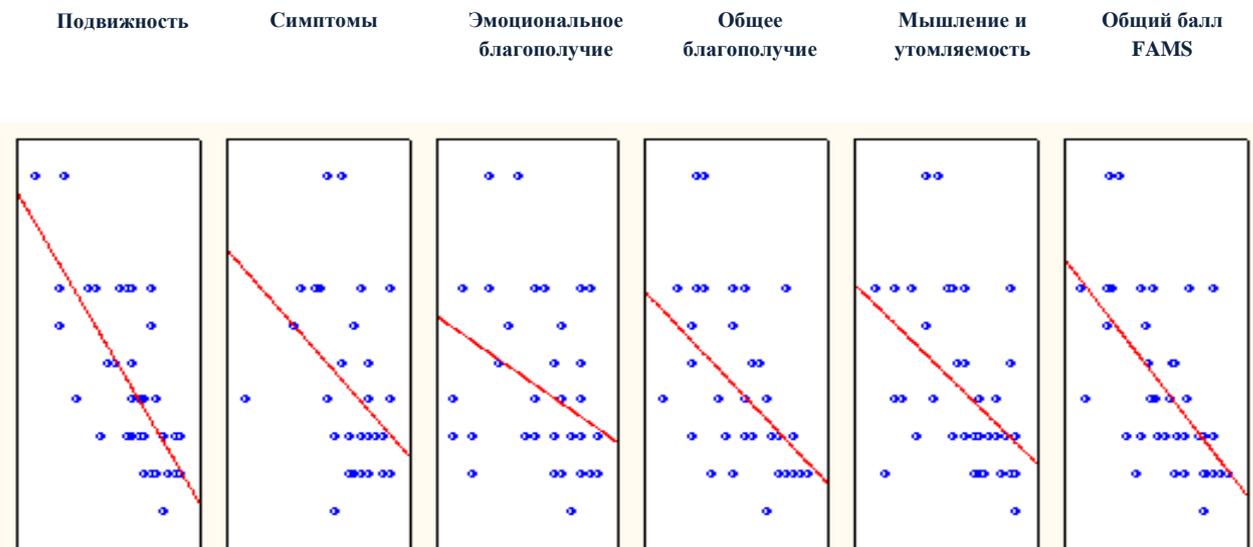


Рис. 3.6. Отрицательные корреляции показателя инвалидизации по шкале EDSS с подшкалами теста для оценки качества жизни пациентов с рассеянным склерозом FAMS.

Отмечено множество корреляций среди значений психометрического тестирования пациентов. Ниже мы приводим пример только статистически

высокозначимые корреляции показателей психометрических шкал у пациентов с РС между собой (табл. 3.11).

Таблица 3.11

**Значимые корреляции психометрических шкал ( $p=0,000$ )**

Показатели		R
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Тревога)	Психическая астения (MFI-20)	0,528
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Тревога)	Снижение мотивации (MFI-20)	0,665
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Тревога)	Психический компонент (MSIS-29)	0,620
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Тревога)	Мышление и утомляемость (FAMS)	0,544
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Депрессия)	Психическая астения (MFI-20)	0,522
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Депрессия)	Снижение мотивации (MFI-20)	0,646
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Депрессия)	Психический компонент (MSIS-29)	0,764
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Депрессия)	Мышление и утомляемость (FAMS)	-0,639
Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Депрессия)	Общее благополучие (FAMS)	-0,602
Общая усталость (MFI-20)	Физический компонент (MSIS-29)	0,526
Общая усталость (MFI-20)	Подвижность (FAMS)	-0,651
Общая усталость (MFI-20)	Симптомы (FAMS)	-0,636
Физическая усталость (MFI-20)	Физический компонент (MSIS-29)	0,617
Физическая усталость (MFI-20)	Подвижность (FAMS)	-0,698
Физическая усталость (MFI-20)	Симптомы (FAMS)	-0,648
Физический компонент (MSIS-29)	Подвижность (FAMS)	-0,673
Физический компонент (MSIS-29)	Симптомы (FAMS)	-0,695

Следует подчеркнуть, что пациенты, находившиеся на момент выполнения психометрического тестирования в стадии клинической ремиссии или эксацербации РС, не имели отличий в баллах по всем четырем нейропсихологическим опросникам и тесту PASAT (табл. 3.10). Можно объяснить это сохранением неврологического дефицита, схожих жалоб, тревоги, утомляемости, физического и психического неблагополучия, снижения качества жизни в обеих стадиях заболевания.

### **3.4. Применение гормональной терапии при лечении пациентов с рассеянным склерозом**

Большинство пациентов (30 человек, 57,7%) по данным анамнеза получали терапию глюкокортикостероидами (ГКС) с целью купирования эксацербаций РС. Соотношение пациентов в группах ремиссии и обострения, получавших и не получавших в анамнезе ГКС, не отличалось. Получали гормональную терапию в анамнезе 26 из 41 в ремиссию и 4 из 11 в обострение ( $\chi^2$ :  $p=0,107$ , 2-сторонний критерий Фишера:  $p=0,169$ ).

В качестве ГКС нечасто использовали метилпреднизолон (5 чел.), рекомендуемый в качестве стандарта терапии эксацербаций РС [199], в основном применялся дексаметазон (22 чел.) и преднизолон (3 чел.).

Как указывалось нами ранее, в исследование не были включены пациенты, получавшие гормональные препараты в течение месяца (30 дней) до забора крови ввиду их системного влияния, в том числе на количество  $CD4^+$  лимфоцитов [100].

У пациентов, находившихся в периоде ремиссии, стабильное состояние перед забором крови отмечалось в течение 117 (78;243) дней. При обследовании пациентов в стадии обострения забор крови проводился в среднем на 30 (15;30) день от его начала (наименьшее значение длительности обострения – 5 дней, максимальное – 60 дней). Подсчет дней производился по отношению к дате забора крови на основании сведений, полученных от пациентов, о дате развития симптомов обострения или прекращения симптомов последнего обострения.

## ГЛАВА 4. ОЦЕНКА РОЛИ SEMA4D/CD100 В КОНТРОЛЕ ФУНКЦИИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

### 4.1. Экспрессия семафорина Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами *ex vivo* у пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров

В нашем исследовании установлено, что Т-лимфоциты экспрессируют CD100 в обеих группах до приближающихся к 100% значений (табл. 4.1), что соответствует литературным данным о физиологической (конститутивной) экспрессии данного маркера Т-лимфоцитами [97, 179].

Таблица 4.1

#### Экспрессия семафорина Sema4D/CD100 в клеточных субпопуляциях сравниваемых групп; Me [LQ;UQ]

Показатели		Пациенты с РС (n=37)	Здоровые доноры (n=20)	p
% клеток, несущих маркер CD100, в субпопуляциях МПК	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	99,7 (98,0;100,0)	99,5 (97,3;100,0)	0,909
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	99,6 (98,7;100,0)	99,6 (96,5;100,0)	0,952
	CD3 <sup>-</sup>	78,5 (51,5;85,3)	75,0 (38,5;87,1)	0,602

Здесь и далее: \* – значимые различия между группами; n – количество обследованных

Однако при оценке уровня экспрессии Sema4D/CD100 на Т-лимфоцитах, определяемом как средняя интенсивность свечения (Mean Fluorescence Intensity, MFI), нами было обнаружено его превалирование в субпопуляциях клеток у пациентов с РС в сравнении с ЗД (рис. 4.1).

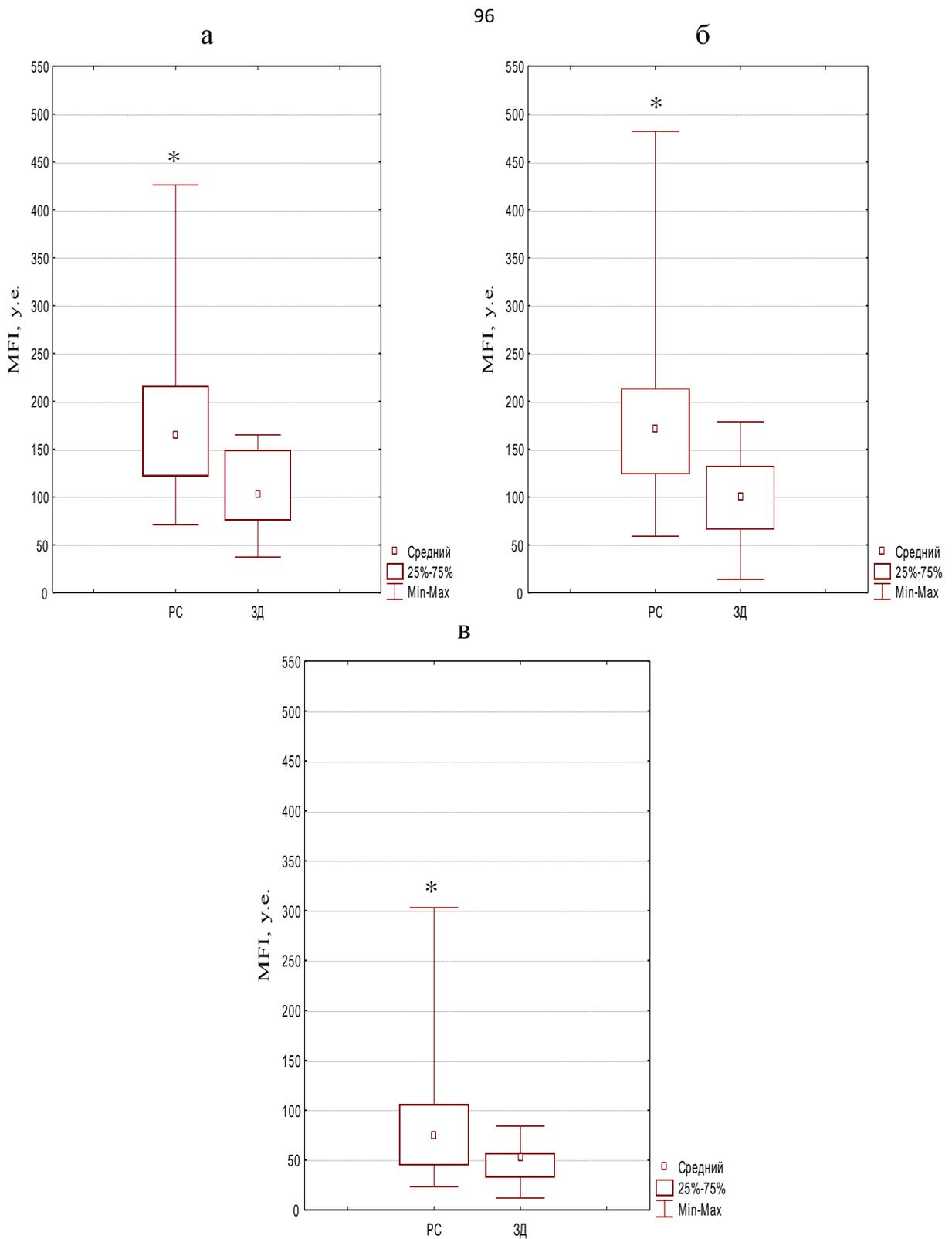


Рис. 4.1. Уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 (Mean Fluorence Intensity, MFI) в субпопуляциях мононуклеарных клеток периферической крови обследуемых: а)  $CD3^{+}4^{+}$ , б)  $CD3^{+}8^{+}$ , в)  $CD3^{-}$ ; Me [LQ;UQ].

Уровень экспрессии семафорина Sema4D был значимо выше у пациентов с РС (n=37), нежели ЗД (n=20), в субпопуляциях CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup> (165,0 (122,0-216,0) для РС и 103,0 (75,7-149,0) для ЗД, p=0,000), CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup> (171,0 (123,8-213,5) для РС и 100,6 (66,0-132,7) для ЗД, p=0,000), CD3<sup>-</sup>-лимфоцитов (74,5 (44,9-105,9) для РС и 52,6 (32,9-57,0) для ЗД, p=0,003) (рис. 4.1).

Мы предполагаем, что повышение уровня экспрессии семафорина Sema4D/CD100 на Т-лимфоцитах у пациентов с РС может означать:

- 1) наличие резерва для сдувания мембранного семафорина Sema4D/CD100 [113] и, соответственно, потенциального источника растворимой формы данного семафорина (sSema4D), препятствующего миелинизации нервных волокон [169];
- 2) более охотный ответ лимфоцитарного Sema4D/CD100 при взаимодействии с другими рецепторами, что также расширяет возможности его действия.

Если считать, что клетки непосредственно в ЦНС ведут себя сходно с тем, что выявлено на периферии (в крови), то Sema4D/CD100 должен, теоретически, способствовать в ЦНС демиелинизации *in situ*.

Следует обратить внимание на значимое различие процентного содержания CD100-позитивных (CD100<sup>+</sup>) клеток в популяции CD3<sup>-</sup>-лимфоцитов у пациентов с активностью РС (n=14) по данным МРТ головного мозга и без таковой (n=10) из числа обследуемых: 80,8 (66,0;87,0) в группе с нейровизуализационной активностью РС и 52,4 (45,3;78,0) в группе с отсутствием активности РС (p=0,047), что косвенно подтверждает усиленную экспрессию Sema4D/CD100 при демиелинизации.

Не выявлено корреляционной связи между процентом CD100<sup>+</sup> клеток в субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов и уровнем инвалидизации по шкале EDSS (R=0,292, p=0,080), величиной скорости прогрессирования (R=0,421, p=0,064).

Нами не было обнаружено отличий в экспрессии мембранного семафорина Sema4D/CD100 и ее уровне (MFI) в группах пациентов с РС, разделенных нами по возрасту, возрасту дебюта, длительности заболевания,

величине уровня инвалидизации по шкале EDSS и скорости прогрессирования (табл. 4.2).

Таблица 4.2

**Различия уровня экспрессии семафорина (MFI) Sema4D/CD100 в субпопуляциях мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с РС в зависимости от их клинических характеристик; p**

Выделенные группы градации показателей						Различия по MFI CD100 в субпопуляциях МПК (p)		
						3 <sup>+4+</sup>	3 <sup>+8+</sup>	3 <sup>-</sup>
Возраст (лет)	n	23	№	1	18-30	0,695	0,214	0,684
		11		2	31-40			
		3		3	41-55			
Дебют РС (лет)	n	9	№	1	16-29	0,396	0,543	0,481
		28		2	≥30			
Длительность первой ремиссии (лет)	n	20	№	1	≤ 1	0,968	0,874	0,513
		11		2	1-5			
		6		3	≥ 5			
Длительность заболевания (лет)	n	22	№	1	≤ 2	0,989	0,599	0,498
		9		2	2-5			
		6		3	≥ 5			
EDSS (балл)	n	20	№	1	1,5-2,0	0,436	0,700	0,595
		7		2	2,5-3,5			
		10		3	4,0-5,5			
Величина PI (для 33-х пациентов)	n	3	№	1	0,25	0,545	0,885	0,743
		8		2	0,25-0,75			
		9		3	≥ 0,75			
Пол	n	24	Женский		0,949	0,974	0,103	
		13	Мужской					
Стадия заболевания	n	27	Ремиссия		0,784	0,930	0,314	
		10	Обострение					

№ - порядковый номер выделенной группы обследуемых, n – число обследованных на экспрессию семафорина Sema4D/CD100, использованы критерий Манна-Уитни (при сравнении 2-х независимых групп) или Краскел-Уоллиса (при сравнении 3-х независимых групп)

Значимых отличий по уровню экспрессии Sema4D/CD100 в субпопуляциях МПК пациентов с РС в стадии ремиссии (n=27) и

экзацербации (n=10) нами также не было установлено (табл. 4.2), что предполагает отсутствие зависимости экспрессии Sema4D/CD100 от стадии демиелинизирующего процесса. При этом отдельно группа пациентов в стадии ремиссии РС (n=27) имела значимые отличия по уровню экспрессии Sema4D/CD100 на мембране в клеточных субпопуляциях с группой 3Д (n=20), также как и группа пациентов в стадии обострения РС (n=10) с группой 3Д (n=20).

Не установлено и гендерных отличий по уровню экспрессии Sema4D/CD100 на мембране лимфоцитов (табл. 4.2).

Также мы оценили уровень экспрессии семафорина Sema4D субпопуляциями МПК отдельно для пациентов с единственной экзацербацией РС (n=6) в анамнезе в сравнении с остальными пациентами (их которых обследовано по данному показателю n=31) и не обнаружили отличий между данными группами ( $p > 0,05$ ).

Обнаружена прямая корреляционная связь между процентом CD100<sup>+</sup> клеток в субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов и значением FS2 стволовых функций ( $R=0,418$ ,  $p=0,010$ ), FS7 когнитивных функций ( $R=0,351$ ,  $p=0,033$ ), значением FS8 передвижения ( $R=0,338$ ,  $p=0,041$ ), а также между уровнем экспрессии Sema4D/CD100 на CD3<sup>-</sup> клетках и значением FS2 стволовых функций ( $R=0,406$ ,  $p=0,014$ ).

Мы считаем, что обнаруженное нами в исследованиях *in vivo* усиление экспрессии семафорина Sema4D при РС свидетельствует об участии этой белковой молекулы в патогенезе данного заболевания и ее вкладе в иммунорегуляцию у таких пациентов.

**4.2. Экспрессия семафорина Sema4D/CD100 интактными и активированными Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup> клетками) у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза и здоровых доноров *in vitro* (в культуре)**

Для оценки возможных изменений в экспрессии семафорина Т-лимфоцитами в условиях иммунного ответа мы определяли ее в культуре – в

спонтанном варианте (в полной питательной среде, ППС) и в условиях активации. При этом использовали два варианта поликлональной активации – более физиологичный, митогеном конканавалином А (ConA), и более жесткий, форболмиристатацетатом (ФМА).

Установлено, что у ЗД активация Т-лимфоцитов ФМА (10 нг/мл) приводит к повышению уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране (MFI) на начальном этапе, при 60-минутной инкубации, но существенно снижает его при 18-часовой инкубации (рис. 4.2, табл. 4.3), причем снижался не только уровень экспрессии Sema4D/CD100, но и процент Т-клеток, несущих данный маркер.

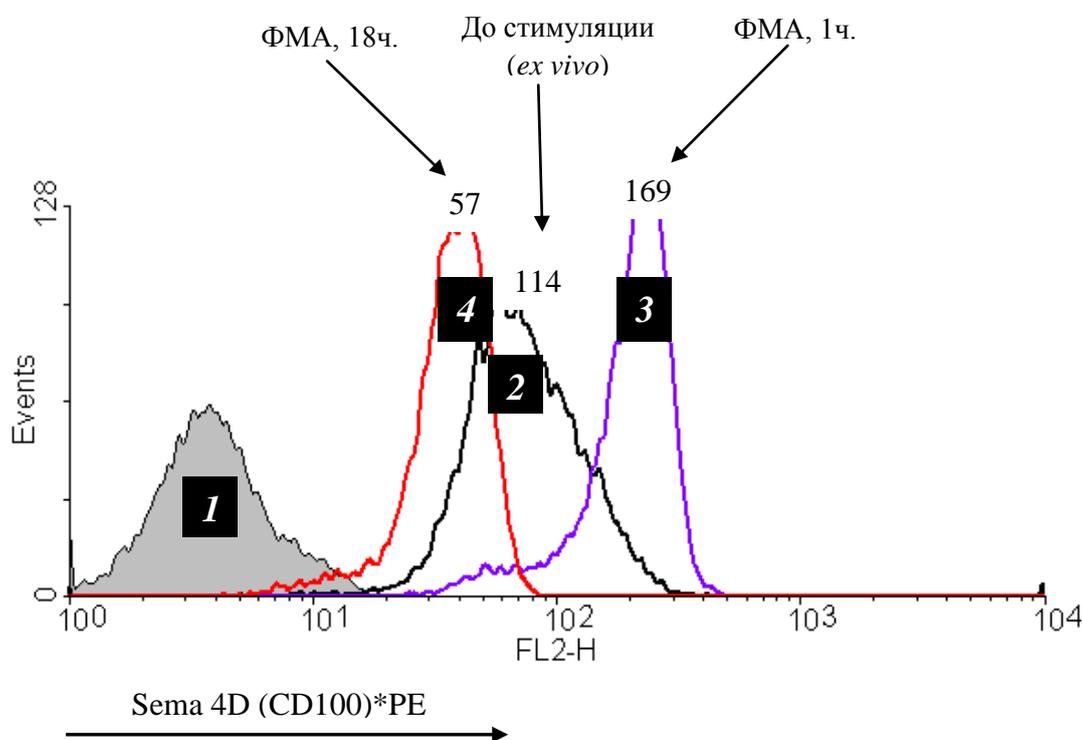


Рис. 4.2. Изменение уровня экспрессии Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами ( $CD3^+$  клетками) здоровых доноров при активации ФМА в зависимости от длительности культивирования (1ч. или 18ч.). Представлены результаты одного из 21 аналогичного эксперимента.

- 1 – изотипический контроль;
  - 2 – экспрессия CD100  $CD3^+$  клетками до активации;
  - 3 – экспрессия CD100  $CD3^+$  клетками после 1-часовой инкубации;
  - 4 – экспрессия CD100  $CD3^+$  клетками после 18-часового культивирования.
- Цифрами обозначена интенсивность свечения клеток (MFI, отн ед.).

**Экспрессия семафорина Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами здоровых доноров в культуре при разных вариантах активации ( $M \pm m$ )**

Экспериментальные условия	<i>Ex vivo</i>		Культивирование			
			60 мин. (1ч.)		18ч.	
	% CD100 <sup>+</sup> клеток в CD3 <sup>+</sup>	MFI CD100	% CD100 <sup>+</sup> клеток в CD3 <sup>+</sup>	MFI CD100	% CD100 <sup>+</sup> клеток в CD3 <sup>+</sup>	MFI CD100
Интактные клетки (n = 6)	95,3 ± 10,1	117,6 ± 11,2	89,9 ± 10,4	102 ± 15,9	93,7 ± 10,2	135 ± 15,2
ConA (n = 6)	-	-	89,0 ± 9,75	112 ± 10,7	91,9 ± 12,0	77,3 ± 9,98*
ФМА+ иономицин (n = 6)	-	-	99,0 ± 11,2	136 ± 8,44*	65,3 ± 0,84*	51,0 ± 0,76*

\* -  $p < 0,05$  в сопоставлении с соответствующим показателем для интактных клеток

Для второго использованного активатора, ConA (20 нг/мл), эти изменения были гораздо менее выражены (табл. 4.3), поэтому в дальнейших экспериментах использовался ФМА. Таким образом, исходя из данных установочного эксперимента, нами были выбраны оптимальные параметры для исследований: активатор клеток (ФМА) и время для оценки результатов экспрессии Sema4D/CD100 после культивирования клеток (1ч. и 18ч.).

Известно, что активация Т-лимфоцитов сопровождается «слущиванием» Sema4D/CD100 с клеточной мембраны: это подтверждено данными по оценке уровня растворимого Sema4D/CD100 (sSema4D) в

супернатантах клеточных культур, причем показана корреляция между снижением уровня мембранного Sema4D/CD100 и повышением его растворимой формы [88]. Поскольку в наших экспериментах условия активации Т-лимфоцитов аналогичны таковым в работе Wang с соавторами [88], предполагалось, что снижение уровня Sema4D/CD100 активированными Т-клетками объясняется, по-видимому, именно отщеплением данной молекулы от мембраны, и в дальнейшей интерпретации результатов нами была использована эта терминология.

У 3Д при культивировании интактных Т-лимфоцитов *in vitro* отмечено значимое отличие уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране для активированной 1-часовой клеточной культуры в сравнении с ее интактным 1-часовым вариантом (рис. 4.3, показатели 2 и 4) и его значимое отличие для активированной 18-часовой клеточной культуры в сравнении с ее интактным 18-часовым вариантом (рис. 4.3, показатели 3 и 5).

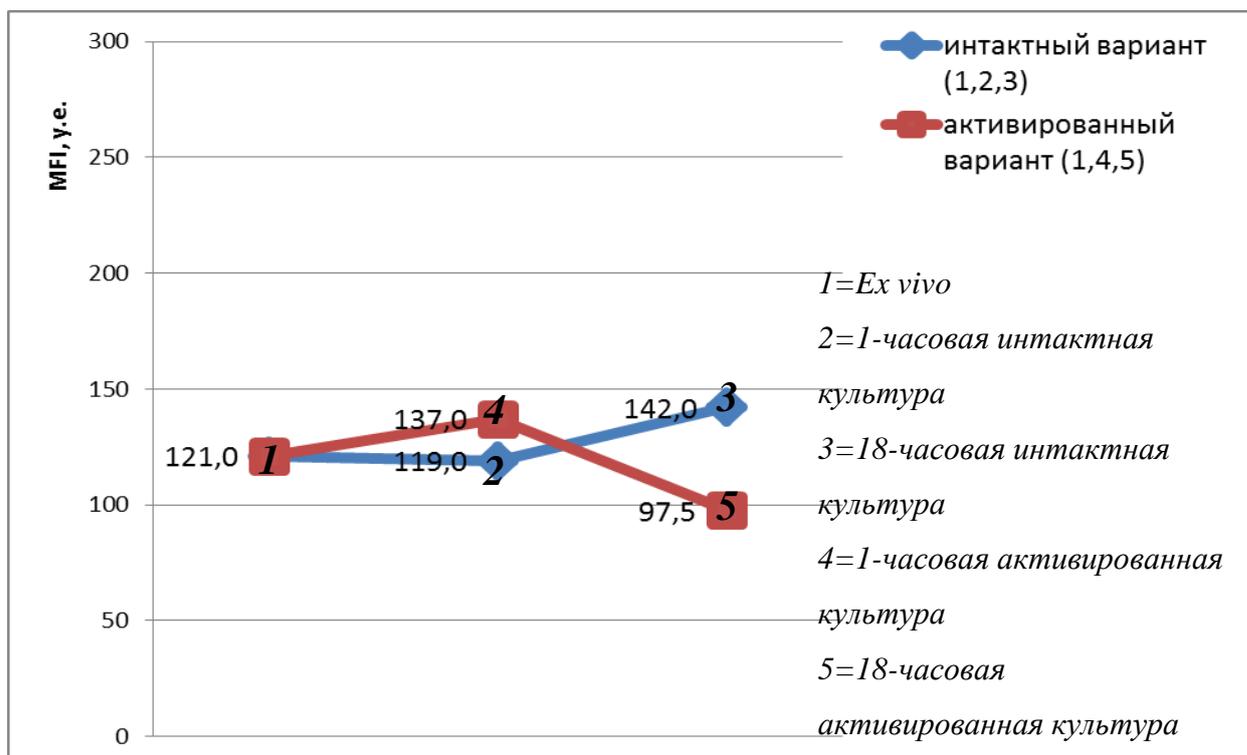


Рис. 4.3. Уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 (MFI) для интактных и активированных Т-лимфоцитов здоровых доноров ( $n=9$ ) в культуре в зависимости от длительности культивирования, [Me].  $p_{1-2}=0,893$ ,  $p_{1-3}=0,008^*$ ,  $p_{2-3}=0,225$ ,  $p_{1-4}=0,043^*$ ,  $p_{1-5}=0,028^*$ ,  $p_{4-5}=0,068$ ,  $p_{2-4}=0,043^*$ ,  $p_{3-5}=0,012^*$

Различия значимы также при сравнении активированного варианта 1-часовой клеточной культуры с уровнем экспрессии Sema4D/CD100 на мембране *ex vivo*, а также как интактного, так и активированного варианта 18-часовой клеточной культуры при сравнении с уровнем экспрессии Sema4D/CD100 на мембране *ex vivo* (рис. 4.3).

У пациентов с РС поликлональная активация клеток ФМА (10 мкг/мл) также приводила к возрастанию уровня экспрессии Sema4D на мембране Т-лимфоцитов в сравнении с интактными клетками как для кратковременного (1ч.) (рис. 4.4, показатели 2 и 4), так и для 18-часового культивирования (рис. 4.4, показатели 3 и 5).

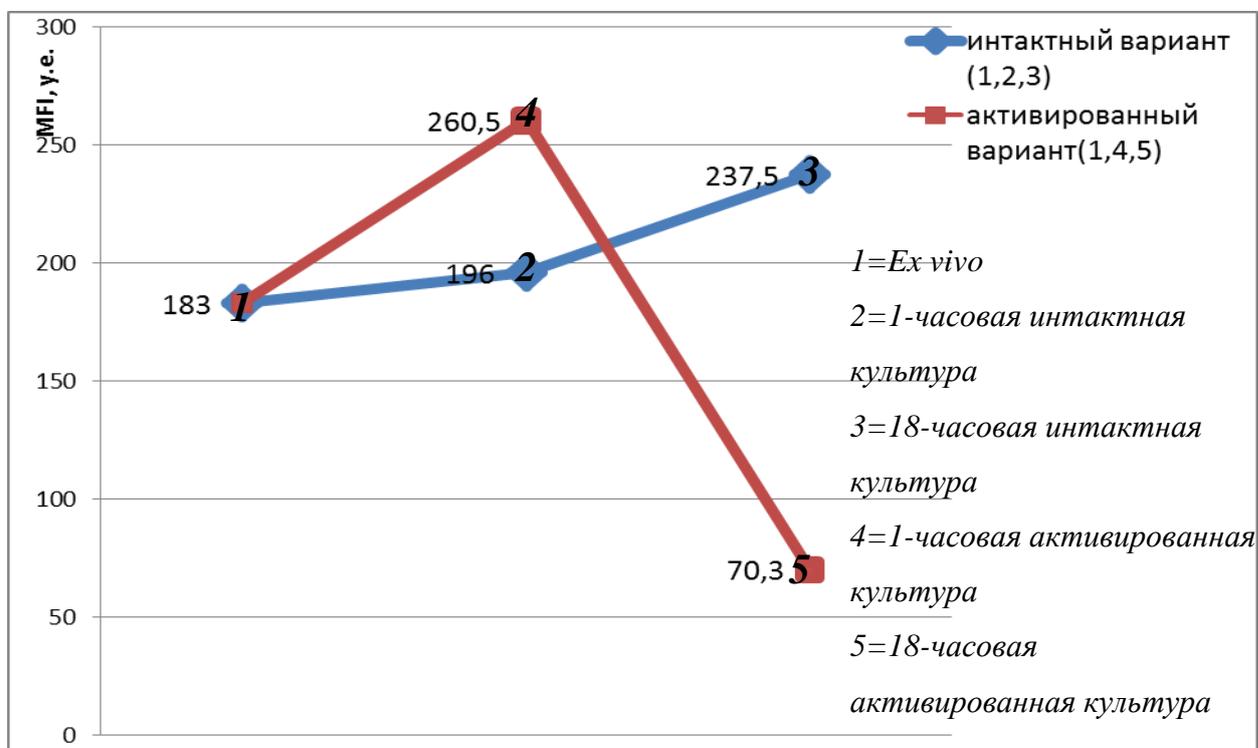


Рис. 4.4. Уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 (MFI) для интактных и активированных Т-лимфоцитов пациентов с РС (n=10) в культуре в зависимости от длительности культивирования, [Me].  $p_{1-2}=0,169$ ,  $p_{1-3}=0,009^*$ ,  $p_{2-3}=0,022^*$ ,  $p_{1-4}=0,013^*$ ,  $p_{1-5}=0,005^*$ ,  $p_{4-5}=0,005^*$ ,  $p_{2-4}=0,017^*$ ,  $p_{3-5}=0,005^*$

Кроме того, в группе пациентов с РС, как и у ЗД, были прослежены значимые отличия при сравнении уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране в активированном варианте 1-часовой клеточной культуры с этим

показателем *ex vivo*, а также при сравнении уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране интактного и активированного вариантов 18-часовой клеточной культуры с этим показателем *ex vivo* (рис. 4.4).

В обеих группах (и ЗД, и пациентов с РС) было отмечено повышение уровня экспрессии Sema4D/CD100 при культивировании CD3<sup>+</sup> клеток в течение 1 часа (график 1-2-3 на рис. 4.3 и рис. 4.4) и его снижение при культивировании на протяжении 18 часов (график 1-4-5 на рис. 4.3 и рис. 4.4).

При этом у пациентов с РС оба эффекта были статистически значимо более выражены – и повышение уровня экспрессии Sema4D (MFI) на начальных этапах культивирования, и его снижение при 18-часовой инкубации (рис. 4.4 в сравнении с рис. 4.3).

Для доказательства этого мы рассчитали разницу ( $\Delta$ ) между показателями уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране для CD3<sup>+</sup> клеток на этапах *ex vivo*– интактная 1-часовая клеточная культура–интактная 18-часовая клеточная культура и *ex vivo*–активированная 1-часовая клеточная культура–активированная 18-часовая клеточная культура (табл. 4.4).

Таблица 4.4

**Изменения уровня экспрессии Sema4D/CD100 (MFI) на мембране CD3<sup>+</sup> клеток при разной длительности культивирования в обследуемых группах; Me [LQ;UQ]**

Сравниваемые этапы культивирования клеток для оценки MFI		Пациенты с РС (n=10)	Здоровые доноры (n=9)	p
1		2	3	4
Интактный вариант	$\Delta 1 =$ Культивирование 1ч. – <i>Ex vivo</i>	5,0 (2,0;14,0)	1,5 (-12,0;8,3)	0,624
	$\Delta 2 =$ Культивирование 18ч. – Культивирование 1ч.	34,5 (13,0;53,0)	15,8 (15,7;29,0)	0,624
	$\Delta 3 =$ Культивирование 18ч. – <i>Ex vivo</i>	43,0 (17,0;62,0)	17,3 (15,0;24,0)	0,236

Продолжение таблицы 4.4

1	2	3	4	
Активация (ФМА)	$\Delta 4 =$ Культивирование 1ч. – <i>Ex vivo</i>	52,5 (9,0;92,0)	36,9 (16,0;43,3)	0,540
	$\Delta 5 =$ Культивирование 1ч. – Культивирование 18ч.	190,3 (91,1;243,1)	44,5 (38,2;58,3)	0,007*
	$\Delta 6 =$ <i>Ex vivo</i> – Культивирование 18ч.	123,3 (82,1;168,6)	14,2 (4,5;28,5)	0,000*

Отмечены значимые различия между группами РС и ЗД по интервалу снижения ( $\Delta$ ) уровня экспрессии (MFI) Sema4D/CD100 на мембране CD3<sup>+</sup> клеток в условиях активации (ФМА) 18-часовых клеточных культур в сравнении с показателем 1-часовых клеточных культур ( $p=0,007$ ) и для 18-часовых клеточных культур в сравнении с показателем *ex vivo* ( $p=0,000$ ) (табл. 4.4). То есть у пациентов с РС снижение уровня экспрессии Sema4D/CD100 на фоне активации происходило более интенсивно и резко в сравнении с ЗД, о чем мы говорили ранее при сравнении графиков на рис. 4.3 и рис. 4.4.

Активация Т-лимфоцитов сопровождалась не только снижением уровня экспрессии CD100 на мембране Т-лимфоцитов, но и появлением в культуре Т-клеток (CD3<sup>+</sup>-клеток), не несущих семафорин (19,8 (10,6-21,5) % от общего количества CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов), в отличие от ЗД (1,87 (1,54-2,64) % от общего количества CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов),  $p=0,001$ , что свидетельствует о более интенсивном отщеплении Sema4D/CD100 с мембраны активированных Т-лимфоцитов при данной патологии. Аналогичный эффект, но гораздо менее выраженный, наблюдался в спонтанном варианте.

Мы также обнаружили различие в виде меньшей доли CD100<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup> клеток) как и для интактных, так и для активированных 18-часовых клеточных культур у пациентов с РС (табл. 4.5).

**Сравнительные данные по процентному содержанию CD100<sup>+</sup> клеток при разной длительности культивирования в обследуемых группах; Me [LQ;UQ]**

Этапы культивирования		Пациенты с РС (n=10)	Здоровые доноры (n=9)	p
<i>Ex vivo</i>	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (%)	98,7 (93,0;99,9)	99,3 (97,2;100,0)	0,321
Культивирование интактных Т-лимфоцитов (1ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (%)	98,7 (96,7;99,8)	98,9 (98,0;99,5)	0,667
Культивирование интактных Т-лимфоцитов (18ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (%)	96,6 (95,4;97,2)	98,4 (98,0;98,5)	0,001*
Культивирование Т-лимфоцитов, активированных ФМА (1ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (%)	97,7 (96,7;98,5)	99,1 (98,2;99,6)	0,057
Культивирование Т-лимфоцитов, активированных ФМА (18ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (%)	73,4 (69,7;81,5)	99,8 (99,5;99,9)	0,000*

У пациентов с РС показатели уровня экспрессии (MFI) Sema4D/CD100 на мембране CD3<sup>+</sup> клеток были статистически значимо выше в сравнении с таковыми в группе ЗД на большинстве этапов культивирования: на уровне *ex vivo*, интактной 1-часовой клеточной культуры, активированной 1-часовой клеточной культуры, интактной 18-часовой клеточной культуры (табл. 4.6).

Таблица 4.6

**Сравнительные данные по уровню экспрессии Sema4D/CD100 (MFI) для CD3<sup>+</sup> клеток при разной длительности культивирования в обследуемых группах; Me [LQ;UQ]**

Этапы культивирования		Пациенты с РС (n=10)	Здоровые доноры (n=9)	p
<i>Ex vivo</i>	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	183,0 (114,0;235,0)	121,0 (93,7;139,0)	0,015*
Культивирование интактных Т-лимфоцитов (1ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	196,0 (168,0;227,0)	119,0 (95,2;123,0)	0,010*
Культивирование интактных Т-лимфоцитов (18ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	237,5 (181,0;276,0)	142,0 (111,0;152,0)	0,002*
Культивирование Т-лимфоцитов, активированных ФМА (1ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	260,5 (162,0;283,0)	137,0 (135,0;141,0)	0,020*
Культивирование Т-лимфоцитов, активированных ФМА (18ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	70,3 (41,0;79,4)	97,5 (91,5;109,5)	0,055

Для активированной 18-часовой клеточной культуры не было обнаружено статистически значимых отличий между группами пациентов с РС и ЗД (табл. 4.6).

Схематичное отображение отличий между группами пациентов с РС и ЗД по уровню экспрессии (MFI) Sema4D/CD100 в условиях культивирования представлено на рис. 4.5.

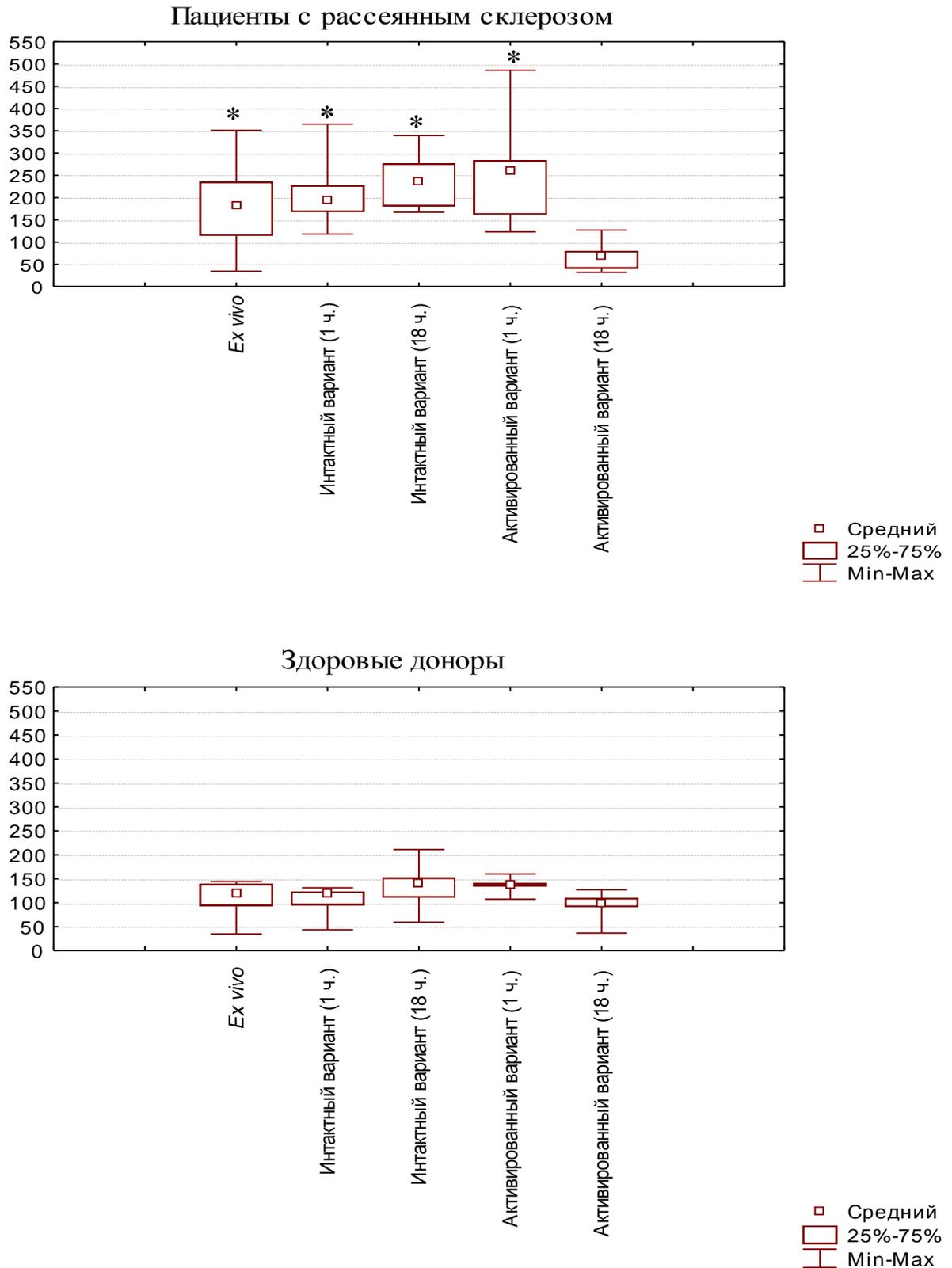


Рис. 4.5. Уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 (MFI) Т-лимфоцитами ( $CD3^+$  клетками) в сравниваемых группах при разных вариантах культивирования; Me [LQ;UQ].

В целом, мы показали, что уровень экспрессии семафорина Sema4D на мембране Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup> клеток) изменяется в ответ на активацию клеток в культуре: повышается на начальных этапах культивирования и снижается впоследствии. У пациентов с РС оба процесса – и повышение экспрессии вначале и снижение в 18-часовой клеточной культуре, существенно более выражены. Учитывая, что семафорин при активации способен «слущиваться» с мембраны в результате протеолитического отщепления, переходя в растворимую форму [88], выявленное в нашей работе снижение экспрессии данного фактора на мембране связано, по-видимому, именно с этим процессом. «Слущивание» Sema4D с мембраны предположено нами на основании снижения доли CD100<sup>+</sup> клеток у пациентов с РС в сравнении с ЗД после 18-часового культивирования (табл. 4.5) и снижения уровня экспрессии Sema4D/CD100 у пациентов с РС в активированной 18-часовой клеточной культуре (рис. 4.4, табл. 4.4). Подобные эффекты, возможно, имеют место *in vivo*, при ответе Т-лимфоцитов на антиген в иммунной системе, а также при активации аутореактивных Т-клеток непосредственно в ЦНС. Полученные данные поставили на повестку дня вопрос об уровне растворимого Sema4D в сыворотке крови и особенно в супернатантах Т-клеточной культуры.

#### **4.3. Уровень растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови и культуре Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup> клеток) у пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров**

Исследователями показано изменение экспрессии Sema4D/CD100 при клеточной активации [98, 113, 116, 159] с сохранением биологической активности его растворимой формы после протеолитического отщепления от мембраны [88]. Нами было предпринято определение уровня sSema4D методом иммуноферментного анализа (ИФА) в плазме крови и в супернатантах 18-часовых Т-клеточных культур, интактных и активированных. Для активации супернатантов клеточных культур использовали ФМА в сочетании с иономицином.

При оценке уровня sSema4D в плазме крови было отмечено значимое повышение этого показателя в сравнении с группой ЗД как для всей совокупности пациентов с РС ( $p=0,012$ ), так и для выделенных из общей совокупности группы пациентов в стадии ремиссии ( $p=0,031$ ) и в стадии обострения ( $p=0,018$ ) (табл. 4.7).

Таблица 4.7

**Уровни растворимого семафорина (sSema4D) в сравниваемых группах;  
Me [LQ;UQ]**

Группы сравнения, n (плазма/супернатанты клеточных культур)	sSema4D (плазма), нг/мл	sSema4D (супернатанты 18-часовой клеточной культуры)	
		спонтанный вариант, нг/мл	активатор ФМА+ иономицин, нг/мл
Пациенты с РС независимо от стадии заболевания (21/15)	4,66* (3,37;7,08)	—	—
Пациенты с РС в стадии ремиссии (14/15)	4,62* (2,92;5,88)	31,5 <sup>1</sup> (27,1;39,1)	40,5 <sup>2,3*</sup> (28,8;51,5)
Пациенты с РС в стадии обострения (7/0)	7,08* (3,37;9,63)	—	—
Здоровые доноры (7/14)	2,31 (2,27;3,57)	23,6 <sup>1</sup> (12,0;31,9)	30,5 <sup>2,3</sup> (17,5;39,9)

1-  $p<0,05$  при сравнении уровня sSema4D в супернатантах 18-часовой культуры интактных Т-лимфоцитов с его уровнем в плазме, критерий Вилкоксона

2-  $p<0,05$  при сравнении уровня sSema4D в активированном и спонтанном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры, критерий Вилкоксона

3-  $p<0,05$  при сравнении уровня sSema4D в активированном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры с его уровнем в плазме, критерий Вилкоксона

\*-  $p<0,05$  при сравнении со здоровыми донорами, критерий Манна-Уитни

Следует отметить, что отличий по уровню sSema4D между группами пациентов, находящихся в стадии ремиссии и обострения, выявлено не было ( $p=0,371$ ) (табл. 4.7), что предполагает отсутствие ключевой роли sSema4D в дифференциации этих стадий РС. Следует помнить, что пациенты в стадии обострения отличались от пациентов в стадии ремиссии меньшей длительностью первой ремиссии, меньшей продолжительностью заболевания и большим баллом EDSS (табл. 3.5).

Оценка уровня sSema4D в супернатантах 18-часовой клеточной культуры выявила следующие закономерности. У 3Д уровень sSema4D в супернатантах 18-часовых клеточных культур (и активированного, и спонтанного вариантов) значимо возрастал в сравнении с его уровнем в плазме ( $p=0,018$  при сравнении уровня sSema4D в спонтанном варианте супернатанта с его уровнем в плазме,  $p=0,018$  при сравнении уровня sSema4D в активированном варианте супернатанта с уровнем в плазме) (табл. 4.7).

Наращение sSema4D прослежено и при сравнении между собой уровней sSema4D в активированном и спонтанном вариантах 18-часовых клеточных культур ( $p=0,022$ ) для группы 3Д (табл. 4.7).

Аналогичные изменения отмечены у пациентов с РС. Уровень sSema4D в супернатантах клеточных культур был оценен нами для пациентов в стадии ремиссии РС. Как видно из рис. 4.6, в супернатантах 18-часовых клеточных культур (и активированного, и спонтанного вариантов) уровень sSema4D значимо возрастал в сравнении с его уровнем в плазме у пациентов с РС в стадии ремиссии ( $p=0,000$  при сравнении уровня sSema4D в спонтанном варианте супернатанта клеточной культуры с уровнем sSema4D в плазме,  $p=0,000$  при сравнении уровня sSema4D в активированном варианте супернатанта клеточной культуры с уровнем sSema4D в плазме).

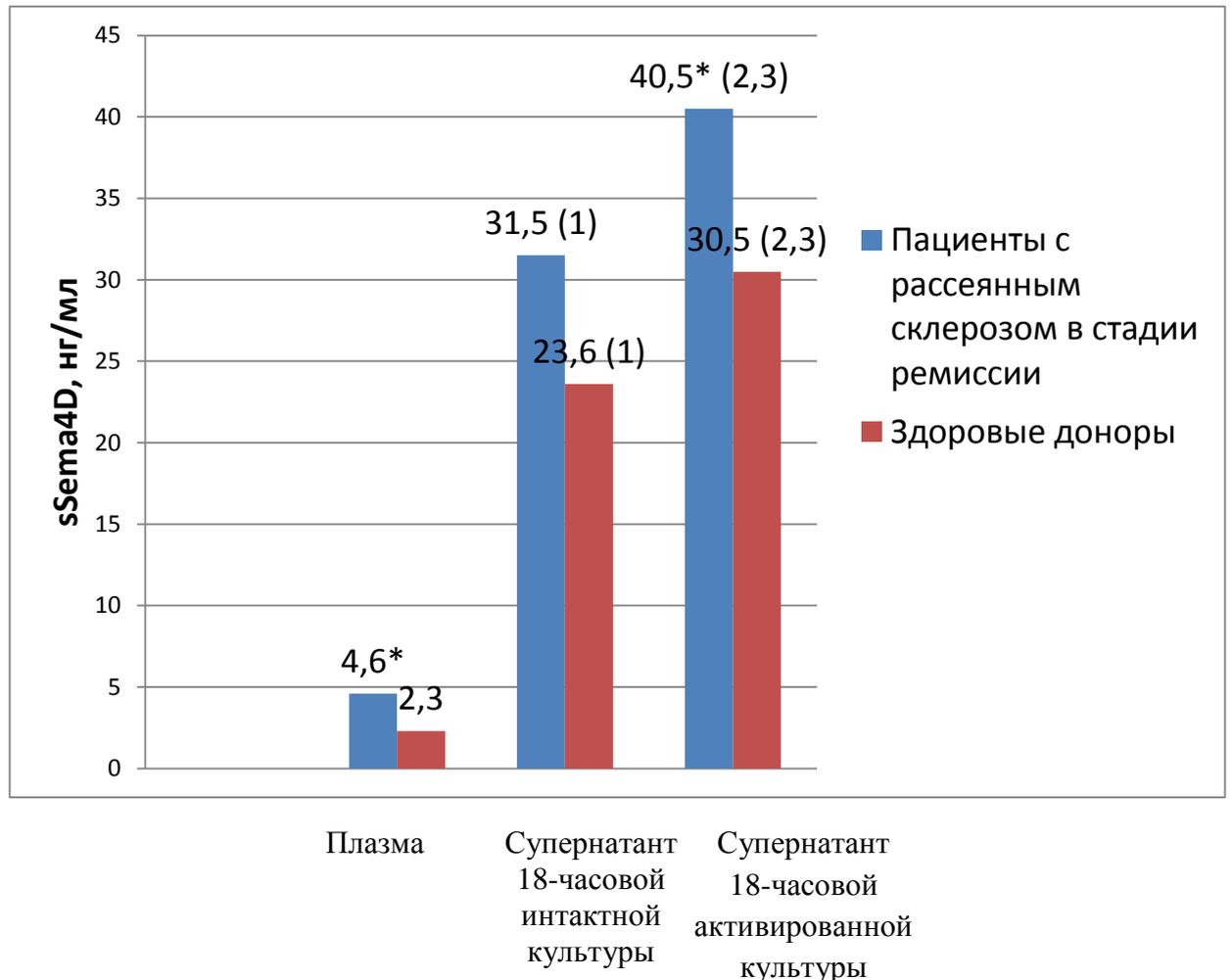


Рис. 4.6. Уровень растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови и супернатантах клеточных культур у пациентов в стадии ремиссии РС и здоровых доноров [Ме, нг/мл]

(1)-  $p < 0,05$  при сравнении уровня sSema4D в супернатантах 18-часовой культуры интактных Т-лимфоцитов с его уровнем в плазме, критерий Вилкоксона

(2)-  $p < 0,05$  при сравнении уровня sSema4D в активированном и спонтанном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры, критерий Вилкоксона

(3)-  $p < 0,05$  при сравнении уровня sSema4D в активированном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры с его уровнем в плазме, критерий Вилкоксона

\*-  $p < 0,05$  в сравнении со здоровыми донорами, критерий Манна-Уитни

Увеличение уровня sSema4D в группе пациентов с РС прослежено и при сравнении между собой уровней sSema4D в активированном и спонтанном вариантах супернатантов 18-часовых клеточных культур ( $p=0,041$ ) (рис. 4.6).

В целом, при сравнении уровня sSema4D в группах пациентов с РС и ЗД мы получили значимые отличия в виде преобладания у пациентов с РС в стадии ремиссии уровня sSema4D в плазме крови ( $p=0,031$ ) и в активированном варианте супернатантов клеточных культур ( $p=0,029$ ) (рис. 4.6), в то время как отличий в уровне sSema4D в спонтанном варианте 18-часовой клеточной культуры в группах РС и ЗД не было выявлено ( $p=0,077$ ) (рис. 4.6).

Наращение уровня sSema4D в условиях культивирования, обнаруженное нами при исследовании забранного на одном этапе биологического материала (супернатанты клеточных культур были получены после 18-часового культивирования  $CD3^+$  клеток), согласуется с обнаруженными нами ранее значимыми отличиями по уровню экспрессии мембранного Sema4D/CD100 между пациентами с РС и ЗД, особенно в субпопуляциях  $CD3^+4^+$  и  $CD3^+8^+$  Т-лимфоцитов (рис. 4.1): ведь большие уровни мембранного семафорина должны, теоретически, служить источником растворимого семафорина (sSema4D). Точно также это согласуется с выявленным снижением у пациентов с РС в ходе 18-часового культивирования лимфоцитов (имитирующего иммунный ответ) уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране  $CD3^+$  клеток (его активным слушиванием с мембраны клеток) (рис. 4.4).

Поскольку известно, что основной путь образования растворимого Sema4D – протеолитическое отщепление семафорина от мембраны [88], логично было ожидать, что снижение уровня экспрессии Sema4D на мембране клеток при культивировании будет сопровождаться реципрокным повышением концентрации растворимой формы семафорина (sSema4D) в супернатантах 18-часовой культуры. И для спонтанного варианта мы действительно выявили такие закономерности. Так, для группы ЗД ( $n=5$ ) была выявлена корреляционная обратная зависимость между процентом  $CD100^+ CD3^+$  клеток в интактном варианте 18-часовой клеточной культуры и уровнем sSema4D в интактном варианте супернатанта 18-часовой клеточной

культуры ( $R=-0,900$ ,  $p=0,037$ ) (рис. 4.7а), а также между уровнем экспрессии Sema4D/CD100 на мембране (MFI) для CD100<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> клеток в интактном варианте 18-часовой клеточной культуры и уровнем sSema4D в активированном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры ( $R=-0,900$ ,  $p=0,037$ ) (рис. 4.7б).

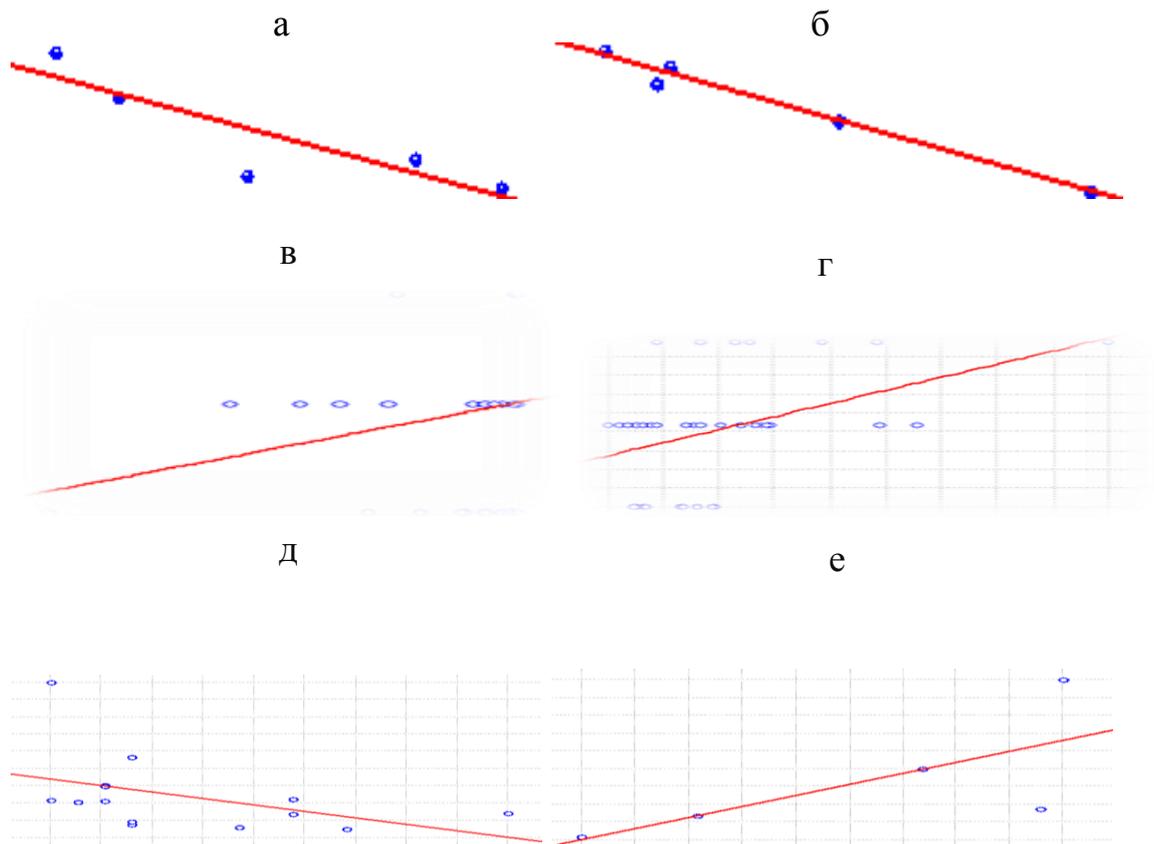


Рис. 4.7. Корреляционные связи семафорина Sema4D/CD100 с показателями здоровых доноров и пациентов с РС:

- а) Корреляционная обратная связь между процентом  $CD100^+CD3^+$  клеток при 18-часовом культивировании и уровнем  $sSema4D$  в интактном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры у здоровых доноров;
- б) Корреляционная обратная связь между уровнем экспрессии Sema4D/CD100 на мембране для  $CD100^+CD3^+$  клеток в интактном варианте 18-часовой клеточной культуры и уровнем  $sSema4D$  в активированном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры у здоровых доноров;
- в) Корреляционная прямая связь между значением функций ствола мозга (показателем FS2 шкалы EDSS) и уровнем экспрессии Sema4D в субпопуляции  $CD3^-$  клеток ( $R=0,406$ ,  $p=0,014$ );
- г) Корреляционная прямая связь между значением функций ствола мозга и процентом  $CD100$ -позитивных клеток в субпопуляции  $CD3^+CD4^+$  лимфоцитов ( $R=0,418$ ,  $p=0,010$ );
- д) Корреляционная обратная связь между уровнем растворимого семафорина ( $sSema4D$ ) в плазме крови и продолжительностью заболевания у пациентов с рассеянным склерозом в стадии ремиссии;
- е) Корреляция прямая связь между уровнем растворимого семафорина ( $sSema4D$ ) в плазме крови и количеством контрастируемых очагов в головном мозге у пациентов с рассеянным склерозом в стадии обострения.

Однако нами не было прослежено аналогичной обратной корреляции между уровнями экспрессии мембранного и растворимого семафорина в культуре активированных Т-лимфоцитов – как у здоровых доноров, так и у пациентов с РС. Вероятнее всего, это связано с тем, что при активации параллельно протекает как минимум три процесса: 1) повышение экспрессии Sema4D/CD100 на мембране; 2) его протеолитическое отщепление от мембраны; 3) интернализация – уход рецептора CD100 внутрь клетки. Эти процессы, по-видимому, регулируются по-разному и накладываются друг на друга, не давая четкой взаимосвязи.

Что касается корреляции между уровнем экспрессии Sema4D на мембране Т-лимфоцитов и его концентрацией (sSema4D) в плазме крови, то в данном случае к перечисленным выше причинам добавляется еще одна: 4) возможно, часть Sema4D/CD100 тромбоцитарного происхождения, поэтому вклад в общий уровень sSema4D вносит именно тромбоцитарный Sema4D/CD100, а не лимфоцитарный. Следует отметить, что исследование тромбоцитарного Sema4D/CD100 мы посчитали нецелесообразным, учитывая отсутствие тромбоцитов в лимфатических узлах и малую вовлеченность в патогенез РС.

Как было выяснено из предыдущих экспериментов, показатели экспрессии мембранного семафорина Sema4D коррелировали с показателем функций ствола мозга (FS2) шкалы инвалидизации EDSS (рис. 4.7в, рис. 4.7г). В свою очередь, уровень растворимого семафорина (sSema4D) был связан с несколькими клиническими характеристиками пациентов. Для пациентов в стадии ремиссии РС (n=14) отмечена обратная корреляция между уровнем sSema4D в плазме и продолжительностью болезни ( $R=-0,567$ ,  $p=0,035$ ) (рис. 4.7д), что согласуется с преобладанием воспалительного компонента и процессов демиелинизации, ключевую роль в которых может играть Sema4D/CD100, на ранних этапах заболевания [19]. Для группы пациентов с обострением РС (n=7) прослежена прямая корреляция уровня sSema4D в плазме и количеством контрастируемых очагов в головном мозге

( $R=0,900$ ,  $p=0,037$ ) (рис. 4.7e), что также представляется логичным с учетом усиления воспаления и демиелинизации в ЦНС в стадии обострения РС [30].

Различий в уровне sSema4D в плазме для пациентов с РС в зависимости от их клинических особенностей не было установлено (табл. 4.8).

Таблица 4.8

**Различия уровня растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови пациентов с РС в зависимости от их клинических характеристик**

Выделенные группы градации показателей					Различия по sSema4D (p)	
Возраст (лет)	n	14	№	1	18-30	0,152
		6		2	31-40	
		1		3	41-55	
Дебют РС (лет)	n	6	№	1	16-29	0,350
		15		2	$\geq 30$	
Длительность первой ремиссии (лет)	n	14	№	1	$\leq 1$	0,200
		5		2	1-5	
		2		3	$\geq 5$	
Длительность заболевания (лет)	n	14	№	1	$\leq 2$	0,297
		5		2	2-5	
		2		3	$\geq 5$	
EDSS (балл)	n	10	№	1	1,5-2,0	0,838
		4		2	2,5-3,5	
		7		3	4,0-5,5	
Величина PI (для 33-х пациентов)	n	0	№	1	$\leq 0,25$	-
		5		2	0,25-0,75	
		6		3	$\geq 0,75$	
Пол	n	12	Женщины		0,477	
		9	Мужчины			
Стадия заболевания	n	14	Ремиссия		0,371	
		7	Обострение			

№ - порядковый номер выделенной группы обследуемых, n – число обследованных на уровень sSema4D в плазме, использованы критерий Манна-Уитни (при сравнении 2-х групп) или Краскел-Уоллиса (при сравнении 3-х групп)

Уровень sSema4D вне зависимости от формы его обнаружения (плазма или супернатанты клеточных культур) не имел корреляционной связи с когнитивными показателями на примере теста PASAT и данными психометрического тестирования.

Уровень растворимого Sema4D в плазме крови не отличался у пациентов с единственной экзацербацией РС в анамнезе в сравнении с остальными пациентами ( $p=0,244$ ), как и в случае с интактным ( $p=0,083$ ) и активированным вариантом супернатанта клеточной культуры ( $p=0,083$ ).

Известно, что Sema4D/CD100 способен выполнять роль руководящей молекулы в развитии и регенерировании ЦНС и роль иммунного регулятора. Он способен оказывать биологические эффекты на нейрональные и иммунные клетки благодаря использованию в качестве рецепторов плексина-B1, плексина-B2 и CD72 [96, 113, 145]. Биологическая активность sSema4D сохраняется после его протеолитического отщепления от мембраны [88], поэтому выявленное в нашем исследовании повышение показателей растворимой формы семафорина у пациентов с РС предполагает наличие его активного патологического действия, схожего с таковым в ЦНС и подразумевающего демиелинизацию незрелых олигодендроцитов [169].

#### **4.4. Экспрессия рецептора для Sema4D/CD100 – CD72 – В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup> клетками) у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза в сравнении с контрольной группой**

Известно, что Sema4D/CD100 способен выступать в роли лиганда для рецепторов CD72 и plexin-B1, воздействуя на нейрональные и иммунные клетки, представленные В-клетками, дендритными клетками и моноцитами [113]. Основным рецептором для Sema4D/CD100 в нервной системе является plexin-B1 (отсутствующий на лимфоцитах), а в иммунной – CD72 [98, 113]. CD72 экспрессируется во время дифференциации В-клеток, снижаясь по мере перехода В-клеток в плазматические клетки [113]. Строгоспецифичным маркером В-лимфоцитов по праву считается именно CD19<sup>+</sup> [32]. Основываясь на выше описанных данных, мы предприняли исследование

экспрессии рецептора CD72 на CD19<sup>+</sup> клетках пациентов с РС. Нами обнаружено значимое снижение процента CD72-позитивных CD19<sup>+</sup> клеток у пациентов с РС в сравнении с ЗД (табл. 4.9).

Таблица 4.9

**Доля В-лимфоцитов, несущих рецептор CD72, и показатели уровня экспрессии CD72 в сравниваемых группах; Me [LQ;UQ]**

Показатели		Пациенты с РС (n=24)	Здоровые доноры (n=15)	p
Доля В-лимфоцитов (CD19 <sup>+</sup> клеток) в суспензии МПК (%)		17,3 (14,1;23,5)	9,4 (7,9;10,9)	0,000*
Экспрессия CD72 в популяции CD19 <sup>+</sup> клеток	Доля CD19 <sup>+</sup> клеток, несущих рецептор CD72 (%)	43,7 (36,4;47,8)	82,0 (72,0;83,0)	0,000*
	Уровень экспрессии CD72 CD19 <sup>+</sup> клетками (y.e.)	49,7 (40,7;77,2)	68,9 (57,4;92,0)	0,121

Кроме того было выявлено, что у исследованной группы пациентов с РС значимо повышено процентное содержание В-лимфоцитов (% CD19<sup>+</sup> клеток) в периферической крови по сравнению с ЗД (табл. 4.9). Однако следует отметить, что корреляционной связи между процентным содержанием В-лимфоцитов и процентом несущих рецептор CD72 лимфоцитов не установлено ( $p=0,862$ ), что свидетельствует о том, что В-лимфоциты являются не единственной субпопуляцией лейкоцитов, экспрессирующей CD72. Тем не менее, изменение экспрессии CD72 именно В-лимфоцитами может иметь важное значение для развития данной аутоиммунной патологии, учитывая данные о разноплановой роли В-лимфоцитарного звена иммунитета при РС: антиген-презентирующая функция, продукция цитокинов [119], участвующих как в развитии воспаления, так и в стимуляции репаративных процессов в ЦНС. В-

лимфоциты способны проникать через ГЭБ и накапливаться в очагах демиелинизации. Появление олигоклонального  $\gamma$ -глобулина в спинно-мозговой жидкости, свидетельствующее о гомеостатической пролиферации, является диагностическим маркером РС, кроме того, В-клетки могут выступать в роли резервуара для вируса Эпштейн-Барр [75].

По уровню экспрессии CD72 (MFI) CD19<sup>+</sup> клетками в двух сравниваемых группах значимых отличий не было выявлено (табл. 4.9).

Мы не установили отличий в показателях экспрессии CD72 в группах пациентов с РС, выделенных нами по их клиническим характеристикам (табл. 4.10).

Таблица 4.10

**Различия по экспрессии CD72 на В-лимфоцитах периферической крови пациентов с РС в стадии ремиссии в зависимости от их клинических характеристик; Me [LQ;UQ]**

Выделенные группы градации показателей					Различия по % CD72 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> клеток (p)	Различия по MFI CD72 на мембране CD19 <sup>+</sup> клеток (p)	
1					2	3	
Возраст (лет)	n	12	№	1	18-30	0,815	0,576
		10		2	31-40		
		2		3	41-55		
Дебют РС (лет)	n	5	№	1	16-29	0,776	0,924
		19		2	$\geq 30$		
Длительность первой ремиссии (лет)	n	10	№	1	$\leq 1$	0,624	0,208
		7		2	1-5		
		7		3	$\geq 5$		
Длительность заболевания (лет)	n	12	№	1	$\leq 2$	0,846	0,060
		5		2	2-5		
		7		3	$\geq 5$		
EDSS (балл)	n	14	№	1	1,5-2,0	0,839	0,343
		5		2	2,5-3,5		
		5		3	4,0-5,5		

Продолжение таблицы 4.10

1					2	3	
Величина PI (для 33-х пациентов)	n	3	№	1	≤0,25	0,774	0,103
		8		2	0,25-0,75		
		7		3	≥0,75		
Пол	n	17	Женщины		0,546	0,060	
		7	Мужчины				

№ - порядковый номер выделенной группы обследуемых, n – число обследованных на экспрессию CD72 в субпопуляции CD19<sup>+</sup> клетках, использованы критерий Манна-Уитни (при сравнении 2-х групп) или Красскел-Уоллиса (при сравнении 3-х групп)

Известно, что CD72 является негативным регулятором функции В-клеток: в его цитоплазматическом домене содержится ингибирующий мотив (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM), который за счет связывания фосфатазы SHP1 (SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase) подавляет антигенную активацию клетки, предполагающую на начальном этапе последовательное фосфорилирование по тирозину различных мотивов в составе иммунорецепторных молекул и адаптерных белков [188].

Необходимо отметить необычное взаимодействие семафорина Sema4D/CD100 с рецептором CD72: их связывание отменяет негативное действие CD72 на В-клеточную активацию [113]. Таким образом, установленное ранее в нашем исследовании повышение уровня экспрессии (MFI) семафорина Sema4D/CD100 интактными Т-лимфоцитами в периферической крови пациентов с РС в сравнении с ЗД (рис. 4.1), также предполагает гиперактивацию В-лимфоцитов у наших пациентов. Таким образом, потенциальная Sema4D-зависимая регуляция может играть важную роль в развитии данной патологии.

Выявленное нами снижение доли В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup> клеток), несущих на своей мембране маркер CD72, косвенно также предполагает наличие гиперактивации В-лимфоцитов у наивных пациентов с РС в нашем

исследовании, что может оказаться одним из механизмов развития демиелинизирующего заболевания. В качестве дополнительного момента, вносящего вклад в участие В-лимфоцитарного звена в развитии РС, можно указать выявленное в нашем исследовании повышение доли В-лимфоцитов у данных пациентов.

#### **4.5. Синтез ключевых про- и противовоспалительных цитокинов В-лимфоцитами у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза в сравнении с контрольной группой**

Прежде чем обсуждать роль Sema4D/CD100 в регуляции В-клеточной продукции цитокинов, необходимо остановиться на описании самой системы, то есть продукции про- и противовоспалительных цитокинов В-лимфоцитами в норме и при исследуемой патологии.

Основная роль в патогенезе РС ранее была отведена Т-клеточному звену иммунитета в виде активации аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Данные последних лет заставили пересмотреть вклад В-лимфоцитов в развитие данной патологии. Интересными представляются альтернативные антителонезависимые В-клеточные механизмы в развитии РС. В частности, В-лимфоциты способны продуцировать провоспалительные цитокины [119]. В качестве второй линии терапии пациентов с РС используется химерное моноклональное антитело против В-клеточного антигена CD20 ритуксимаб [2, 50, 121], а также окрелизумаб («гуманизированная версия ритуксимаба») [50]. При этом CD20 отсутствует на плазматических клетках, происходящих из В-лимфоцитов и продуцирующих антитела [50], что предполагает не связанную с продукцией антител причину высокой терапевтической эффективности подобной терапии, а например, воздействие препарата на продукцию внутриклеточных цитокинов и их антиген-презентирующую функцию В-клеток в отношении Т-клеток.

Нами исследован профиль цитокинов, синтезируемых В-лимфоцитами при их культивировании (48ч.) в присутствии Т-клеток.

В спонтанном варианте (в эксперименте без использования активатора клеток), представляющем костимулирующие сигналы со стороны Т-лимфоцитов при отсутствии антигенной стимуляции, В-клетки ЗД синтезируют значительно меньшие количества провоспалительных цитокинов, TNF- $\alpha$  и LT- $\alpha$ , в сравнении с группой пациентов с РС ( $p=0,003$  и  $p=0,001$  соответственно) (табл. 4.11).

Таблица 4.11

**Экспрессия цитокинов TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$ , IL-10 CD19<sup>+</sup> клетками (процент цитокин-позитивных клеток в популяции) периферической крови в сравниваемых группах; Me [LQ;UQ]**

Показатели			Пациенты с РС (n=11)	Здоровые доноры (n=11)
Данные для клеточной культуры 48ч. (спонтанный вариант)	TNF- $\alpha$	%	7,5 <sup>2</sup> (6,0;10,0)	2,3 (1,5;4,0)
	LT- $\alpha$	%	13,0 <sup>2</sup> (9,0;19,0)	4,0 (2,0;7,0)
	IL-10	%	3,0 <sup>2</sup> (2,5;4,0)	8,0 (5,0;10,0)
Данные для клеточной культуры 48ч. (активация ФМА+инономицин)	TNF- $\alpha$	%	27,0 <sup>1,2</sup> (20,0;36,0)	16,0 <sup>1</sup> (14,0;24,0)
	LT- $\alpha$	%	43,0 <sup>1</sup> (23,0;67,0)	30,0 <sup>1</sup> (21,0;39,0)
	IL-10	%	5,0 <sup>1</sup> (3,0;7,0)	5,0 (2,2;25,0)

1-  $p<0,05$  в сравнении со спонтанным вариантом

2-  $p<0,05$  в сравнении со здоровыми донорами

Экспрессия противовоспалительного цитокина IL-10, напротив, выявляется почти в 8% В-клеток в группе контроля в противовес 3% В-клеток у пациентов с РС ( $p=0,001$ ) (табл. 4.11). Это соответствует литературным данным о сниженной способности В-клеток пациентов с РС продуцировать IL-10 [73], и повышенной способности продуцировать провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$  и LT- $\alpha$  [36].

Нами установлено изменение профиля цитокинов, синтезируемых В-лимфоцитами, в условиях активирования клеток. У ЗД в условиях активации клеточных культур в сравнении со спонтанным вариантом отмечено увеличение процента В-клеток, содержащих цитокин: TNF- $\alpha$  ( $p=0,005$ ) и LT- $\alpha$  ( $p=0,003$ ). В то же время для IL-10 это сравнение не было значимо ( $p=0,262$ ) и была отмечена тенденция к снижению у ЗД процента В-клеток, содержащих IL-10 (табл. 4.11). При этом у ЗД отмечена прямая корреляционная связь между уровнем экспрессии CD19<sup>+</sup> клеток, несущих CD72, и синтезом В-лимфоцитами провоспалительного цитокина LT- $\alpha$  в условиях активации клеток ( $R=0,750$ ,  $p=0,019$ ).

У пациентов с РС при использовании активатора для 48-часовой клеточной культуры отмечено значимое увеличение процента В-клеток, содержащих исследуемые цитокины в сравнении со спонтанным вариантом: TNF- $\alpha$  ( $p=0,003$ ), LT- $\alpha$  ( $p=0,003$ ), IL-10 ( $p=0,040$ ) (табл. 4.10). В спонтанном варианте процент клеток, содержащих противовоспалительный цитокин – IL-10<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> клеток – преобладал в группе контроля ( $p=0,001$ ) (табл. 4.10), в то же время при условии активации системы значимых отличий по проценту клеток, содержащих данный цитокин, между группами РС и контроля выявлено не было (табл. 4.11). В активированном варианте процент клеток, несущих цитокин, преобладал у пациентов с РС только для одного провоспалительного цитокина - фактора некроза опухоли-альфа (табл. 4.11).

У пациентов с РС отмечена отрицательная корреляционная связь ( $n=5$ ) между процентом В-клеток, содержащих провоспалительный цитокин LT- $\alpha$  в условиях активации клеток и показателем общей астении по тесту MFI-20 ( $R=-0,975$ ,  $p=0,005$ ), а также между процентом В-клеток, содержащих противовоспалительный цитокин IL-10 и показателем психической астении по шкале MFI-20 ( $R=-0,975$ ,  $p=0,005$ ).

Корреляционных связей между процентом В-клеток, несущих цитокины, и другими клиническими характеристиками пациентов с РС нами не прослежено. Также не удалось проследить связи цитокинового профиля В-

лимфоцитов с показателями экспрессии CD100 и CD72 клеточными субпопуляциями.

Что касается роли семафорина Sema4D/CD100, экспрессируемого и продуцируемого активированными Т-лимфоцитами, в регуляции синтеза цитокинов CD19<sup>+</sup> клетками (В-лимфоцитами), ее оценка выявила следующие закономерности. У ЗД на фоне блокады Sema4D происходило значимое снижение процента клеток, экспрессирующих цитокин TNF- $\alpha$  (табл. 4.12).

Таблица 4.12

**Экспрессия TNF- $\alpha$  активированными CD19<sup>+</sup> клетками (процент цитокин-позитивных клеток в популяции) на фоне блокады Sema4D-CD72-зависимого сигнала; Me [LQ;UQ]**

Показатели			Пациенты с РС (n=11)	Здоровые доноры (n=11)
Данные без ингибитора		%	27,0 <sup>2</sup> (20,0;36,0)	16,0 (14,0;24,0)
На фоне блокады	Sema4D	%	15,0 <sup>1</sup> (13,0;18,0)	12,5 <sup>1</sup> (10,0;15,0)
	CD72	%	17,0 <sup>1</sup> (13,0;22,0)	15,0 (6,0;19,0)

Здесь и в табл. 4.13, 4.14:

- 1-  $p < 0,05$  в сравнении с вариантом без применения ингибитора, критерий Вилкоксона
- 2-  $p < 0,05$  в сравнении со здоровыми донорами, критерий Манна-Уитни

У пациентов с РС процент содержащих цитокин TNF- $\alpha$  В-лимфоцитов статистически значимо снижался как на фоне блокады семафорина Sema4D/CD100 ( $p=0,004$ ), так и на фоне блокады рецептора для данного семафорина на мембране В-лимфоцитов – CD72 ( $p=0,006$ ) (табл. 4.12). Эти данные подтверждают роль CD72-зависимого сигнала в реализации эффектов семафорина Sema4D/CD100 у пациентов с РС.

Аналогичные эффекты ингибиторов выявлены и для LT- $\alpha$ , причем как у ЗД, так и в группе пациентов с РС без значимых отличий между ними (табл. 4.13).

Таблица 4.13

**Экспрессия LT- $\alpha$  активированными CD19<sup>+</sup> клетками (процент цитокин-позитивных клеток в популяции) на фоне блокады Sema4D-CD72-зависимого сигнала; Me [LQ;UQ]**

Показатели		Пациенты с РС (n=11)	Здоровые доноры (n=11)
Данные без ингибитора		43,0 (23,0;67,0)	30,0 (21,0;39,0)
На фоне блокады	Sema4D	24,0 <sup>1</sup> (19,0;54,0)	20,0 <sup>1</sup> (15,5;22,5)
	CD72	25,0 <sup>1</sup> (22,0;50,0)	24,0 <sup>1</sup> (21,0;36,0)

В группе контроля процент клеток, экспрессирующих цитокин LT- $\alpha$ , статистически значимо снижался на фоне блокады Sema4D/CD100 ( $p=0,017$ ) и CD72 ( $p=0,004$ ). В группе пациентов с РС процент клеток, экспрессирующих цитокин LT- $\alpha$ , также, как и в случае с цитокином TNF- $\alpha$ , статистически значимо снижался как на фоне блокады семафорина Sema4D/CD100 ( $p=0,003$ ), так и на фоне блокады его рецептора CD72 ( $p=0,003$ ) (табл. 4.13). Значимых отличий по этим показателям между группами ЗД и пациентов с РС не было отмечено (табл. 4.13).

У ЗД продукция провоспалительного цитокина IL-10 повышалась при блокаде Sema4D ( $p=0,020$ ) (табл. 4.14).

Таблица 4.14

**Экспрессия IL-10 активированными CD19<sup>+</sup> клетками (процент цитокин-  
позитивных клеток в популяции) на фоне блокады Sema4D-CD72-  
зависимого сигнала; Me [LQ;UQ]**

Показатели			Пациенты с РС (n=11)	Здоровые доноры (n=11)
Данные без ингибитора		%	5,0 (3,0;7,0)	5,0 (2,2;25,0)
На фоне блокады	Sema4D	%	7,0 <sup>1,2</sup> (4,0;12,0)	16,5 <sup>1</sup> (12,5;22,5)
	CD72	%	6,0 (4,0;11,0)	15,0 (3,0;26,0)

Схожие эффекты мы наблюдали у пациентов с РС: продукция противовоспалительного цитокина IL-10 В-лимфоцитами в присутствии ингибиторов Sema4D повышалась (в отличие от противоположных изменений для провоспалительных цитокинов) ( $p=0,008$ ) (табл. 4.14). При этом у ЗД изменение синтеза противовоспалительного цитокина IL-10 на фоне блокады Sema4D/CD100 было более выражено при сравнении с группой пациентов с РС ( $p=0,004$ ) (табл. 4.14).

Схематичное отображение изменения профиля синтезируемых В-клетками цитокинов в условиях блокады Sema4D и CD72 у пациентов с РС представлено на рис. 4.8.

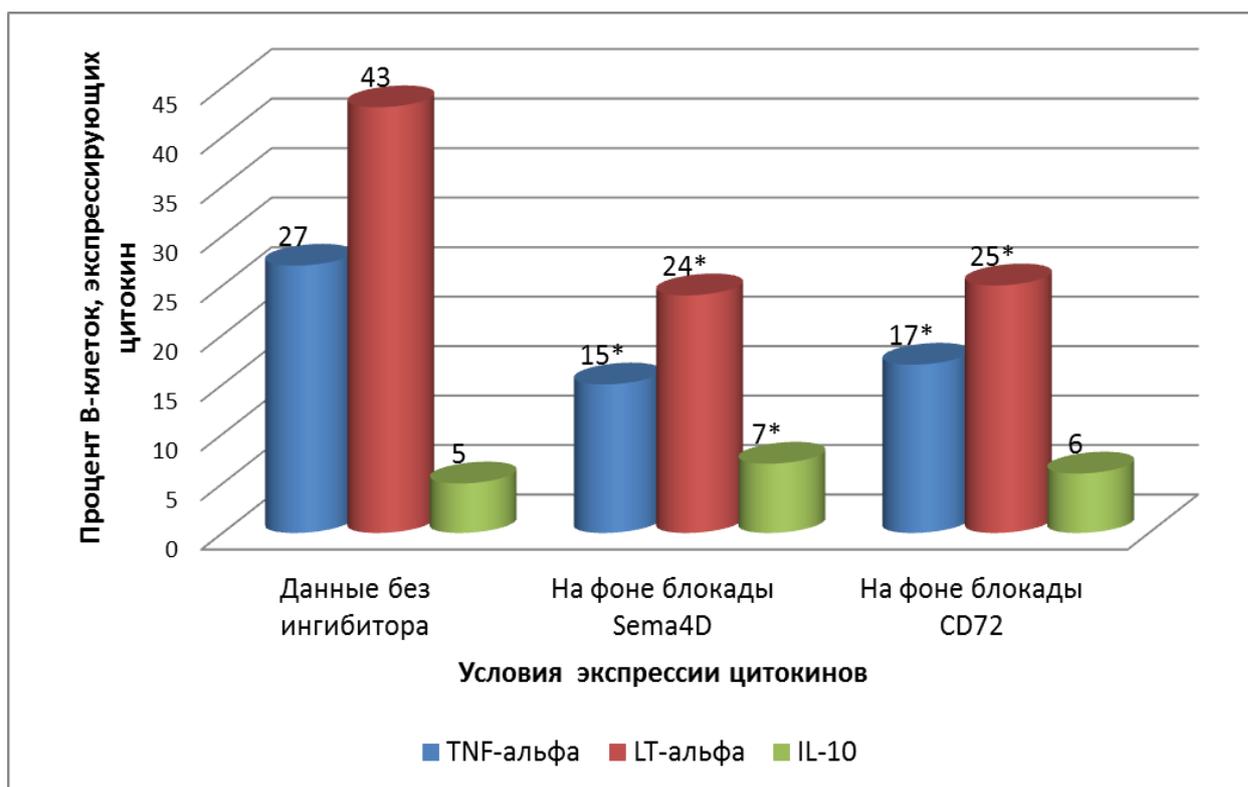


Рис. 4.8. Изменение профиля цитокинов, продуцируемых CD19<sup>+</sup> клетками, на фоне блокады Sema4D-CD72 сигнала у пациентов с РС

Здесь: \* -  $p < 0,05$  в сравнении с вариантом без применения ингибитора для соответствующего цитокина

Данные ингибиторного анализа показывают участие Sema4D в активации продукции провоспалительных цитокинов В-лимфоцитами через рецептор CD72, так как на фоне блокады как самого семафорина, так и его рецептора происходили схожие изменения профиля синтезируемых В-лимфоцитами провоспалительных цитокинов. Что касается противовоспалительного цитокина IL-10, то увеличение доли В-клеток, продуцирующих данный цитокин, происходило на фоне блокады Sema4D.

По данным литературы при связывании мембранного Sema4D/CD100 (Т-клеточного) с рецептором CD72 на мембране В-лимфоцитов сигнал передается в обе клетки, причем и для Т-, и для В-клеток Sema4D-зависимый сигнал является стимулирующим [159]. В связи с этим обнаруженное нами на фоне блокады Sema4D или CD72 снижение процента В-клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$  и LT- $\alpha$  предполагает

участие семафорина Sema4D/CD100 в активации В-клеточного звена при РС при взаимодействии с рецептором CD72.

#### **4.6. Клинические примеры**

В совокупности обследуемых представлены пациенты с более доброкачественными вариантами РС, хотя говорить о них можно лишь ретроспективно [31], и вариантами более агрессивного течения заболевания. Следующие клинические примеры иллюстрируют особенности развития заболевания у пациентов и иммунологических данных.

#### **Пример «классического» дебюта ремиттирующего РС с ретробульбарного неврита (дебют по типу клинически изолированного синдрома), фаза ремиссии на момент обследования**

Пациентка З., 21 год, студентка. Из анамнеза: Заболела без видимых причин остро с 20.01.2012г. – установлен диагноз «Ретробульбарный неврит правого глаза», снижение зрения до 0,02 некорректируемое, при лечении ГКС – восстановление зрения до 0,04-0,05 некорректируемое, при выписке сохраняются множественные абсолютные скотомы в поле зрения правого глаза. Затем наблюдалось постепенное восстановление зрения.

Неврологический статус на момент осмотра: зрение 0,8 некорректируемое справа, 1,0 слева, нистагма нет, легкая недостаточность VII и XII пар черепных нервов справа. Сила в мышцах рук и ног не снижена. Оживление сухожильных рефлексов с рук и ног D=S. Патологические знаки: кистевые Россолимо. Легкая неустойчивость в позе Ромберга с закрытыми глазами, пальце-носовую пробу, пяточно-коленную пробу выполняет уверенно. Тазовых нарушений нет. EDSS=1,5 балла (1+1+1+1+0+0+0+0).

МРТ-исследование: МРТ головного мозга 31.01.2012г. – множественные очаги демиелинизации без признаков перифокального отека. МРТ головного мозга с контрастированием 24.08.2012г. – выраженная отрицательная динамика в виде появления новых очагов демиелинизации субтенториально в мосте, также полушариях мозжечка, в белом веществе,

мозолистом теле, без признаков активности заболевания, очаги без признаков перифокального отека.

Диагноз: РС. Цереброспинальная форма. Ремиттирующее течение. Стадия относительной ремиссии. Рефлекторный тетрапарез. Легкие стволовые нарушения. Частичная атрофия зрительного нерва справа нисходящая (последствия ретробульбарного неврита правого глаза). Сопутствующие заболевания – Миопия I степени обоих глаз. Состояние после операции по коррекции миопии LASIK на оба глаза (2009г.).

Объем проводимого лечения: Сосудистая, ноотропная терапия, тиоктовая кислота, витамины группы В. ГКС - ретробульбарно и в/в пульс-терапия дексаметазоном с 24 мг с переходом на таблетки преднизолон с 60 мг по схеме в условиях глазного отделения стационара (госпитализация с 25.01.2012г. по 11.02.2012г.) с неполным восстановлением зрения справа. В данном случае диагноз подтвержден после повторной МРТ головного мозга. Пациентке начата ИМТ Glatiramera acetate 20 mg ежедневно подкожно с августа 2012г. Клиническое состояние в течение года стабильное. Обострений не было. EDSS=1,5 балла.

Иммунологические показатели данной пациентки представлены в табл. 4.15.

Таблица 4.15

**Исследуемые иммунологические показатели пациентки 3.**

Показатели		Индивидуальные данные пациентки, Me [LQ;UQ]	Значения показателей для всей группы обследованных пациентов с РС, Me [LQ;UQ]
1		2	3
MFI (y.e.)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	104,0	165,0 (122,0;216,0)
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	109,0	171,0 (123,8;213,5)
	CD3 <sup>-</sup>	36,0	74,5 (44,9;105,9)

1		2	3
sSema 4D (нг/мл)	плазма	14,5	4,6 (2,9;5,9)
	супернатанты клеточной культуры 18ч., спонтанный вариант	27,1	31,5 (27,1;39,1)
	супернатанты клеточной культуры 18ч., активатор ФМА+ иономицин	26,9	40,5 (28,8;51,5)

На момент обследования пациентка пребывала в ремиссии 296 дней. Уровень растворимого семафорина в плазме крови пациентки повышен в сравнении со здоровыми и донорами и даже пациентами с РС. Возможно, это обусловлено небольшой давностью заболевания. Интересно отметить, что уровень экспрессии Sema4D в этом клиническом случае ниже, нежели в совокупности пациентов с РС, что лишь предполагает реципрокное повышение уровня растворимого семафорина после слущивания с мембраны лимфоцитов, но не было доказано нами при оценке всей исследуемой группы.

**Пример РС с распространенным вовлечением в демиелинизирующий процесс спинного мозга, фаза ремиссии на момент обследования**

Пациентка М., 33 года, работает. Из анамнеза: Заболела с весны 2008г. – неловкость в правой ноге, регресс симптомов за 1 месяц, за медицинской помощью не обращалась. С 2010г. – прогрессирует слабость в ноге, несистемные головокружения. Госпитализирована по м\ж в марте 2011г. ввиду тазовых нарушений по типу задержки. Диагноз РС установлен во время лечения в стационаре г. Перми, получала курс ГКС в апреле 2011г. со значимым регрессом симптомов. Ухудшение с начала января 2012г. –

несистемное головокружение, координаторные нарушения, слабость в левой, затем правой ноге, неловкость правой руки и ее онемение. Данное обострение вновь потребовало лечения ГКС, сохранена остаточная симптоматика.

Неврологический статус: Нистагма нет, дисфагия редко. Сила 4 балла в левой ноге, 3,5 в правом бедре. Проба Барре «+» с ног справа. Не может ходить на пятках за счет правой стороны, шаткость. На правой ноге прыгает не более 2-х раз, слева не более 4-х раз при норме 10 и более. Сухожильные рефлексы D=S, оживлены с рук, высокие с ног, Патологические знаки: клонус правой стопы. Постоянные парестезии правой кисти, левого бедра. Адиадохокинез справа. Умеренная неустойчивость в позе Ромберга с закрытыми глазами, хождение по прямой линии невозможно, пальце-носовая и пяточно-коленная пробы с легким интенционным дрожанием справа. Частые императивные позывы на мочеиспускание. Усталость. EDSS=4 балла (0+1+3+3+0+2+1+1).

МРТ-исследование: МРТ головного мозга с контрастированием 01.04.2011г. – демиелинизирующий процесс головного мозга, множественные очаги демиелинизации с выраженной активностью. МРТ шейного и грудного отдела с контрастированием 01.04.2011г. – очаги демиелинизации на уровне С6-С7, Th1-Th2, Th3, Th6-Th7 с перифокальным отеком, 2 из них с накоплением контраста. МРТ головного мозга 19.07.2011г. – без активности процесса. МРТ головного мозга 17.02.2012г. – демиелинизирующий процесс головного мозга с признаками активности, отрицательная динамика в сравнении с 19.07.2011г., увеличение количества и размеров очагов демиелинизации, очаги с выраженным перифокальным отеком, накопление контраста сплошное, также по кольцевидному типу в 4-х очагах демиелинизации, смешанная заместительная гидроцефалия. МРТ шейного отдела спинного мозга с контрастированием 17.02.12г. – очаг демиелинизации на уровне С1-С2. МРТ грудного отдела с

контрастированием 17.02.2012г. – очаги демиелинизации преимущественно на верхнегрудном уровне.

Диагноз, форма, течение: РС. Цереброспинальная форма. Ремиттирующее течение. Стадия относительной ремиссии. Умеренный спастический тетрапарез выраженный в нижних конечностях и справа. Умеренный атактический синдром. Умеренные стволовые нарушения (дисфагия). Сопутствующие заболевания – Миопия III ст.

Объем проводимого лечения: Сосудистая, ноотропная терапия курсами, в том числе в феврале 2012г. (октолипен, цераксон, кортексин). ГКС метипред 5 г на курс с 01.04.2011г. по 22.04.2011г. со стабилизацией состояния. ГКС в стационаре по месту жительства (госпитализация с 10.01.12 по 31.02.12, курс ГКС начат с 20.01.12 – дексаметазон по схеме с переходом на рег ос прием таблеток преднизолон со стабилизацией состояния. Начата ИМТ Interferoni beta-1a 44 мкг 3 раза в неделю подкожно с апреля 2012г. За год терапии – обострение в октябре 2012г. с последующим курсом ГКС метипред 5 г, с остаточным неврологическим дефицитом. EDSS=4 балла. Обсуждалась необходимость добавления в перспективе терапии митоксантроном к основному лечению во избежание прогрессирования заболевания.

Иммунологические показатели данной пациентки представлены в табл. 4.16.

Таблица 4.16

**Исследуемые иммунологические показатели пациентки М.**

Показатели		Индивидуальные данные пациентки, Me [LQ;UQ]	Значения показателей для всей группы обследованных пациентов с РС, Me [LQ;UQ]
MFI (y.e.)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	112	165,0 (122,0;216,0)
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	108	171,0 (123,8;213,5)
	CD3 <sup>-</sup>	98	74,5 (44,9;105,9)
sSema4D (нг/мл)	плазма	2,5	4,6 (2,9;5,9)
	супернатанты клеточной культуры 18ч., спонтанный вариант	31,5	31,5 (27,1;39,1)
	супернатанты клеточной культуры 18ч., активатор ФМА <sup>+</sup> иономицин	40,3	40,5 (28,8;51,5)
Экспрессия рецептора для Sema4D – CD72 – на В-лимфоцитах	% CD19 <sup>+</sup> клеток	27,6	17,3 (14,1;23,5)
	% CD72 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup> клеток	49,0	43,7 (36,4;47,8)
	MFI CD72, y.e.	68,0	49,7 (40,7;77,2)

На момент обследования пациентка пребывала в ремиссии 86 дней. В данном клиническом случае обращает на себя внимание повышенный уровень экспрессии Sema4D на неТ-клеточной (CD3<sup>-</sup>) популяции лимфоцитов, включающей и В-лимфоциты. Указывается, что пациентам с преобладанием В-клеточных механизмов заболевания свойственен меньший клинический ответ на гормональную терапию [31], что и имело место у данной пациентки. Не случайно ввиду отсутствия должного ответа на ГКС-

терапию и частоту эскалаций была предложена терапия препаратом митоксантрон, вызывающим иммуносупрессию как Т-, так и В-клеточного звеньев иммунной системы пациентов. Невысокий уровень растворимого семафорина заставляет предполагать возможное преобладание дегенеративного, нежели воспалительного компонента заболевания у пациентки.

### **Пример агрессивного течения РС с неэффективностью терапии ГКС, фаза эскалации на момент обследования**

Пациент К., 24 года, работает. Из анамнеза: Указывает на длительный стресс на работе. Онемение правой руки и слабость за полгода до данной эскалации, регресс симптомов за 1 неделю. С начала февраля 2013г. стал отмечать рассеянность внимания, боли в правом плечевом суставе, онемение пальцев правой руки, поднимающееся снизу вверх, далее стала присоединяться слабость в правой руке. С 08.02.2013г.- онемение ног, распространяющееся снизу вверх до бедер, онемение левой руки с 11.02.2013г.

Неврологический статус: нистагма нет, сглажена левая носогубная складка. Ходит более 500м. Сила в правой руке 3,5 балла, слабость преимущественно в кисти. В бедрах сила 4,5 балла. Высокие сухожильные рефлексы с рук  $D \geq S$ , с ног - высокие  $S = D$ , кистевые знаки Россолимо, клониды стоп. Брюшные рефлексы D отсутствуют, S живые. Отсутствие вибрационной чувствительности в ногах, гипестезия правой руки, отсутствие глубокой чувствительности в правой кисти. В позе Ромберга легкая неустойчивость, пальце-носовая проба справа с дисметрией из-за слабости. Тазовых нарушений нет (отрицает). Утомляемость выраженная. EDSS=4 балла (0+1+3+2+3+0+2+1).

Диагноз, форма, течение: РС. Цереброспинальная форма. Ремиттирующее течение. Стадия эскалации. Умеренный спастический тетрапарез с акцентом в правой руке. Выраженные чувствительные

нарушения (отсутствие вибрационной чувствительности в ногах, гипестезия правой руки, отсутствие глубокой чувствительности в правой кисти, онемение 4-х конечностей). Легкий атактический синдром. Астенический синдром выраженный. Сопутствующие заболевания – ЗЧМТ, сотрясение головного мозга (02.01.2013г.).

МРТ-исследование: МРТ головного мозга (11.02.2013г.) – демиелинизирующий процесс головного мозга, до 10 очагов демиелинизации в белом веществе лобных и теменных долей, выраженный перифокальный отек вокруг очагов, накопление контраста в множестве очагов по кольцевидному, сплошному и типу полукольца. МРТ шейного отдела с контрастированием (11.02.2013г.) – очаги демиелинизации в спинном мозге на уровнях С2-С3, С3-С4, с зоной перифокального отека, признаки активности заболевания виде накопления контраста в очагах демиелинизации по разному типу (кольца, полукольца, диффузное), гемангиомы тел С6, Th1. Общее количество контрастируемых очагов до 10 (выраженная активность заболевания).

Объем проводимого лечения: Назначен курс ГКС условиях стационара в феврале 2013г. С учетом отсутствия динамики в состоянии на фоне проведения ГКС-терапии было проведено 5 сеансов плазмафереза с улучшением состояния, но сохранением остаточного неврологического дефицита, длительный курс поддерживающей терапии ГКС 5 мг per os в сутки 1 мес. Начато применение перорального препарата финголимод ежедневно в качестве первой линии терапии в мае 2013г. Несмотря на отсутствие явных обострений в течение года, отмечено увеличение баллов по отдельным FS, в частности, усиление тазовых нарушений в виде императивных позывов и неудержания (FS6=3), формирование стойкой усталости (FS7=2). Через год уровень EDSS=4 балла.

Иммунологические показатели данного пациента представлены в табл. 4.17.

Таблица 4.17

**Исследуемые иммунологические показатели пациента К.**

Показатели		Индивидуальные данные пациента, Ме [LQ;UQ]	Значения показателей для пациентов с РС, Ме [LQ;UQ]	Значения показателей для пациентов с РС в стадии эксацербации, Ме [LQ;UQ]
MFI (y.e.)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	87	165,0 (122,0;216,0)	179,0 (152,0;200,0)
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	108	171,0 (123,8;213,5)	172,5 (140,0;200,0)
	CD3 <sup>-</sup>	44	74,5 (44,9;105,9)	60,0 (48,0;82,0)
sSema 4D (нг/мл)	плазма	7,8	4,62 (2,92;5,88)	7,08 (3,37;9,63)

Этот пациент был обследован нами на 15-й день эксацербации. Данный клинический случай иллюстрирует снижение уровня экспрессии семафорина на популяциях Т-лимфоцитов. Наличие более высокого уровня растворимого семафорина в сравнении с совокупностью обследованных пациентов предполагает действие данной молекулы не только на периферии, но и в ЦНС, особенно принимая во внимание яркие нейровизуализационные особенности этого пациента и быстрое прогрессирование неврологического дефицита в данном случае.

**Пример агрессивного течения РС с выраженными МРТ-изменениями,  
фаза эксацербации на момент обследования**

Пациентка С., 40 лет, работает. Из анамнеза: Тазовые нарушения по типу императивных позывов в течение 2-х лет. Весной 2012г. на фоне острой респираторной вирусной инфекции – шаткость с регрессом за 2 недели. На фоне трахеита, ринита с 14.04.2013г. – пошатывание при ходьбе, с 22.04.13 –

диплопия и нечеткость зрения, головокружения. Осмотрена неврологом 30.04.13, зафиксирован горизонтальный нистагм при взгляде влево и координаторные расстройства. После курса лечения с применением гормонотерапии и плазмафереза значимый регресс неврологических нарушений. Проводился клинический дифференциальный диагноз с острым рассеянным энцефаломиелитом (ОРЭМ, G.04, возвратный? мультифазный?). С учетом отрицательной клинической и МРТ-динамики установлен диагноз РС. Повторное ухудшение с августа 2013г. – постепенное развитие двоения, шаткости.

Неврологический статус: острота зрения 1,0, нистагм умеренный влево, умеренная недостаточность VI пары слева, асимметрия лица справа, снижение слуха на левое ухо, поперхивание периодически. Способна пройти 500 метров. Сила в конечностях достаточная. Сухожильные рефлексy D=S оживлены, кистевые знаки Россолимо. Брюшные рефлексy ослаблены. Гипестезия левой руки. В позе Ромберга неустойчива умеренно, не может пройти по прямой линии, пальце-носовая проба с интенционным дрожанием с 2-х сторон. Функция тазовых органов – императивные позывы на мочеиспускание умеренные. Выраженная усталость. EDSS=4 балла (0+2+1+3+2+2+2+1).

МРТ-исследование: МРТ головного мозга с контрастированием (03.05.2013г.) – множество очагов демиелинизации супра- и субтенториальных от 0,4 до 2,6 см, с зоной перифокального отека, количество до 62 очагов, при этом выраженная активность процесса – накопление контраста (Магневист) одновременно в 25 очагах демиелинизации по однородному и кольцевидному типам. МРТ головного мозга с контрастированием (07.09.2013г.) – отрицательная динамика, увеличение количества очагов, множество с зоной перифокального отека, в части очагов регрессировал перифокальный отек и уменьшение размеров в сравнении с 03.05.13, общее количество до 72 очагов, накопление контраста в 23 очагах демиелинизации по однородному и кольцевидному типам.

Диагноз, форма, течение: РС, цереброспинальная форма, ремиттирующе-рецидивирующее течение, стадия эксцелерации. Рефлекторный тетрапарез. Легкий атактический синдром. Выраженные стволовые нарушения. Тазовые нарушения в виде императивных позывов на мочеиспускание. Астено-депрессивный синдром. Сопутствующие заболевания – Нейросенсорная тугоухость слева. Хроническая герпетическая инфекция, частые рецидивы. Хронический ринит. Аллергический бронхит.

Объем проводимого лечения: Гормональная терапия в условиях неврологического отделения по месту жительства с 07.05.13 по 28.05.13г.г. – преднизолон в\в капельно (суммарные дозы не указаны), также плазмаферез 5 сеансов через день на фоне ГКС-терапии, с положительной динамикой. Препараты тиоктовой кислоты, вит. В6, кавинтон, никотиновая кислота, тагиста курсами. Антидепрессанты с августа 2013г. – флуоксетин 20 мг утром. Назначены ГКС в условиях неврологического отделения с 11.09.13 по 27.09.13 (для купирования обострения, имевшего место на момент осмотра) – дексаметазон с 32 мг в\в кап., с переходом на таблетки преднизолон. Начата ИМТ Glatiramera acetate 20 mg ежедневно подкожно с сентября 2013г. За время годичного наблюдения обострение в январе 2013г. с глазодвигательными расстройствами с регрессом. В дальнейшем планировалось усиление терапии митоксантроном при необходимости. EDSS в течение года=3,5 балла.

Иммунологические показатели данной пациентки представлены в табл. 4.18.

Таблица 4.18

**Исследуемые иммунологические показатели пациентки С.**

Показатели		Индивидуальные данные пациентки, Ме [LQ;UQ]	Значения показателей для пациентов с РС, Ме [LQ;UQ]	Значения показателей для пациентов с РС в стадии эксацербации, Ме [LQ;UQ]
MFI (y.e.)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	152	165,0 (122,0;216,0)	179,0 (152,0;200,0)
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	173	171,0 (123,8;213,5)	172,5 (140,0;200,0)
	CD3 <sup>-</sup>	95	74,5 (44,9;105,9)	60,0 (48,0;82,0)
sSema 4D (нг/мл)	плазма	10,0	4,6 (2,9;5,9)	7,1 (3,4;9,6)

Пациентка была обследована на 30-й день эксацербации. Повышение экспрессии Sema4D на популяции лимфоцитов, включающих В-клетки (CD3), также является отражением преобладания В-клеточного компонента заболевания и объяснением эффективности плазмафереза для купирования проявлений эксацербации в этом случае. Растворимая форма семафорина повышена в сравнении с медианой в группе пациентов с обострением РС и может оказывать действие непосредственно в ЦНС при использовании другого рецептора plexin-B1, подразумевающее демиелинизацию нервных волокон.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ (ЗАКЛЮЧЕНИЕ)

Рассеянный склероз остается одним из загадочных и драматичных заболеваний. Увеличение заболеваемости РС за последние десятилетия связано не только с улучшением тактики наблюдения, скорости, доступности и качества неврологического и МРТ обследования, но и является истинным, обусловленным нарушением нейро-иммунно-эндокринных взаимодействий. Оно, в свою очередь, вероятно, обусловлено ролью экзогенных механизмов, реализующих предрасположенность индивидуума к аутоиммунным процессам. Попытки влияния на механизмы демиелинизации и ремиелинизации при РС требуют тщательного подхода, основанного на иммунологических исследованиях. Так, исследования участия белковых молекул семафоринов в росте аксонов привели в дальнейшем к выявлению их вовлеченности в иммунные взаимодействия, с акцентом на роль в поддержании аутоиммунитета.

Вовлечение Sema4D в патогенез РС предположено на основании устойчивости Sema4D/CD100-дефицитных мышей к развитию ЭАЭ [159], развития ЭАЭ после трансгенной экспрессии укороченной формы Sema4D/CD100 [189], обнаружения повышенного уровня Sema4D/CD100 у человека при аутоиммунном заболевании HTLV1-ассоциированной миелопатии [169], а также на основании вызываемого растворимой формой Sema4D/CD100 *in vitro* апоптоза нейрональных предшественников и незрелых олигодендроцитов [169]. Следует отметить, что рецептор для данного Sema4D в иммунной системе, CD72, присутствует на В-лимфоцитах, непосредственно участвующих в развитии аутоиммунного воспаления при РС [5, 50, 71], и Sema4D-CD72-зависимый сигнал контролирует активацию В-клеток [98].

Основываясь на предыдущем опыте зарубежных ученых, мы разработали алгоритм обследования пациентов с РС с целью выяснения

участия семафорина Sema4D/CD100 в демиелинизации. И наши ожидания были оправданы.

В нашем исследовании были обнаружены повышенный уровень экспрессии (MFI) Sema4D/CD100 интактными Т-лимфоцитами у пациентов с РС, а также, по-видимому, более интенсивное отщепление (слущивание) этой молекулы от мембраны в случае клеточной активации, что выражается в снижении доли CD100<sup>+</sup> клеток у пациентов с РС в случае 18-часового культивирования. У пациентов с РС также происходило более интенсивное и резкое снижение уровня экспрессии Sema4D/CD100 (MFI) на фоне активации CD3<sup>+</sup>клеток в сравнении с ЗД. Подобный феномен снижения уровня мембранного семафорина может иметь место *in vivo* при ответе Т-лимфоцитов на антиген как в иммунной системе, так и при активации аутореактивных Т-клеток в ЦНС. Поэтому выявленные нами эффекты свидетельствуют о возможном участии белковой молекулы Sema4D/CD100 в патогенезе РС.

Проведенное нами исследование выявило повышение уровня sSema4D в плазме крови у пациентов с РС в сравнении с группой контроля и усиление его образования в условиях, моделирующих иммунный ответ (активация клеток в 18-часовой клеточной культуре). Учитывая тот факт, что по данным литературы sSema4D препятствует миелинизации нервных волокон, вызывая апоптоз *in vitro* незрелых олигодендроцитов [169], мы можем считать обнаруженное значимое увеличение уровня sSema4D в плазме крови пациентов с РС отражением происходящих при данном заболевании процессов демиелинизации.

Нам не удалось проследить значимых различий в уровне экспрессии мембранной формы Sema4D/CD100 и уровне растворимого семафорина (sSema4D) в плазме в группах пациентов с РС, выделенных по возрасту, возрасту дебюта заболевания, длительности заболевания, баллу EDSS и скорости прогрессирования. Отличий между представителями женского и мужского пола по уровню экспрессии Sema4D/CD100 у пациентов с РС

также не обнаружено, что предполагает функциональную обособленность данного показателя.

Сходные «отрицательные» данные были получены при сравнении вышеописанных показателей экспрессии семафорина в стадии ремиссии и экзацербации РС, что предполагает отсутствие зависимости экспрессии Sema4D/CD100 от стадии демиелинизирующего процесса.

Следует указать, что ожидаемая обратная корреляционная зависимость у пациентов с РС между уровнем экспрессии Sema4D/CD100 на мембране *ex vivo*, уровнем экспрессии Sema4D/CD100 в активированной 18-часовой клеточной культуре и уровнем sSema4D в супернатантах активированной 18-часовой клеточной культуры не нашла подтверждения в процессе нашего исследования.

Для пациентов в стадии ремиссии РС выявлена обратная корреляция между уровнем sSema4D в плазме и длительностью болезни, что предполагает преобладание воспалительного компонента и процессов демиелинизации на ранних этапах заболевания. Для группы пациентов с обострением РС была установлена прямая корреляция между уровнем sSema4D в плазме и количеством активных очагов в головном мозге, отражающих воспалительный процесс в ЦНС.

Нами предложена модель участия Sema4D/CD100 и его рецептора CD72 в иммунопатологии РС на основании полученных в нашем исследовании данных (рис. 4.9). В целом, показанное в работе повышение экспрессии Sema4D в иммунной системе при рассеянном склерозе позволяет предложить как минимум два механизма участия семафорина в патогенезе данного заболевания. С одной стороны, учитывая, что Sema4D способен вызывать апоптоз незрелых нейронов и олигодендроцитов [169], у пациентов с РС он, по-видимому, оказывает непосредственное поражающее действие на нервные ткани, причем эффекты эти обеспечиваются как растворимым семафоринем, проникающим через нарушенный при РС ГЭБ, так и мембранным, за счет инфильтрации ЦНС Т-лимфоцитами и их активации в

ответ на аутоантигены. С другой стороны, поскольку мембранный Sema4D может выступать не только в качестве лиганда, но и как рецептор, проводя сигнал в саму Т-клетку, причем сигнал костимулирующий, усиление его экспрессии при РС способствует, очевидно, повышенной активации Т-лимфоцитов, в том числе аутоспецифичных Т-клеток – как во вторичных лимфоидных органах, так и в ЦНС (рис. 4.9).

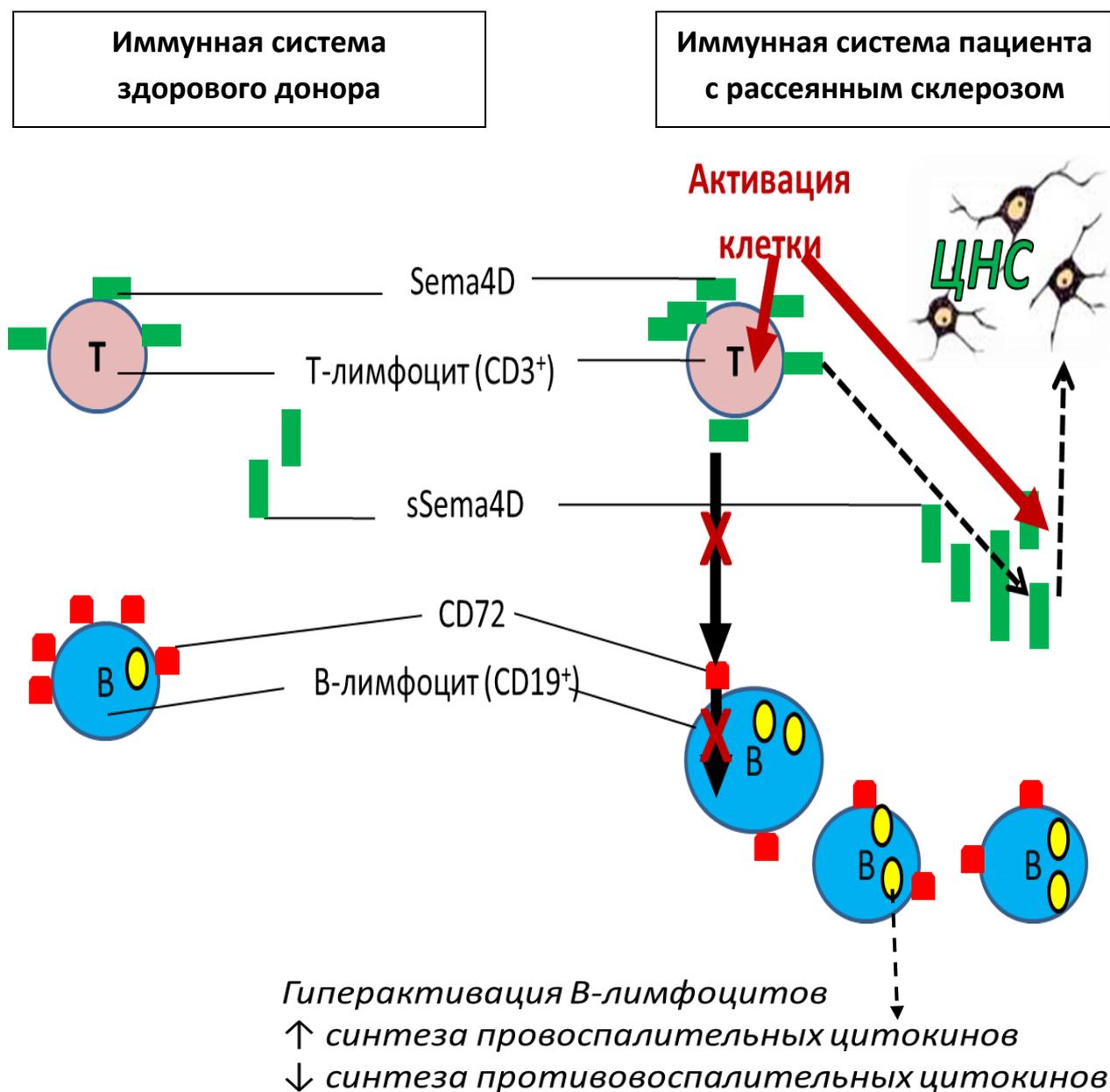


Рис. 4.9. Гипотетическая схема воздействия семафорина Sema4D/CD100 на клетки иммунной системы здоровых доноров и пациентов с РС.

У пациентов с РС повышена экспрессия семафорина Sema4D на мембране Т-лимфоцитов, что может быть причиной их гиперактивации, в том числе аутоспецифических Т-клеток (рис. 4.9). Повышение уровня растворимого семафорина (sSema4D) в иммунной системе у пациентов с РС предполагает его действие и в нервной системе – на нейроны и олигодендроциты [169] (рис. 4.9).

Наряду с этим, важно учитывать, что Sema4D может оказывать действие не только на нервные клетки, но и на иммунные, реализуя свои эффекты в иммунной системе через мембранную молекулу CD72. И основная популяция лейкоцитов, экспрессирующих данный рецептор – В-лимфоциты. Поэтому следующим этапом нашей работы была оценка экспрессии В-клетками CD72 и роли Sema4D-CD72-зависимого сигнала в контроле функций этих клеток. Мы установили, что у пациентов с РС экспрессия CD72 на В-лимфоцитах снижена (рис. 4.9), а ингибиторный анализ выявил участие Sema4D-CD72-зависимого сигнала в активации продукции В-лимфоцитами таких пациентов провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$  и LT- $\alpha$ ) и, напротив, в подавлении синтеза провоспалительного, IL-10 (рис. 4.9). Известно, что молекула CD72 является негативным регулятором активации В-лимфоцитов [138], а связывание ее с Sema4D отменяет ингибиторный сигнал, усиливая активацию [98]. В связи с этим, полученные в работе данные позволяют предложить еще один механизм участия семафорина в патогенезе РС – за счет CD72-зависимой гиперактивации В-лимфоцитов – как в периферической иммунной системе, так и в ЦНС (рис. 4.9), учитывая интенсивную инфильтрацию В-клетками нервной ткани при исследуемой патологии [15, 50, 119]. Дополнительный вклад в этот процесс вносит, по-видимому, повышение экспрессии Sema4D в иммунной системе при РС, а также увеличение у таких пациентов доли В-лимфоцитов в периферической крови (рис. 4.9).

Влияние опосредованного Sema4D/CD100 механизма на гиперактивацию В-лимфоцитарного звена в патогенезе РС особенно

актуально в связи с продолжающимся поиском новых терапевтических стратегий для терапии данного заболевания, в частности, с подавлением функции В-клеток при использовании моноклональных антител [2, 50, 191]. Учитывая выявленное в работе участие семафорина Sema4D в активации В-лимфоцитов, терапия моноклональными антителами к семафору, фактически, будет решать те же задачи, что и ритуксимаб, но при этом, теоретически, еще и блокировать негативные процессы в центральной нервной системе, связанные с семафорин-зависимым апоптозом олигодендроцитов. Однако по-прежнему неясен вопрос о выраженности ответа на подобную терапию ввиду иммунологической гетерогенности РС.

Мы поддерживаем мнение о перспективности и целесообразности патогенетического вмешательства в процесс ремиелинизации при РС, что может препятствовать накоплению неврологического дефицита и замедлению происходящего при данном заболевании непрерывного патологического процесса. И исследуемые нами семафорины могут оказаться кандидатами для использования в этих целях. Их ингибирование возможно является терапевтической мишенью при лечении РС для предотвращения продукции энцефалитогенных Т-клеток и уменьшения выраженности воспалительных изменений и нервного повреждения при продолжающихся атаках данного заболевания [137].

Сложность использования полученных нами данных обусловлена общепризнанной гетерогенностью РС, отчасти недоступностью дорогостоящего оборудования, необходимого для современных исследований, в рутинной клинической практике, а также затруднением интерпретации подобных данных.

Представляется перспективным исследование анти-Sema4D-блокирующих антител при демиелинизирующих заболеваниях нервной системы, в том числе и при РС. Усиление экспрессии данного семафорина при РС должно вносить вклад в регуляцию иммунных реакций у таких пациентов.

Вместе с тем продолжают подвергаться изучению разнообразные функции семафоринов в физиологических и патогенетических процессах, включая развитие сердца, рост сосудов [170], разрастание опухоли [52] и регуляцию функций иммунных клеток [178, 183].

Было установлено, что семафорины вовлечены в ряд заболеваний человека, таких как образование опухолей (саркомы мягких тканей, хронический В-клеточный лейкоз, рак груди, почек, яичников, поджелудочной железы, аденокарцинома простаты) [101] их метастазирование, нейродегенеративные заболевания, внезапная смерть [182] и иммунные нарушения [144]. Удаление Sema4D/CD100 у мышей защищает животных от атеросклероза, уменьшая гиперактивность тромбоцитов при гиперлипидемии или васкуляризацию интимы сосудов [101]. Исследование уровня растворимого семафорина у пациентов с сердечной недостаточностью выявило его повышение при данной патологии в сравнении со здоровыми донорами, особенно при наличии сопутствующего заболевания в виде сахарного диабета [101].

Показана способность передачи сигналов клеткам семафоринами при некоторых аутоиммунных заболеваниях, аллергических заболеваниях, а также заболеваниях костей (на примере животных мышинных моделей) [182].

Интересным представляется обнаружение учеными повышенного количества растворимой формы Sema4D/CD100 (sSema4D) и при других аутоиммунных заболеваниях: в сыворотке мышей на основании экспериментальной модели системной красной волчанки [88] и у пациентов с системной склеродермией [144].

Клиническая значимость данного маркера при разнообразной патологии была подтверждена дальнейшим исследованием уже и в процессе выполнения нашей научной работы. В частности, имеется патент (США, 21.10.2012г.), касающийся использованием анти-CD100-антител (мышинных моноклональных антител BD16 и BB18) с целью нейтрализации молекулы CD100 и блокировки ее связи с альтернативным рецептором для

исследуемого семафорина – плексином-В1 – в нервной системе для терапии аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний. Блокирование CD100 в данном случае должно приостанавливать демиелинизацию и аксональную дегенерацию, ведь CD100 экспрессируется на олигодендроцитах и способствует дегенерации аксонов. Применение моноклональных антител против CD100 на моделях ЭАЭ у мышей нивелировало его проявления. Учитывая, что начальная фаза большинства нейровоспалительных заболеваний, включая РС, подразумевает вовлечение в патогенез иммунных клеток, для использования терапии в виде моноклональных антител против CD100 в клинической практике необходимо учитывать и принимать во внимание действие семафорина CD100 не только в ЦНС, но и на периферии – в иммунной системе.

Нельзя не отметить начавшееся с декабря 2012г., уже в процессе нашей научной работы, мультицентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование I фазы в США: сравнение безопасности, переносимости и фармакокинетические параметры внутривенного введения препарата VX15/2503 с плацебо (ClinicalTrials.gov, number:NCT01764737). Ожидаются сведения о результатах данного протокола. В материалах последнего конгресса Европейского комитета по исследованию и лечению РС (г. Бостон, США, сентябрь 2014г.) опубликованы материалы по перспективности использования синтезированных моноклональных антител против Sema4D/CD100 с целью способствования развитию, дифференциации и миграции КПО и процессу ремиелинизации при РС [40]. Группой ученых из США в 2014 году указано на участие Sema4D/CD100 в подавлении ремиелинизации при нейродегенеративных заболеваниях, на его способность проникать через ГЭБ [166]. Произведен ряд экспериментов с помощью созданного исследователями моноклонального антитела, где анти-Sema4D *in vitro* способствует выживанию КПО и их дальнейшей дифференциации, а *in vivo* – подавлению экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита на

животных моделях, что обусловлено сохранением целостности ГЭБ и способности КПО к миграции к очагам демиелинизации [166]. Показана способность Sema4D/CD100 на созданной *in vitro* модели ГЭБ разрушать эндотелиальные соединения, нарушая тем самым проницаемость ГЭБ, а его восстановление возможно при применении антител, блокирующих данный семафорин [166]. Активно исследуются возможности влияния блокирования молекулы Sema4D/CD100 моноклональными антителами на уменьшение нейродегенеративных процессов, имеющих место и при РС, на примере мышинной модели болезни Гентингтона [41].

Маловероятно, что лишь один новый возможный механизм воздействия остановит дальнейшие поиски терапевтических мишеней для терапии РС. Однако мы считаем целесообразным дальнейшее исследование аспектов участия семафорина Sema4D/CD100 в патогенезе аутоиммунных заболеваний на примере данной нозологической формы.

## ВЫВОДЫ

1. Наивные пациенты с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза характеризуются легкой степенью инвалидизации по шкале EDSS и умеренной скоростью прогрессирования заболевания, повышенным уровнем тревожности на уровне субклинической в сравнении со здоровыми донорами и не имеют отличий с данной группой по результатам когнитивного тестирования, при этом результаты нейропсихологического и когнитивного тестирования не различаются в стадии ремиссии и обострения, а нейровизуализационная активность заболевания преобладает при эксацербации рассеянного склероза.
2. Пациенты с ремиттирующим рассеянным склерозом как в стадию ремиссии, так и в стадию обострения имеют повышенный уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 на мембране Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток) при оценке *ex vivo*, а также демонстрируют более интенсивное отщепление этой молекулы от мембраны в случае активации клеток в культуре (показано на примере пациентов в стадии ремиссии заболевания), что может иметь место *in vivo* при ответе Т-лимфоцитов на антиген как в иммунной системе, так и в центральной нервной системе при данной патологии.
3. Уровень растворимого семафорина (sSema4D) повышен в плазме крови у пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом как в стадии ремиссии, так и в стадии обострения, и более интенсивно возрастает в условиях активации клеток в культуре (показано на примере пациентов в стадии ремиссии заболевания).
4. У пациентов с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза снижена экспрессия рецептора для Sema4D/CD100, CD72, на мембране В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup> клеток) в стадии ремиссии, что, учитывая негативную

роль молекулы CD72 в активации В-клеток, может быть одним из механизмов их гиперактивации при данной патологии.

5. Sema4D-CD72-зависимый сигнал задействован в контроле продукции цитокинов В-лимфоцитами, индуцируя у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза синтез провоспалительных цитокинов и препятствуя синтезу противовоспалительных цитокинов, что, учитывая интенсивную инфильтрацию В-клетками центральной нервной системы при данной патологии, по-видимому, вносит вклад в развитие нейровоспаления и демиелинизацию нервных волокон.

6. Уровень экспрессии мембранной формы семафорина Sema4D/CD100 и процент CD100<sup>+</sup> клеток в субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов ассоциирован со значением FS2 стволовых функций, а концентрация растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови имеет обратную корреляционную связь с продолжительностью заболевания у пациентов с рассеянным склерозом в стадии ремиссии и прямую – с количеством контрастируемых очагов в головном мозге у пациентов с рассеянным склерозом в стадии обострения, что доказывает участие семафорина Sema4D/CD100 в патогенезе заболевания.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведенное комплексное фундаментальное исследование вовлеченности семафорина Sema4D/CD100 в патогенез ремиттирующего рассеянного склероза указывает на целесообразность использования этого маркера в качестве мишени при терапии данного заболевания и требует дальнейших исследований с применением соответствующих моноклональных антител.
2. При решении вопроса о применении анти-Sema4D-препаратов (в перспективе) необходимо учитывать эффекты семафорина не только в центральной нервной системе, но и в иммунной системе пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом.
3. Врачам-неврологам, занимающимся лечением пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом, необходимо учитывать гиперактивацию В-клеточного звена иммунной системы данных пациентов для назначения адекватной патогенетической терапии.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белова, А.Н. Шкалы, тесты и опросники в неврологии и нейрохирургии. Руководство для врачей / А.Н. Белова – М.: Медкнига, 2004. – 456 с.
2. Возможности анти-В-клеточной терапии при рассеянном склерозе / Евдошенко Е.П. [и др.]. // Медицинская Иммунология. – 2009. – Том 11, № 1. – С. 63-70.
3. Гусев, Е.И. Лечение рассеянного склероза / Е.И. Гусев // Лечение нервных болезней. – 2004. – № 2 (14). – С. 1-8.
4. Гусев, Е.И. Некоторые клинические и медико-социальные аспекты новых методов патогенетического лечения рассеянного склероза / Е.И. Гусев, А. Н. Бойко // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2001. – Том 101. – № 12. – С. 7-12.
5. Евдошенко, Е.П. В-клетка – мишень при рассеянном склерозе / Е.П. Евдошенко // Практическая медицина. Неврология. Рассеянный склероз, специальный выпуск. – 2013. – № 1-1 (68) – С. 53-54.
6. Желнин, А.В. Эпидемиологические и клинические особенности рассеянного склероза в Пермском крае / А.В. Желнин // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – № 1. – С. 69-71.
7. Ибатуллин, М.М. Магнитно-резонансная томография в диагностике церебральных очагов рассеянного склероза / М.М. Ибатуллин, Т.В. Матвеева, А.Ю. Ануфриев // Неврологический вестник им. В.М. Бехтерева. – 2001. – № 3-4. – С. 78-83.
8. Избранные вопросы современной проточной цитометрии / Под редакцией С.В. Хайдукова, А.В. Зурочка. – Челябинск, 2007. – 84 с.
9. Ионова, Т.И. Исследование качества жизни у больных рассеянным склерозом / Т. И. Ионова // Неврологический вестник – 2010. – Том XLII, вып. 1. – С. 88-94.

10. Киселева, Е.П. Новый класс иммунорегуляторных молекул – факторы, направляющие рост нервов. Материалы 11 Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В. И. Иоффе "Дни иммунологии в Санкт-Петербурге" / Е.П. Киселева, В.И. Людыно // Медицинская иммунология . – 2007 . – Том 9, № 2/3 . – С. 348-349.
11. Ковтун, О.П. Иммунологическая диагностика рассеянного склероза [Электронный ресурс] / О.П. Ковтун, К.С. Невмержицкая, А.Д. Смолкин, А.В. Молдованов // Электронный научный журнал “Системная интеграция в здравоохранении”. – 2010. – № 4(10). – С. 60-69. – Режим доступа: <http://www.sys-int.ru/ru/journals/2010/4-10/immunologicheskaya-diagnostika-rasseyannogo-skleroza>.
12. Маркова, Е.А. Сопряженность врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы при различных вариантах рассеянного склероза / Е.А. Маркова, З.А. Гончарова, Л.П. Сизякина, В.А. Балязин // Практическая медицина. Неврология. Рассеянный склероз, специальный выпуск. – 2013. – № 1-1 (68). – С. 64-66.
13. Моисеев, С.В. Механизмы действия современных препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза / С.В. Моисеев // Русский медицинский журнал. – 2010. – Том 18, № 25. – С. 1644.
14. Нейропротекция: модели, механизмы, терапия / под ред. М.Бэра; пер. с англ.; В.П. Зыкова, П.Р. Камчатнова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2011. – 429 с.: ил., [4] с цв. вкл.
15. Нижегородова, Д.Б. Современные аспекты иммунопатогенеза рассеянного склероза / Д.Б. Нижегородова, М. Эберль, М.М. Зафранская // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2005. – №2. – С. 44 – 55.
16. Носов, М.А. Значение экспериментальных моделей аутоиммунного энцефаломиелита в изучении патогенеза рассеянного склероза / М.А. Носов, Д. Н. Лодыгин, Е.А. Корнева // Нейроиммунология. – 2000. – Том VIII. – № 3-4. – С. 4-14.

17. Носов, М.А. Энцефалитогенные Т-клетки в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита: автореф. дис. на соиск. учен. степ. докт. биол. наук (14.03.13) / Носов Михаил Анатольевич. – Санкт-Петербург. – 2010 – 46 с.
18. Патогенетическое лечение рассеянного склероза: настоящее и будущее / Бойко А.Н. [и др.] // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2009. – № 7. – С. 90-99.
19. Рассеянный склероз / Под ред. Е.И. Гусева, И.А. Завалишина, А.Н. Бойко. – М.: Реал Тайм. – 2011. – 528 с.: ил.
20. Рассеянный склероз: диагностика, лечение, специалисты / Под ред. И.Д. Столярова, А.Н. Бойко. – СПб.: «ЭЛБИ-СПб». – 2008. – 320 с.
21. Рассеянный склероз: избранные вопросы теории и практики / Под ред. И.А. Завалишина, В.И. Головкина. – М.: Минздрав России, НИИ неврологии РАМН. – 2000. – 640 с.
22. Самотруева, М.А. Пути реализации нейро-иммуно-эндокринных взаимодействий / М.А. Самотруева, Д.Л. Теплый, И.Н. Тюренков // Естественные науки. – 2009. – № 4 (29). – С. 112-130.
23. Столяров, И.Д. Нейроиммунодиагностика и оптимальный выбор терапии рассеянного склероза / И.Д. Столяров, А.М. Петров, М.В. Вотинцева, Е.В. Ивашкова // Русский медицинский журнал. – 2011. – № 15. – С. 924-933.
24. Столяров, И.Д. Современные методы диагностики и лечения рассеянного склероза / И.Д. Столяров // Вестник Росздравнадзора. – 2010. – № 4. – С. 64-67.
25. Хайбуллин, Т.И. Патогенетическая гетерогенность рассеянного склероза: ключ к пониманию клинического полиморфизма заболевания и разработке индивидуализированной терапии / Т.И. Хайбуллин, Ф.А. Хабиров, Ф.И. Девликамова, Н.Н. Бабичева // Неврологический вестник им. В.М. Бехтерева. – 2010. – Том XLII. – Вып. 1. – С. 54-65.

26. Хайдуков, С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, Арег А. Тотолян, В.А. Черешнев // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. – № 2-3. – С. 227-238.
27. Хайдуков, С.В. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметрических анализаторов» (Проект) / С.В. Хайдуков, Л.А. Байдун, А.В. Зурочка, Арег А. Тотолян // Медицинская иммунология. – 2012. – Том 14. – № 3. – С. 255-268.
28. Шмаров, Д.А. Лабораторно-клиническое значение проточно-цитометрического анализа крови / Д.А. Шмаров, Г.И. Козинец. – М.: Медицинское информационное агентство. – 2004. – 128 с.: ил.
29. Шмидт, Т.Е. Основные методы патогенетической терапии рассеянного склероза [Электронный ресурс] / Т.Е. Шмидт // Международный неврологический журнал. – 2006. – 3(7). – Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/2513>.
30. Шмидт, Т.Е. Превентивная иммуномодулирующая терапия ремиттирующего рассеянного склероза. Лекция / Т.Е. Шмидт // Неврологический журнал. – 2006. – № 1. – С. 4-8.
31. Шмидт, Т.Е. Рассеянный склероз: руководство для врачей / Т.Е. Шмидт, Н.Н. Яхно. – 2-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2010. – 272 с.: ил.
32. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник / А.А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-медиа. – 2010. – 752 с.: ил.
33. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis / M.R. Lincoln, A. Montpetit, M.Z. Cader et al. // Nat Genet. – 2005 Oct. – 37(10). – P. 1108-1112.

34. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis / V.A. Deshmukh, V. Tardif, C.A. Lyssiotis et al. // *Nature*. – 2013 Oct 17. – 502(7471). – P. 327-332.
35. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord / S. Kaneko, A. Iwanami, M. Nakamura et al. // *Nat Med*. – 2006 Dec. – 12(12). – P. 1380-1389.
36. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? / A. Bar-Or, L. Fawaz, B. Fan et al. // *Ann Neurol*. – 2010 Apr. – 67(4). – P. 452-461.
37. Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18 mAb / C. Hérold, G. Bismuth, A. Bensussan, L. Boumsell // *Int Immunol*. – 1995 Jan. – 7(1). – P. 1-8.
38. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation / A. Bitsch, J. Schuchardt, S. Bunkowski et al. // *Brain*. – 2000 Jun. – 123 ( Pt 60) – P. 1174-1183.
39. An antagonistic interaction between PlexinB2 and Rnd3 controls RhoA activity and cortical neuron migration / R. Azzarelli, E. Pacary, R. Garg et al. // *Nat Commun*. – 2014 Feb 27. – 5. – P. 3405.
40. Anti-SEMA4D antibody ameliorates pathogenic processes related to multiple sclerosis / Jonason A.S. et al. // *Multiple Sclerosis Journal*. ACTRIMS-ECTRIMS MS. Boston. Poster Sessions 2. Neuroprotection and repair. – 2014. – P712. 2014. – 20: (S1) 285–496.
41. Anti-semaphorin 4D immunotherapy ameliorates neuropathology and some cognitive impairment in the YAC128 mouse model of Huntington disease / A.L. Southwell, S. Franciosi, E.B. Villanueva et al. // *Neurobiol Dis*. – 2015 Apr. – 76. – P. 46-56.
42. Arnason, B.G. Immunologic therapy of multiple sclerosis / B. G. Arnason // *Annu Rev Med*. – 1999. – 50. – P. 291-302.

43. Ascherio, A. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors / A. Ascherio, K.L. Munger // *Ann Neurol.* – 2007 Jun. – 61(6). – P. 504-513.
44. B cells and multiple sclerosis / D. Franciotta, M. Salvetti, F. Lolli et al. // *Lancet Neurol.* – 2008. – 7. – P. 852-858.
45. Becher, B. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain / B. Becher, I. Bechmann, M. Greter // *J Mol Med (Berl).* – 2006 Jul. – 84(7). – P. 532-543.
46. Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis / A. Elhabazi, S. Delaire, A. Bensussan et al. // *J Immunol.* – 2001 Apr 1. – 166(7). – P. 4341-4347.
47. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-Sema III, inhibits immune cell migration / S. Delaire, C. Billard, R. Tordjman et al. // *J Immunol.* – 2001 Apr 1. – 166(7). – P. 4348-4354.
48. Boulanger, J.J. From precursors to myelinating oligodendrocytes: Contribution of intrinsic and extrinsic factors to white matter plasticity in the adult brain / J.J. Boulanger, C. Messier // *Neuroscience.* — 6 June 2014. – Volume 269. – P. 343–366.
49. Boyd, A. Insufficient OPC migration into demyelinated lesions is a cause of poor remyelination in MS and mouse models / A. Boyd, H. Zhang, A. Williams // *Acta Neuropathol.* – 2013. – 125. – P. 841–859.
50. Braley, T.J. B-cell Targeting Agents in the Treatment of Multiple Sclerosis / T.J. Braley, B.M. Segal // *Current treatment options in neurology.* – 2013. – 15(3). – P. 259-269.
51. Bynoe, M.S. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4<sup>+</sup> suppressor T cells: peripheral versus in situ immunoregulation / M.S. Bynoe, P. Bonorino, C. Viret // *J Neuroimmunol.* – 2007 Nov. – 191(1-2). – P. 61-69.

52. Casazza, A. Semaphorin signals in cell adhesion and cell migration: functional role and molecular mechanisms / A. Casazza, P. Fazzari, L. Tamagnone // *Adv Exp Med Biol.* – 2007. – 600. – P. 90-108.
53. CD100 is a leukocyte semaphoring / S. Delaire, A. Elhabazi, A. Bensussan, L. Boumsell // *Cell Mol Life Sci.* – 1998 Nov. – 54(11). – P. 1265-1276.
54. CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5<sup>+</sup> B lymphocytes / L. Granziero, P. Circosta, C. Scielzo et al. // *Blood.* – 2003 Mar 1. – 101(5). – P. 1962-1969.
55. Chao, M.V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways / M.V. Chao // *Nat Rev Neurosci.* – 2003 Apr. – 4(4). – P. 299-309.
56. Chari, D.M. Dysfunctional oligodendrocyte progenitor cell (OPC) populations may inhibit repopulation of OPC depleted tissue / D.M. Chari, W.L. Huang, W.F. Blakemore // *J Neurosci Res.* – 2003 Sep 15. – 73(6). – P. 787-793.
57. Chaudhry, N. Myelin-associated inhibitory signaling and strategies to overcome inhibition / N. Chaudhry, M.T. Filbin // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2007 Jun. – 27(6). – 1096-1107.
58. Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system / G. Piaton, M.S. Aigrot, A. Williams et al. // *Brain.* – 2011 Apr. – 134(Pt 4). – P. 1156-1167.
59. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2 / A. Kumanogoh, S. Marukawa, K. Suzuki et al. // *Nature.* – 2002 Oct 10. – 419(6907). – P. 629-633.
60. Clinical parameters and intrathecal IgG synthesis as prognostic features in multiple sclerosis / E. Verjans, P. Theys, P. Delmotte, H. Carton // *Part I. J Neurol.* – 1983. – 229(3). – P. 155-165.
61. Colman, D. Multiple paths towards repair in multiple sclerosis / D. Colman, C. Lubetzki, S. Reingold // *Trends Neurosci.* – 2003 Feb. – 26(2). – P. 59-61.

62. Compston, A. Multiple sclerosis / A. Compston, A. Coles // *Lancet*. – 2002 Apr 6. – 359(9313). – P. 1221-1231.
63. Control of axon-axon attraction by Semaphorin reverse signaling / H.H. Hsieh, W.T. Chang, L. Yu, Y. Rao // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2014 Aug 5. – 111(31). – P. 11383-11388.
64. De Wit, J. Role of semaphorins in the adult nervous system / J. de Wit, J. Verhaagen // *Prog Neurobiol*. – 2003 Oct. – 71(2-3). – 249-267.
65. Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients / R.A. Rudick, J.C. Lee, J. Simon et al. // *Ann Neurol*. – 2004 Oct;. – (4). – P. 548-555.
66. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis / B. Serafini, B. Rosicarelli, R. Magliozzi et al. // *Brain Pathol*. – 2004 Apr. – 14(2). – P. 164-174.
67. Dhib-Jalbut, S. Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis / S. Dhib-Jalbut // *Neurology*. – 2007 May 29. – 68(22 Suppl 3). – P. S13-21; discussion S43-54.
68. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria" / C.H. Polman, S.C. Reingold SC, G. Edan et al. // *Ann Neurol*. – 2005 Dec. – 58(6). – P. 840-846.
69. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald Criteria / C.H. Polman, S.C. Reingold, B. Banwell et al. // *Ann Neurol*. – 2011 Feb. – 69(2). – P. 292-302.
70. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis / T. Kuhlmann, V. Miron, Q. Cuo et al. // *Brain*. – Jul 2008. – 131 (7). – P. 1749-1758.
71. DiLillo, D.J. B-lymphocyte effector functions in health and disease. / D.J. DiLillo, M. Horikawa, T.F. Tedder // *Immunol Res*. – 2011 Apr. – 49(1-3). – P. 281-292.

72. Disability status and quality of life in multiple sclerosis: non-linearity of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) / S. Twork, S. Wiesmeth, M. Spindler et al. // *Health Qual Life Outcomes*. – 2010 Jun 7. – 8. – P. 55.
73. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis / M. Duddy, M. Niino, F. Adatia et al. // *J Immunol*. – 2007 May 15. – 178(10). – P. 6092-6099.
74. Early prediction of a benign course of multiple sclerosis on clinical grounds: a systematic review / G. Ramsarasing, N. Maurits, C. Zwanikken, J. De Keyser // *Mult Scler*. – 2001 Oct. – 7(5). – P. 345-347.
75. EBV persistence in memory B cells in vivo / G.J. Babcock, L.L. Decker, M. Volk, D.A. Thorley-Lawson // *Immunity*. – 1998 Sep. – 9(3). – P. 395-404.
76. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study / L. Kappos, M.S. Freedman, C.H. Polman et al. // *Lancet*. – 2007 Aug 4. – 370(9585). – P. 389-397.
77. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial / G. Comi, V. Martinelli, M. Rodegher et al. // *Lancet*. – 2009 Oct 31. – 374(9700). – P. 1503-1511.
78. Elevation of Sema4A implicates Th cell skewing and the efficacy of IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis / Y. Nakatsuji, T. Okuno, M. Moriya et al. // *J Immunol*. – 2012 May 15. – 188(10). – P. 4858-4865.
79. Enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of the lymphocyte semaphorin CD100 / C. Watanabe, A. Kumanogoh, W. Shi et al. // *J Immunol*. – 2001 Oct 15. – 167(8). – P. 4321-4328.
80. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis—association and causation / A. Lossius, J.N. Johansen, Ø. Torkildsen et al. // *Viruses*. – 2012 Dec. – 4(12). – P. 3701-3730.

81. Evidence for a role of the chemorepellent semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons / R.J. Pasterkamp, F. De Winter, A.J. Holtmaat, J. Verhaagen // *J Neurosci.* – 1998 Dec 1. – 18(23). – P. 9962-9976.
82. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice / S.D. Wolf, B.N. Dittel, F. Hardardottir, CA Janeway Jr // *J Exp Med.* – 1996 Dec 1. – 184(6). – P. 2271-2278.
83. Expression and clinical significance of Semaphorin4D in non-small cell lung cancer and its impact on malignant behaviors of A549 lung cancer cells / S.S. Ruan , R.C. Li, Q. Han et al. // *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* – 2014 Aug. – 34(4). – P. 491-496.
84. Franklin, R.J. Remyelination in the CNS: from biology to therapy / R.J. Franklin, C. Ffrench-Constant // *Nat Rev Neurosci.* – 2008 Nov. – 9(11). – P. 839-855.
85. Franklin, R.J. The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances / R.J. Franklin, M.R. Kotter // *J Neurol.* – 2008 Mar. – 255 Suppl 1. – P. 19-25.
86. Franklin, R.J. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? / R. J. Franklin // *Nat Rev Neurosci.* – 2002 Sep. – 3(9). – P. 705-714.
87. Fugger, L. From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis / L. Fugger, M.A. Friese, J.I. Bell // *Nat Rev Immunol.* – 2009 Jun. – 9(6). – P. 408-417.
88. Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses / X. Wang, A. Kumanogoh, C. Watanabe et al. // *Blood.* – 2001 Jun 1. – 97(11). – P. 3498-3504.
89. Gelfand, M.V. Guidance from above: common cues direct distinct signaling outcomes in vascular and neural patterning. / M.V. Gelfand, S. Hong, C. Gu // *Trends in Cell Biology.* – 2009 Mar. – Vol.19. – № 3. – P. 99-110.

90. Gene deletion mutants reveal a role for semaphorin receptors of the plexin-B family in mechanisms underlying corticogenesis / A. Hirschberg, S. Deng, A. Korostylev et al. // *Mol Cell Biol.* – 2010 Feb. – 30(3). – P. 764-780.
91. Goldman, M.D. Possible clinical outcome measures for clinical trials in patients with multiple sclerosis / M.D. Goldman, R.W. Motl, R.A. Rudick // *Ther Adv Neurol Disord.* – 2010 Jul. – 3(4). – P. 229-239.
92. Guerrini, R. Neuronal migration disorders / R. Guerrini, E. Parrini // *Neurobiol Dis.* – 2010 May. – 38(2). – P. 154-166.
93. Harris, V.K. Biomarkers of therapeutic response in multiple sclerosis: current status / V.K. Harris, S.A. Sadiq // *Mol Diagn Ther.* – 2014 Dec. – 18(6). – P. 605-617.
94. Hemmer, B. Toward the development of rational therapies in multiple sclerosis: what is on the horizon? / B. Hemmer, H.P. Hartung // *Ann Neurol.* – 2007 Oct. – 62(4). – P. 314-326.
95. Hohlfeld, R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: relevance for repair strategies in multiple sclerosis? / R. Hohlfeld // *J Neurol Sci.* – 2008 Feb 15. – 265(1-2). – P. 93-96.
96. Human CD100, a novel leukocyte semaphoring that promotes B-cell aggregation and differentiation / K.T. Hall, L. Boumsell, J.L. Schultze et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996 Oct 15. – 93(21). – P. 11780-11785.
97. Identification of a novel transmembrane semaphorin expressed on lymphocytes / T. Furuyama, S. Inagaki, A. Kosugi et al. // *J Biol Chem.* – 1996 Dec 27. – 271(52). – P. 33376-33381.
98. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling / A. Kumanogoh, C. Watanabe, I. Lee et al. // *Immunity.* – 2000 Nov. – 13(5). – P. 621-631.
99. Idiotope-specific CD4<sup>+</sup> T cells induce apoptosis of human oligodendrocytes / A.L. Hestvik, G. Skorstad, F. Vartdal, T. Holmøya // *Journal of Autoimmunity.* – 2009. – 32. – P. 125-132.

100. Immunological effects of oral high-dose methylprednisolone in acute optic neuritis and multiple sclerosis / F. Sellebjerg, M. Christiansen, J. Jensen, J. L. Frederiksen // *Eur J Neurol.* – 2000 May. – 7(3). – P. 281-289.
101. Increased levels of plasma soluble Sema4D in patients with heart failure [электронный ресурс] / Q. Lu, N. Dong, Q. Wang et al. // *PLoS One.* – 2013 May 31. – 8(5). – режим доступа к статье: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064265>
102. Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation / C. Bougeret, I.G. Mansur, H. Dastot et al. // *J Immunol.* – 1992 Jan 15. – 148(2). – P. 318-323.
103. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis / J.S. Tzartos, M.A. Friese, M.J. Craner et al. // *Am J Pathol.* – 2008 Jan. – 172(1). – P. 146-155.
104. Interpreting therapeutic effect in multiple sclerosis via MRI contrast enhancing lesions: now you see them, now you don't / I.R. Leppert, S. Narayanan, D. Araújo et al. // *J Neurol.* – 2014 Apr. – 261(4). – P. 809-816.
105. Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses / I. Ishida, A. Kumanogoh, K. Suzuki et al. // *Int Immunol.* – 2003 Aug. – 15(8). – P. 1027-1034.
106. Involvement of Sema 4D in the control of microglia activation / M. Toguchi, D. Gonzalez, S. Furukawa, S. Inagaki // *Neurochem.Int.* – 2009 Dec. – 55 (7). – P. 573–580.
107. Jongbloets, B.C. Semaphorin signalling during development / B.C. Jongbloets, R.J. Pasterkamp // *Development.* – 2014 Sep. – 141(17). – P. 3292-3297.

108. Kalil, K. Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS / K. Kalil, E. W. Dent // *Nat Rev Neurosci.* – 2014 Jan. – 15(1). – P. 7-18.
109. Kikutani, H. Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells / H. Kikutani, A. Kumanogoh // *Nat Rev Immunol.* – 2003 Feb. – 3(2). – P. 159-167.
110. Kolodkin, A.L. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules / A.L. Kolodkin, D.J. Matthes, C.S. Goodman // *Cell.* – 1993 Dec 31. – 75(7). – P. 1389-1399.
111. Kotter, M.R. Enhancing remyelination in disease—can we wrap it up? / M.R. Kotter, C. Stadelmann, H.P. Hartung // *Brain.* – 2011 Jul. – 134(Pt 7). – P. 1882-1900.
112. Kruger, R.P. Semaphorins command cells to move / R.P. Kruger, J. Aurandt, K.L. Guan // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2005 Oct. – 6(10). – P. 789-800.
113. Kumanogoh, A. Biological functions and signaling of a transmembrane semaphorin, CD100/Sema4D / A. Kumanogoh, H. Kikutani // *Cell Mol Life Sci.* – 2004 Feb. – 61(3). – P. 292-300.
114. Kumanogoh, A. Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins / A. Kumanogoh, H. Kikutani // *Nat Rev Immunol.* – 2013 Nov. – 13(11). – 802-814.
115. Kumanogoh, A. Immune semaphorins: a new area of semaphoring research / A. Kumanogoh, H. Kikutani // *J Cell Sci.* – 2003 Sep 1. – 116 (Pt 17). – P. 3463-3470.
116. Kumanogoh, A. The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation / A. Kumanogoh, H. Kikutani // *Trends Immunol.* – 2001 Dec. – 22(12). – P. 670-676.
117. Kurtzke, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) / J.F. Kurtzke // *Neurology.* – 1983 Nov. – 33(11). – P. 1444-1452.

118. Lassmann, H. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis / H. Lassmann, J. van Horssen, D. Mahad // *Nat Rev Neurol.* – 2012 Nov 5. – 8(11). – P. 647-656.
119. Lehmann-Horn, K. Targeting B cells in the treatment of multiple sclerosis: recent advances and remaining challenges / K. Lehmann-Horn, H.C. Kronsbein, M.S. Weber // *Ther Adv Neurol Disord.* – 2013 May. – 6(3). – P. 161-173.
120. Lublin, F.D. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis / F.D. Lublin, S.C. Reingold // *Neurology.* – 1996 Apr. – 46(4). – P. 907-911.
121. Lulu, S. Humoral-targeted immunotherapies in multiple sclerosis / S. Lulu, E. Waubant // *Neurotherapeutics.* – 2013 Jan. – 10(1). – P. 34-43.
122. Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis / S. Haller, V.M. Pereira, P.H. Lalive et al. // *Top Magn Reson Imaging.* – 2009 Dec. – 20(6). – P. 313-323.
123. Mann, F. Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases / F. Mann, S. Chauvet, G. Rougon // *Prog Neurobiol.* – 2007 Jun. – 82(2). – P. 57-79.
124. Masuda, T. Congenital diseases and semaphorin signaling: Overview to date of the evidence linking them / T. Masuda, M. Taniguchi // *Congenit Anom (Kyoto).* – 2015 Feb. – 55(1). – P. 26-30.
125. McFarland, H.F. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity / H.F. McFarland, R. Martin // *Nat Immunol.* – 2007 Sep. – 8(9). – P. 913-919.
126. McGuigan, C. The multiple sclerosis impact scale (MSIS-29) is a reliable and sensitive measure / C. McGuigan, M. Hutchinson // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2004 Feb. – 75(2). – P. 266-269.

127. McQualter, J.L. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair / J.L. McQualter, C.C. Bernard // *J Neurochem.* – 2007 Jan. – 100(2). – P. 295-306.
128. Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC): Administration and Scoring Manual / J.S. Fischer, A.J. Jak, J.E. Kniker, R.A. Rudick, G. Cutter. – National Multiple Sclerosis Society, New York. – 2001.
129. Multiple Sclerosis Impact Scale (MSIS-29): relation to established measures of impairment and disability / E.L. Hoogervorst, J.N. Zwemmer, B. Jelles et al. // *Mult Scler.* – 2004 Oct. – 10(5). – P. 569-574.
130. Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination / M. Podbielska, N.L. Banik, E. Kurowska, E.L. Hogan // *Brain Sci.* – 2013 Aug 28. – 3(3). – P. 1282-1324.
131. Myelin Repair and Neuroprotection in Multiple Sclerosis / Duncan I.D. and Franklin R.J.M. (eds.). – Springer Science+Business Media, New York. – 2013. – 290 P.
132. Nakatsuji, Y. Aberrant cross talk between immune cells and neural cells in demyelinating disorders / Y. Nakatsuji // *Rinsho Shinkeigaku.* – 2011 Nov. – 51(11). – P. 894-897. [ Article in Japanese].
133. Nakayama, E. Sequence of the Lyb-2 B-cell differentiation antigen defines a gene superfamily of receptors with inverted membrane orientation / E. Nakayama, I. von Hoegen, J.R. Parnes // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989 Feb. – 86(4). – P. 1352-1356.
134. Nave, K.A. Axon-glia signaling and the glial support of axon function / K.A. Nave, B.D. Trapp // *Annu Rev Neurosci.* – 2008. – 31. – P. 535-561.
135. Neuropilins and semaphorins – from angiogenesis to autoimmunity / Z. Vadasz, D. Attias, A. Kessel, E. Toubi // *Autoimmun Rev.* – 2010 Oct. – 9(12). – 825-829.
136. Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice / A.

- Kumanogoh, T. Shikina, K. Suzuki et al. // *Immunity*. – 2005 Mar. – 22(3). – P. 305-316.
137. Okuno, T. The role of immune semaphorins in multiple sclerosis / T. Okuno, Y. Nakatsuji, A. Kumanogoh // *FEBS Lett.* – 2011 Dec 1. – 585(23). – P. 3829-3835.
138. Parnes, J.R. CD72, a negative regulator of B-cell responsiveness / J.R. Parnes, C. Pan // *Immunol Rev.* – 2000 Aug. – 176. – P. 75-85.
139. Pasterkamp, R.J. Getting neural circuits into shape with semaphorins / R.J. Pasterkamp // *Nat Rev Neurosci.* – 2012 Sep. – 13(9). – P. 605-618.
140. Pasterkamp, R.J. Semaphorin function in neural plasticity and disease / R.J. Pasterkamp, R.J. Giger // *Curr Opin Neurobiol.* – 2009 Jun. – 19(3). – P. 263-274.
141. Pasterkamp, R.J. Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity / R.J. Pasterkamp, A.L. Kolodkin // *Curr Opin Neurobiol.* – 2003 Feb. – 13(1). – P. 79-89.
142. Patel, J.R. Mediators of oligodendrocyte differentiation during remyelination / J.R. Patel, R.S. Klein // *FEBS Lett.* – 2011 Dec 1. – 585(23). – P. 3730-3737.
143. Perälä, N. More than nervous: the emerging roles of plexins/ N. Perälä, H. Sariola, T. Immonen // *Differentiation*. – 2012 Jan. – 83(1). – P. 77-91.
144. Peripheral blood lymphocytes analysis detects CD100/SEMA4D alteration in systemic sclerosis patients / A. Besliu, L. Banica, D. Predeteanu et al. // *Autoimmunity*. – 2011 Aug. – 44(5). – P. 427-436.
145. Perrot, V. Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF / V. Perrot, J. Vazquez-Prado, J.S. Gutkind // *J Biol Chem.* – 2002 Nov 8. – 277(45). – P. 43115-43120.

146. Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology / J.M. Swiercz, R. Kuner, J. Behrens, S. Offermanns // *Neuron*. – 2002 Jul 3. – 35(1). – P. 51-63.
147. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates / L. Tamagnone, S. Artigiani, H. Chen et al. // *Cell*. – 1999 Oct 1. – 99(1). – P. 71-80.
148. Quality of life and its assessment in multiple sclerosis: integrating physical and psychological components of wellbeing / A.J. Mitchell, J. Benito-León, J.M. González, J. Rivera-Navarro // *Lancet Neurol*. – 2005 Sep. – 4(9). – P. 556-566.
149. Raper, J.A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates / J.A. Raper // *Curr Opin Neurobiol*. – 2000 Feb. – 10(1). – P. 88-94.
150. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission / S. Knippenberg, E. Peelen, J. Smolders et al. // *J Neuroimmunol*. – 2011 Oct 28. – 239(1-2). – P. 80-86.
151. Regulation of IL-17A Production Is Distinct from IL-17F in a Primary Human Cell Co-culture Model of T Cell Mediated B Cell Activation/ A. C. Melton, J. Melrose, L. Alajoki et al. // *PLOS ONE* | [www.plosone.org](http://www.plosone.org) 1 March 2013. – Volume 8. – Issue 3. – e58966. – P. 1-13. Режим доступа: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0058966&representation=PDF>
152. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis / T. Matsushita, M. Horikawa, Y. Iwata, T.F. Tedder // *J Immunol*. – 2010 . – 185. – P. 2240–2252.

153. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression / T. Matsushita, K. Yanaba, J.D. Bouaziz et al. // *J Clin Invest.* – 2008 Oct. – 118(10). – P. 3420-3430.
154. Relationship between stress and relapse in multiple sclerosis: Part I. Important features / R.F. Brown, C.C. Tennant, M. Sharrock et al. // *Mult Scler.* – 2006 Aug. – 12(4). – P. 453-464.
155. Remyelinated lesions in multiple sclerosis: magnetic resonance image appearance / F. Barkhof, W. Bruck, C.J. De Groot et al. // *Arch Neurol.* – 2003 Aug. – 60(8). – P. 1073-1081.
156. Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course / R. Patani, M. Balaratnam, A. Vora, R. Reynolds // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 2007 Jun. – 33(3). – P. 277-287.
157. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity / T. Goldschmidt, J. Antel, F.B. König et al. // *Neurology.* – 2009 Jun 2. – 72(22). – P. 1914-1921.
158. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients / P. Patrikios, C. Stadelmann, A. Kutzelnigg et al. // *Brain.* – 2006 Dec. – 129(Pt 12). – P. 3165-3172.
159. Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells / A. Kumanogoh, K. Suzuki, E. Ch'ng et al. // *J Immunol.* – 2002 Aug 1. – 169(3). – P. 1175-1181.
160. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study / International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, D.A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer et al. // *N Engl J Med.* – 2007 Aug 30. – 357(9). – P. 851-862.
161. Rist, J.M. The adult human oligodendrocyte precursor cell: a key player in myelin repair / J.M. Rist, R.J.M. Franklin. // In : *Multiple sclerosis: recovery of function and neurorehabilitation* / editors, Jurg Kesselring,

- Giancarlo Comi, Alan J.Thompson. Cambridge University Press. – 2010. – P. 53-59.
162. Roles of Sema4D-plexin-B1 interactions in the central nervous system for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis / T. Okuno, Y. Nakatsuji, M. Moriya et al. // *J Immunol.* – 2010 Feb 1. – 184(3). – P. 1499-1506.
163. Rook, G.A. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases / G.A. Rook // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2012 Feb. – 42(1). – P. 5-15.
164. Sema 4D/CD100-plexin B is a multifunctional counter-receptor / Y. Zhang, B. Liu, Y. Ma, B. Jin // *Cell Mol Immunol.* – 2013 Mar. – 10(2). – 97-98.
165. Sema4A inhibits the therapeutic effect of IFN- $\beta$  in EAE / T. Koda, T. Okuno, K. Takata et al. // *J Neuroimmunol.* – 2014 Mar 15. – 268(1-2). – P. 43-49.
166. SEMA4D compromises blood-brain barrier, activates microglia, and inhibits remyelination in neurodegenerative disease / E.S. Smith, A. Jonason, C. Reilly et al. // *Neurobiol Dis.* – 2014 Oct 18. – 73C.: P. 254-268.
167. Semaphorin 3A elevates vascular permeability and contributes to cerebral ischemia-induced brain damage / S.T. Hou, L. Nilchi, X. Li et al. // *Sci Rep.* – 2015 Jan 20. – 5. – P. 7890.
168. Semaphorin 3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth / M. Shelly, L. Cancedda, B.K. Lim et al. // *Neuron.* – 2011 Aug 11. – 71(3). – P. 433-446.
169. Semaphorin CD100 from activated T lymphocytes induces process extension collapse in oligodendrocytes and death of immature neural cells / P. Giraudon, P. Vincent, C. Vuillat et al. // *J Immunol.* – 2004 Jan 15. – 172(2). – P. 1246-1255.

170. Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1 / T. Toyofuku, M. Yabuki, J. Kamei et al. // *EMBO J.* – 2007 Mar 7. – 26(5). – P. 1373-1384.
171. Semaphorins: Receptors and Intracellular Signaling Mechanisms, edited by R. Jeroen Pasterkamp. – 2007. – Landes Bioscience and Springer Science +Business Media. Semaphorin signaling in the immune system / V. Potiron, P. Nasarre, J. Roche et al. – 2007. – P. 132-144.
172. Sensing the microenvironment of the central nervous system: immune cells in the central nervous system and their pharmacological manipulation / Z. Fabry, H.A. Schreiber, M.G. Harris, M. Sandor // *Curr Opin Pharmacol.* – 2008 Aug. – 8(4). – P. 496-507.
173. Sinha, S. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8<sup>+</sup> T cells / S. Sinha, F.R. Itani, N.J. Karandikar // *Immunol Res.* – 2014 Aug. – 59(1-3). – P. 254-265.
174. Sospedra, M. Immunology of multiple sclerosis / M. Sospedra, R. Martin // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – 23. – P. 683-747.
175. Staples, J. Low maternal exposure to ultraviolet radiation in pregnancy, month of birth, and risk of multiple sclerosis in offspring: longitudinal analysis/ J. Staples, A.L. Ponsonby, L. Lim // *BMJ.* – 2010 Apr 29. – 340: c1640.
176. Structural basis for semaphoring signalling through the plexin receptor / T. Nogi, N. Yasui, E. Mihara et al. // *Nature.* – 2010 Oct 28. – 467(7319). – P. 1123-1127.
177. Subbarao, B. Properties of anti-Lyb-2-mediated B-cell activation and the relationship between Lyb-2 molecules and receptors for B-cell stimulatory factor-1 on murine B lymphocytes / B. Subbarao, J. Morris, A.R. Baluyut // *Cell Immunol.* – 1988 Apr 1. – 112(2). – P. 329-342.
178. Suzuki, K. CD100/Sema4D, a lymphocyte semaphoring involved in the regulation of humoral and cellular immune responses / K. Suzuki, A.

- Kumanogoh, H. Kikutani // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2003 Feb. – 14(1). – P. 17-24.
179. Suzuki, K. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions / K. Suzuki, A. Kumanogoh, H. Kikutani // *Nat Immunol.* – 2008 Jan – 9(1) – P. 17-23.
180. Syed, Y.A. Inhibition of CNS remyelination by the presence of semaphorin 3A / Y.A. Syed, E. Hand, W. Möbius et al. // *J Neurosci.* – 2011 Mar 9. – 31(10). – P. 3719-3728.
181. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis / R.C. Axtell, B.A. de Jong, K. Boniface et. al. // *Nat Med.* – 2010 Apr. – 16(4). – P. 406-412.
182. Takamatsu, H. Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system / H. Takamatsu, A. Kumanogoh // *Trends Immunol.* – 2012 Mar. – 33(3). – P. 127-135.
183. Takamatsu, H. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors / H. Takamatsu, T. Okuno, A. Kumanogoh // *Cell Mol Immunol.* – 2010 Mar. – 7(2). – 83-88.
184. Takegahara, N. Semaphorins: a new class of immunoregulatory molecules / N. Takegahara, A. Kumanogoh, H. Kikutani // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2005 Sep 29. – 360(1461). – P. 1673-1680.
185. Tamagnone, L. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond / L. Tamagnone, P.M. Comoglio // *Trends Cell Biol.* – 2000 Sep. – 10(9). – P. 377-383.
186. Tessier-Lavigne, M. The molecular biology of axon guidance / M. Tessier-Lavigne, C.S. Goodman // *Science.* – 1996 Nov 15. – 274 (5290). – P. 1123-1133.
187. The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation / F.J. Sim, C. Zhao, J. Penderis, R.J. Franklin // *J Neurosci.* – 2002 Apr 1. – 22(7). – P. 2451-2459.

188. The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation / T. Adachi, H. Flaswinkel, H. Yakura et al. // *J Immunol.* – 1998 May 15. – 160(10). – P. 4662-4665.
189. The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice / W. Shi, A. Kumanogoh, C. Watanabe et al. // *Immunity.* – 2000 Nov. – 13(5). – P. 633-642.
190. The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors / D. Kremer, O. Aktas, H.P. Hartung, P. Küry // *Ann Neurol.* – 2011 Apr. – 69(4). – P. 602-618.
191. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis / G. Disanto, J.M. Morahan, M.H. Barnett et al. // *Neurology.* – 2012 Mar 13. – 78(11). – P. 823-832.
192. The ligand-binding face of the semaphorins revealed by the high-resolution crystal structure of SEMA4D / C. A. Love, K. Harlos, N. Mavaddat et al. // *Nat Struct Biol.* – 2003 Oct. – 10(10). – P. 843-848.
193. The physical and psychological impact of multiple sclerosis using the MSIS-29 via the web portal of the UK MS Register [электронный ресурс] / K.H. Jones, D.V. Ford, P.A. Jones et al. // *PLoS One.* – 2013. – 8(1). – режим доступа к статье: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055422>
194. The psychometric properties of the Swedish Multidimensional Fatigue Inventory MFI-20 in four different populations / C.L. Hagelin, Y. Wengström, S. Runesdotter, C.J. Fürst. // *Acta Oncol.* – 2007. – 46(1). – P. 97-104.
195. The sema domain / E. Gherardi, C.A. Love, R.M. Esnouf, E.Y. Jones // *Curr Opin Struct Biol.* – 2004 Dec. – 14(6). – P. 669-678.
196. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met / S. Giordano, S. Corso, P. Conrotto et al. // *Nat Cell Biol.* – 2002 Sep. – 4(9). – P. 720-724.

197. The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras / I. Oinuma, Y. Ishikawa, H. Katoh, M. Negishi // *Science*. – 2004 Aug 6. – 305(5685). – P. 862-865.
198. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion / C. Moreau-Fauvarque, A. Kumanogoh, E. Camand E et al. // *J Neurosci*. – 2003 Oct 8. – 23(27). – P. 9229-9239.
199. Thrower, B.W. Relapse management in multiple sclerosis / B.W. Thrower // *Neurologist*. – 2009 Jan. – 15(1). – P. 1-5.
200. Toyofuku, T. Semaphorin signaling during cardiac development / T. Toyofuku, H. Kikutani // *Adv Exp Med Biol*. – 2007. – 600. – P. 109-117.
201. Traboulsee, A.L. The role of MRI in the diagnosis of multiple sclerosis / A.L. Traboulsee, D.K. Li // *Adv Neurol*. – 2006. – 98. – P. 125-146.
202. Tran, T.S. Semaphorin regulation of cellular morphology / T.S. Tran, A.L. Kolodkin, R. Bharadwaj // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. – 2007. – 23. – P. 263–292.
203. Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins / Semaphorin Nomenclature Committee // *Cell*. – 1999 May 28. – 97(5). – P. 551-552.
204. Validation of the functional assessment of multiple sclerosis quality of life instrument / D.F. Cella, K. Dineen, B. Arnason et al. // *Neurology*. – 1996 Jul. – 47(1). – P. 129-139.
205. Zhou, Y. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead / Y. Zhou, R.A. Gunput, R.J. Pasterkamp // *Trends Biochem Sci*. – 2008 Apr. – 33(4). – P. 161-170.
206. Ziemssen, T. Modulating processes within the central nervous system is central to therapeutic control of multiple sclerosis. – *J. Neurol*. – 2005 Nov. – 252 Suppl. 5.:v38-45.