

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

На правах рукописи

Сурсякова Надежда Владимировна

**Особенности взаимодействия В-лимфоцитов и Т-хелперов,
продуцирующих IL-17 (Th17), при рассеянном склерозе**

3.1.24. Неврология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Татьяна Витальевна Байдина

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Елена Михайловна Куклина

Пермь – 2021

Содержание

СПИСОК ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. РАССЕЯННЫЙ СКЛЕРОЗ КАК АУТОИММУННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ. РОЛЬ В-КЛЕТОК И Т-КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ИНТЕРЛЕЙКИН 17, В ЕГО ПАТОГЕНЕЗЕ_(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1 Рассеянный склероз, современное представление о заболевании, актуальность проблемы.	12
1.1.1 Рассеянный склероз как мультифакторное заболевание	13
1.1.2 Основные аспекты патогенеза рассеянного склероза	14
1.1.2.1. Антигенпрезентация при рассеянном склерозе	14
1.1.2.2 Роль субпопуляций Т-клеток в патогенезе РС.....	16
1.1.2.3 Роль В-клеток в патогенезе РС	18
1.1.2.4 Роль цитокинов в патогенезе РС	20
1.1.3 Патоморфологические изменения при рассеянном склерозе и роль микроглии в его патогенезе.....	22
1.1.4 Особенности диагностики и потенциальные биомаркеры РС.....	24
1.2. Фармакодинамика ПИТРС	25
1.2.1 Интерферон- β	25
1.2.2 Глатирамера ацетат	27
1.2.3 Натализумаб	28
ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБЛЮДЕНИЙ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
2.1. Дизайн исследования, объем наблюдений	30
2.2. Основные методы исследования.....	40
2.2.1. Тестирование функциональных возможностей пациентов	41
2.2.2. Оценка утомляемости, качества жизни и аффективных расстройств пациентов	42
2.2.3. Способы оценки и характеристика функциональных возможностей пациентов основной группы.....	42

2.3. Способы оценки и характеристика эмоционального состояния, утомляемости и качества жизни у пациентов с РС.....	45
2.4. Лабораторные методы исследования	47
2.4.1. Выделение и культивирование клеток периферической крови	49
2.4.2. Оценка экспрессии лимфоцитами мембранных и внутриклеточных молекул методом проточной цитометрии	51
2.4.2.1. Подготовка проб для проточной цитометрии	51
2.4.2.2. Алгоритм цитометрического исследования.....	52
2.4.3. Оценка уровня цитокинов в плазме крови	54
2.5. Статистические методы, применяемые в исследовании.....	56
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ. ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ НА ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ В-КЛЕТОК (РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)	58
3.1 Факторы, ассоциированные с активностью Т-хелперных субпопуляций Th17/Treg и В-лимфоцитов в сыворотке крови пациентов с РС и связь их уровня с клиническим состоянием пациентов	58
3.1.1. Исследование уровня интерлейкина 17 в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров	58
3.1.2. Исследование уровня интерлейкина 10 в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров	63
3.1.3. Исследование В-клеточного активирующего фактора (BAFF) в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров.....	67
3.1.4 Исследование хемокина CXCL-13 в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров	71
3.1.5 Исследование общего иммуноглобулина класса G в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров.....	75
3.3.6. Взаимосвязь концентрации IL-17, IL-10, BAFF, CXCL-13 и общего IgG у больных РС	79

ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ В-ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ВКЛАДА В ПРОДУКЦИЮ IL-17 ПРИ РС	85
4.1. Роль антигенпрезентирующей функции В-лимфоцитов в дифференцировке наивных Т-клеток в Th17/Treg.....	85
4.1.1 Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на антигены, презентируемые В-клетками.....	86
4.1.2. Дифференцировка наивных CD4 ⁺ Т-клеток в Th17/Treg в ответ на антиген, представленный В-лимфоцитами	88
4.2. Исследование продукции В-лимфоцитами IL-17 при РС	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ.....	134
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	120

СПИСОК ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИХ СОКРАЩЕНИЙ

АПК – антигенпрезентирующая клетка

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

МПК – мононуклеарные клетки периферической крови

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПИТРС – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза

РС – рассеянный склероз

СМЖ – спинномозговая жидкость

ЦНС – центральная нервная система

ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

CD – The Cluster of Differentiation, молекулы дифференцировки лимфоидных клеток

CXCL-13 – хемокин 13.

EDSS – Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала инвалидизации Курцке

FS – функциональная система

HLA - Human Leukocyte Antigens , антигены лейкоцитов человека

IL – interleukin, интерлейкин

MBP – myelinbasicprotein; основной белок миелина

MHC –главный комплекс гистосовместимости

MOG – Myelinoligodendrocyteglycoprotein; олигодентроцитарный гликопротеин миелина

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

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

TGF - Transforming growth factor, трансформирующий фактор роста

Th17 – Т-лимфоциты продуцирующие интерлейкин-17

Treg – Т-регуляторные клетки

ТТ – столбнячный анатоксин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Рассеянный склероз (РС) - одно из наиболее социально значимых заболеваний нервной системы вследствие высокой заболеваемости молодых, а значит, социально активных людей. Болезнь имеет прогрессирующее течение, неуклонно приводящее к инвалидности и смерти [4]. Актуальность исследований, направленных на разработку методов борьбы с РС, усиливается ростом заболеваемости РС в Пермском крае и в стране в целом [11]. Патогенез РС в основном изучен, однако, понимание основных механизмов его развития пока не привело к созданию достаточно эффективных и безопасных методов лечения. Это диктует необходимость углубленного изучения отдельных этапов его патогенеза для определения новых мишеней терапии [15].

Согласно принятым представлениям, ведущую роль в патогенезе РС играет Т-клеточное звено иммунитета, в первую очередь – аутореактивные Т-хелперы (Th), индуцирующие воспалительные процессы в центральной нервной системе (ЦНС) за счет продукции провоспалительных цитокинов. Ключевым игроком в этих процессах выступает субпопуляция Т-хелперов, продуцирующих IL-17 (Th17), что подтверждается многочисленными исследованиями *in vivo* и *in vitro*: уровень IL-17 повышен как у животных с экспериментальными аутоиммунными энцефаломиелитами (Experimental Autoimmune Encephalomyelites, EAE, модель РС у животных), так и у пациентов с РС [100,131], и коррелирует с тяжестью заболевания [131], тогда как тогда как дефицит IL-17 в модели EAE, напротив, ассоциирован с устойчивостью к развитию патологии [87, 131]. Эти данные позволили рассматривать клетки, продуцирующие IL-17, и непосредственно IL-17, как многообещающую мишень для лечения РС: в настоящее время проводятся клинические исследования по использованию моноклональных антител против IL-17A для лечения ремиттирующей формы болезни [77]. Следует

отметить, что функционирование клеток Th17 тесно связано с другой Т-хелперной субпопуляцией – регуляторными Т-лимфоцитами (Treg), продуцирующими противовоспалительные цитокины [172] и подавляющими развитие нейровоспаления при РС [98]. Обе субпопуляции развиваются из общего Т-клеточного предшественника, и конечный результат зависит не столько от содержания и активности отдельных субпопуляций Th17 и Treg, сколько от их баланса.

Другим важнейшим звеном патогенеза РС являются В-лимфоциты [76,128], которые выявляются в значительных количествах в мозге пациентов с РС [128] и способны формировать в ЦНС фолликулоподобные структуры, аналогичные зародышевым центрам вторичных лимфоидных органов [128]. Истощение популяции В-лимфоцитов снижает выраженность заболевания как в модели ЕАЕ, так и у пациентов с РС, и является в настоящее время одной из стратегий лечения данной патологии [76]. При этом роль В-клеток в развитии РС связывают не столько с продукцией аутоантител [38], сколько с альтернативными функциями этих клеток – презентацией антигенов (в том числе – аутоантигенов) Т-лимфоцитам [73] и продукцией провоспалительных цитокинов [9]. За счет реализации альтернативных существенный вклад в развитие и регуляцию В-лимфоцитов – как в зародышевых функциях В-лимфоциты могут изменять микроокружение и промотировать воспаление в ЦНС.

Целый ряд данных литературы свидетельствует о том, что между популяцией Th17 и В-лимфоцитами существует тесная взаимосвязь. С одной стороны, клетки Th17 вносят вклад в образование В-клеток в зародышевых центрах [139], так и за их пределами [155]. С другой стороны, В-лимфоциты играют важную роль в дифференцировке и активации Th17. Так, у мышей с ЕАЕ генетически обусловленный В-клеточный дефицит сопровождается сокращением популяции Th17 [158], а в экспериментах *in vitro* В-лимфоциты мышей с ЕАЕ, выступая в качестве антигенпрезентирующих клеток, промотируют дифференцировку наивных MOG-специфичных Т-лимфоцитов

в Th17, наряду с Th1 [205]. Более того, в условиях, имитирующих интенсивный воспалительный процесс, В-лимфоциты способны репрограммировать регуляторные Т-клетки в Th17 [17]. Наряду с этим, у В-лимфоцитов и Th17 есть общий эндогенный активатор: показано, что фактор активации В-лимфоцитов (B cell activating factor, BAFF) участвует и в стимуляции Th17 [46]. И, наконец, недавними исследованиями механизмов противовирусного иммунитета показана способность В-лимфоцитов синтезировать ключевой для популяции Th17 цитокин IL-17 [176]. Основная часть перечисленных выше данных получена или на моделях, не связанных с аутоиммунитетом, или на животных с ЕАЕ. Для пациентов с РС связь между В-лимфоцитами и Th17 требует детального исследования и косвенно подтверждается тем фактом, что терапия РС, основанная на истощении популяции CD20⁺В-лимфоцитов, сопровождается снижением уровня Th17 и соответствующего цитокина, IL-17, в периферической крови [30]. Оценка взаимодействия Th17 и В-лимфоцитов у пациентов с РС важна не только для лучшего понимания механизмов патогенеза данного заболевания, но и имеет большую клиническую значимость, поскольку данные лимфоцитарные субпопуляции (В-лимфоциты) в настоящее время используются или рассматриваются в перспективе (Th17) как терапевтические мишени в лечении РС [52].

Цель работы: исследовать механизмы взаимодействия В-лимфоцитов и Т-хелперов (Th17), продуцирующих IL-17, при рассеянном склерозе.

Задачи исследования:

1. Определить *ex vivo* уровень факторов, характеризующих активность В-лимфоцитов и Т-хелперных субпопуляций Th17/Treg, в периферической крови пациентов с РС, и оценить связь этих показателей между собой, а также с клиническим состоянием пациентов.

2. Оценить влияние некоторых препаратов, изменяющих течение РС (ПИТРС): (интерферон-β, глатирамера ацетат, натализумаб) на уровень факторов, характеризующих активность В-лимфоцитов и клеток Th17/Treg.

3. Исследовать *in vitro* роль В-зависимой презентации антигена в дифференцировке наивных Т-клеток в Th17/Treg у пациентов с РС.

4. Оценить собственную продукцию IL-17 В-лимфоцитами пациентов с РС.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что при РС компоненты воспаления, обусловленные IL 17, постепенно начинают снижаться при достижении неврологического дефицита 2 балла по шкале EDSS. Все представленные в работе данные по взаимодействию и взаимной регуляции В-лимфоцитов и провоспалительной Т-хелперной субпопуляции Th17 при РС получены впервые. В частности, впервые показан вклад антигенпрезентирующей активности В-клеток пациентов с РС в дифференцировку Th17, а способность В-лимфоцитов продуцировать провоспалительный цитокин IL-17 выявлена впервые не только для РС, но и в целом для аутоиммунной патологии. Новыми являются данные по влиянию ПИТРС на содержание В-клеточного эндогенного активатора BAFF в сыворотке крови пациентов с РС. Связь уровня ключевого хемокина для наивных В-лимфоцитов CXCL-13 в периферической крови с функциональным состоянием пациентов с РС также была показана впервые. Кроме того, выявлено достоверно высокое содержание IL-17 у пациентов с баллом по EDSS с последующим снижением при прогрессии заболевания, и наоборот, увеличение уровня CXCL-13 при повышении EDSS.

Практическая значимость работы.

Обе лимфоцитарные популяции, находящиеся в фокусе настоящей работы, В-лимфоциты и Th17, играют ключевую роль в патогенезе РС, и, как следствие, являются (В-клетки) или рассматриваются в перспективе (Th17) как терапевтические мишени для данного заболевания. Представленные в работе данные по взаимодействию и взаимной позитивной регуляции В-

лимфоцитов и Th17 при РС позволяют объяснить имеющиеся на сегодняшний день результаты терапии с использованием моноклональных антител (например, снижение уровня IL-17 на фоне истощения популяции В-лимфоцитов ритуксимабом), а также прогнозировать результаты такой терапии, что необходимо для ее корректного и эффективного применения, для снижения рисков нежелательных последствий (для принятия решения о целесообразности такой терапии).

Выявленная в работе связь клинического и функционального состояния больных РС с содержанием в периферической крови ключевого В-клеточного хемокина CXCL-13 позволяет говорить о диагностическом или прогностическом потенциале данного показателя. Причем, в соответствии с данными о взаимодействии В-лимфоцитов и Th17 при РС, содержание CXCL-13 в крови может отражать не только уровень миграции В-лимфоцитов в ЦНС, но и уровень В-зависимой дифференцировки провоспалительной Т-хелперной популяции Th17.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изменения активности Т-хелперных субпопуляций Th17/Treg и В-лимфоцитов при РС взаимосвязаны. Концентрация провоспалительного цитокина IL-17 в крови пациентов с РС достоверно повышена на ранних этапах заболевания до достижения EDSS 2 баллов, а затем последовательно снижается. Уровень противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке пациентов с РС снижен, что сдвигает баланс Th17/Treg в направлении субпопуляции Th17. Содержание ключевого В-клеточного хемокина CXCL-13 в сыворотке крови снижено и коррелирует с клиническими и функциональными показателями пациентов. Уровни общего IgG и эндогенного активатора В-клеточной дифференцировки BAFF не изменены. Высокие концентрации IL-17 и В-клеточного активатора BAFF у пациентов с РС сопряжены друг с другом.

2. Исследования *in vitro* выявили возможные механизмы участия В-лимфоцитов в активации Т-зависимых реакций при РС, ассоциированные с реализацией альтернативных (не связанных с продукцией антител) функций В-клеток – презентацией антигена Т-лимфоцитам и собственной продукцией цитокинов. Во-первых, у пациентов с РС В-зависимая презентация экзоантигена более эффективна в индукции пролиферативного ответа Т-лимфоцитов в сопоставлении с контрольной группой. Во-вторых, В-зависимая презентация аутоантигена (MOG) у пациентов с РС, в отличие от здоровых доноров, индуцирует преимущественное развитие наивных Т-лимфоцитов в Th17, но не влияет на дифференцировку Treg, сдвигая баланс Th17/Treg в направлении Th17 и внося вклад в продукцию IL-17 при РС. В-третьих, В-лимфоциты способны сами продуцировать IL-17, причем В-клетки пациентов с РС делают это значительно более эффективно, что также вносит вклад в общую продукцию данного цитокина при РС.

3. Терапия РС снижает содержание провоспалительного цитокина только IL-17 и несколько повышает противовоспалительный цитокин IL-10, но не оказывает влияния на факторы участвующие в развитии В-клеток. В большей степени на провоспалительные цитокины влияет терапия Натализумабом, относящаяся ко второй линии терапии.

Личный вклад диссертанта в исследование

Материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором. Обследование больных, статистическая обработка и анализ полученных данных выполнялись лично автором. Пробы биологического материала были взяты лично автором, а при трудностях венепункции при помощи процедурных медсестер ГБУЗ Пермского края «Пермская краевая клиническая больница» Старцевой Л.С. и Носковой Л.В. Иммунологические исследования выполнены совместно с к.б.н., научным сотрудником И.В.Некрасовой в Лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь).

Автором освоены принципы проведенных лабораторных исследований и работы с данными, полученными при цитометрическом исследовании. Автор благодарит заведующую центром РС ГБУЗ ПК ПККБ к.м.н. Т.Н.Трушникову, заведующего Лабораторией иммунорегуляции ФГБУН Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, д.м.н., профессора, заслуженного деятеля науки РФ С.В.Ширшева и заведующего Лабораторией экологической иммунологии ФГБУН Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, к.м.н., доцента кафедры иммунологии ПГМУ Б.А.Бахметьева за сотрудничество.

Внедрение результатов работы в практику

Основные положения работы внедрены в практическую работу ГБУЗ Пермского края «Пермская краевая клиническая больница» и в учебный процесс на кафедре неврологии лечебного факультета имени профессора В.П. Первушина ГБОУ ВПО ПГМУ им. ак. Е.В. Вагнера Минздрава России.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Научной сессии ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера (Пермь, 2016), конференции "Неврологические чтения в Перми" (Пермь, 2017), Итоговой научно-практической конференции ПГМУ имени академика Е.А.Вагнера (Пермь, 2018), научно-практической конференции "Неврологические чтения в Перми" (Пермь, 2018), научной сессии ПГМА им. ак.Е.А.Вагнера (Пермь, 2018), конференции "Неврологические чтения в Перми" (Пермь, 2020), заседании научно-координационного совета по неврологии с участием кафедр неврологии и медицинской генетики, а также представителей кафедры иммунологии.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 9 - в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 1 - в международной системе Scopus.

ГЛАВА 1. РАССЕЯННЫЙ СКЛЕРОЗ КАК АУТОИММУННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ. РОЛЬ В-КЛЕТОК И Т-КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ИНТЕРЛЕЙКИН 17, В ЕГО ПАТОГЕНЕЗЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1. Рассеянный склероз, современное представление о заболевании, актуальность проблемы.

РС — хроническое полиэтиологическое прогрессирующее заболевание, в основе которого лежит нарушение проницаемости эндотелия ГЭБ и поражение нервной системы аутоиммунными агентами с формированием множественных очагов поражения белого вещества центральной нервной системы, в которых деструкция миелиновой оболочки нервных волокон головного и спинного мозга сопровождается их дальнейшей дегенерацией [4]. Уже в 1866-1868 гг. Жан Мартен Шарко описал клинические и морфологические проявления РС [5]. Актуальность исследования РС обусловлена социальными и экономическими причинами. Дебют заболевания обычно приходится на возраст максимальной социальной активности - 20-40 лет. Течение заболевания непредсказуемо, и, несмотря на лечение, приводит к формированию устойчивого неврологического дефицита и инвалидизации пациентов [112]. Экономическое бремя РС включает в себя прямые медицинские и немедицинские расходы, косвенные расходы в связи с повышенной заболеваемостью, ранней смертностью и воздействием на семью и друзей, а также нематериальные расходы [61]. Распространенность РС значительно варьирует, от высоких уровней в Северной Америке и Европе (> 100 на 100 000 жителей) до низких показателей в Восточной Азии и Африке к югу от Сахары (2 на 100 000 населения) [119]. В мире более 2 миллионов человек больны РС, в том числе в России - около 200 тысяч [11]. Количество больных РС растет, что связано не только с улучшением диагностики и лечения РС, но и с увеличением числа заболевших [10]

Исследования [95, 111] показали повышенную смертность у пациентов с РС по сравнению с общей популяцией аналогичного возраста, пола и продолжительности наблюдения. Ожидаемая продолжительность жизни при РС, по-видимому, сокращается на 6–14 лет [118].

1.1 Рассеянный склероз как мультифакторное заболевание

Знание географического распределения РС и понимание естественной истории болезни помогают лучше понять роль эндогенных и экзогенных причин заболевания [184]. РС – полиэтиологическое заболевание, основными пусковыми факторами которого в настоящее время считаются вирусная инфекция [67, 80, 201], наследственная предрасположенность [71], экологические факторы, гормональные нарушения [15, 26]. Срыв ауто толерантности – ключевое событие в патогенезе РС [7]. Ауто толерантность – способность организма не стимулировать иммунокомпетентные клетки к иммунным реакциям в отношении антигенов, входящих в состав собственных тканей и клеток, а в случае РС – к компонентам миелина [101]. К развитию аутоиммунной патологии может привести нарушение любого из процессов, обеспечивающих неотвечаемость на собственные антигены: повреждение барьеров [190], антигенная мимикрия [159], снижение активности Treg [39], а также возрастание уровня антигенов, концентрация которых исходно была ниже уровня, необходимого для распознавания иммунной системой [185]. В организме здоровых людей постоянно образуются аутореактивные (или аутоспецифичные) клетки, но благодаря механизмам отрицательной селекции их количество не возрастает до уровня, необходимого для развития аутоиммунной патологии [144]. Возможный механизм инициации аутоагрессии при РС — молекулярная мимикрия вирусных и бактериальных антигенов под антигены миелина, что ведет к перекрестной реакции специфических Т-клеток на аутоантигены, особенно на фоне недостаточности регуляторных Т-клеток и других контрольных механизмов [49]. Предложен ряд вирусов и бактерий, которые,

возможно, вызывают РС [67, 80, 201], но особенно выделяется вирус Эпштейн-Барр [54, 120], который более распространен у больных РС, чем у людей без данной патологии, особенно в детском возрасте [159]. Предполагается, что большая часть В-клеток, проникающих в ЦНС, инфицирована вирусом Эпштейна-Барра, что препятствует их дифференцировке, способствует В-клеточной дисрегуляции при РС [182]. Прекурсорная роль вируса Эпштейн-Барр неоднократно доказана в исследованиях [120,159].

К срыву ауто толерантности может привести также отравление тяжелыми металлами посредством хронической стимуляции иммунной системы – повышение пролиферации Т- и В-лимфоцитов, в том числе и аутореактивных [26].

Уровень Трег клеток у больных с РС достоверно не отличается от здоровых доноров. Но, несмотря на одинаковое содержание Трег клеток, способность к подавлению иммунного ответа у пациентов с РС ниже, чем у здоровых доноров [47].

Есть данные о связи РС с недостаточностью витамина D [27], мелатонина [68] или инсоляции во внутриутробном периоде.

Таким образом, срыв ауто толерантности, запускающий клеточный ответ при РС, может быть вызван несколькими причинами, вероятно, их сочетанием [102], и В-клеточная дисрегуляция может быть одной из таких причин.

1.1.2 Основные аспекты патогенеза рассеянного склероза

1.1.2.1. Антигенпрезентация при рассеянном склерозе

Презентация антигена — важный процесс формирования приобретенного иммунитета, в ходе которого специализированные клетки представляют антиген Т-лимфоцитам, инициируя иммунный ответ – эти клетки называют антигенпрезентирующими (представлять антигены могут не только клетки

иммунной системы, но и неиммунные – например, эпителиальные клетки) [44].

Основную роль в презентации пептидных антигенов антигенпрезентирующими клетками Т-лимфоцитам играют гликопротеины, относящиеся к антигенам лейкоцитов человека (HLA). HLA кодируются генами главного комплекса гистосовместимости. Выделяют гликопротеины MHC класса I (HLA-A, HLA-B и HLA-C), представленные на поверхности всех соматических клеток, за исключением клеток ворсинчатого трофобласта и эритроцитов [66], и MHC класса II (HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR) [189], находящиеся преимущественно на мембране профессиональных антигенпрезентирующих клеток (дендритных клеток, активированных макрофагов и В-лимфоцитов), а также на некоторых Т-хелперах, и ассоциирующиеся с риском развития РС [185]. Молекулы MHC-I и MHC-II связываются с поверхностными маркерами Т-клеток: MHC-I - с CD8 (маркер Т-киллеров), а MHC-II - с CD4 (маркер Т-хелперов) [93].

Дендритные клетки являются главными профессиональными антигенпрезентирующими клетками организма – они конститутивно экспрессируют на мембране костимулирующие молекулы CD80/CD86, благодаря которым могут активировать наивные Т-лимфоциты (не контактировавшие ранее с антигеном), тогда как два другие типа профессиональных антигенпрезентирующих клеток, макрофаги и В-лимфоциты, экспрессируют CD80/CD86 только в ответ на стимуляцию [192]. Фенотипы дендритных клеток различаются не только у пациентов с РС и здоровых людей [181], но и у пациентов с разным типом течения РС [25]. Дендритные клетки обнаруживаются не только в периферической крови, но и в спинномозговой жидкости и бляшках РС [53,181].

Периваскулярные макрофаги являются распространенным типом клеток в ЦНС [70]. С одной стороны, микроглия и макрофаги способствуют нейровоспалительным и нейродегенеративным событиям при РС, представляя антигены Т-клеткам, высвобождая воспалительные медиаторы и

стимулируя активность лейкоцитов и инфильтрацию в ЦНС. С другой стороны, микроглия и макрофаги помогают в восстановлении ЦНС путем производства нейротрофических факторов и удаления продуктов дегенерации миелина [36].

Исследования последних лет показывают, что В-лимфоциты также могут вносить вклад в презентацию антигенов Т-лимфоцитам при РС – за счет реализации альтернативных (не связанных с антителообразованием) функций [74].

1.1.2.2 Роль субпопуляций Т-клеток в патогенезе РС

Представление антигена в контексте (в составе, в комплексе) молекул МСН (I или II класса) Т-лимфоциту инициирует образование иммунного синапса между антигенпрезентирующей клеткой и Т-клеткой. Если иммунный синапс формируется адекватно, Т-лимфоцит активируется – запускается процесс пролиферации, то есть образование иммунного синапса выводит клетку из фазы покоя и переводит в фазу деления [72].

Основную роль в регуляции патогенеза РС играют Т-хелперы (CD4⁺ Т-клетки), причем наиболее значимыми являются Т-хелперные субпопуляции Th1, Th17 и Treg. Эти субпопуляции развиваются из наивных Т-хелперов [23].

Th1-клетки способны продуцировать провоспалительные цитокины – IFN- γ , лейкотриен- α , также IL-2 и фактор некроза опухоли- α (TNF- α). После их миграции в очаг поражения IFN- γ , продуцируемый клетками Th1, активирует макрофаги с образованием металлопротеиназ, оксида азота и провоспалительных цитокинов [23]. За счет продукции цитокинов и вовлечения в иммунные реакции других клеток (прежде всего – макрофагов и микроглии) Th1 усиливают проницаемость ГЭБ [152] и промотируют воспаление в ЦНС. При этом изолированно от других клеток Th1 не вызывают запуск аутоиммунной реакции: в экспериментальных моделях РС

при удалении всей их субпопуляции аутоиммунное заболевание все равно развивалось [208].

Th17 – еще одна провоспалительная Т-хелперная субпопуляция, получившая название по ключевому продуцируемому цитокину – IL-17. Дифференцировка Th17 из наивных CD4⁺ Т-клеток регулируется транскрипционным фактором ROR γ t, который служит маркером данной субпопуляции [86]. Основная функция Th17 клеток – защита от бактериальных и грибковых повреждений [211], но эта субпопуляция играет важную роль и в развитии аутоиммунных процессов в организме [51,117,126]. За счет продукции IL-17 данные клетки могут привлекать нейтрофилы в сайт воспаления и активировать их, что вносит существенный вклад в развитие воспаления, в том числе – в развитие нейровоспаления при РС. Наряду с индукцией воспаления, Th17-зависимые цитокины вызывают образование зародышевых центров, в том числе – в тканях-мишенях аутоиммунной атаки, что также вносит вклад в развитие аутоиммунных патологий [156]. Важно отметить, что клетки Th17 могут проявлять высокую пластичность. С одной стороны, в очагах воспаления они могут быстро переходить в клетки с фенотипом Th1 (CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие ключевой транскрипционный фактор и маркер Th1 T-bet) или в клетки с промежуточным фенотипом Th17/Th1 (коэкспрессирующие ROR γ t и T-bet), обладающие значительно более высоким провоспалительным потенциалом [145]. С другой стороны, в определенных условиях клетки Th17 могут трансформироваться в регуляторные Т-лимфоциты, Treg (экспрессирующие транскрипционный фактор и маркер Treg Foxp3), или в клетки с промежуточным фенотипом Th17/Treg (коэкспрессирующие ROR γ t и Foxp3), существенно снижая тем самым свою провоспалительную активность или даже меняя ее на противовоспалительную [132].

Основной функцией субпопуляции Treg является контроль силы и продолжительности иммунного ответа путем регуляции функций эффекторных Т-клеток (Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов) – как

за счет контактных взаимодействий с Т-эффекторами или дендритными клетками, инициирующими их активацию, так и за счет продукции цитокинов, в первую очередь – TGF β и IL-10, экспрессия которых инициируется основным транскрипционным фактором и маркером Treg Foxp3 [89]. Реализация этих функций приводит к подавлению иммунного ответа, в том числе и ответа на аутоантигены, что определяет важную роль Treg в развитии аутоиммунных патологий, в частности, РС: снижение численности данных клеток у пациентов с РС может провоцировать аутоиммунное воспаление [63]. Наряду с этим, Treg участвуют в восстановлении нервной ткани [202].

Цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺-клетки), осуществляющие лизис-клеток-мишеней, участвуют в прямом повреждении нервной ткани в очагах воспаления [174]. При этом показано, эффекторные Т-клетки, полученные от пациентов с РС, устойчивы к подавляющему воздействию Tregs. Это снижение реакции на регуляцию может способствовать неконтролируемой эффекторной активности Т-клеток у пациентов с РС [92].

Для лучшего понимания патогенеза РС требуется изучение причины изменения субпопуляций Т-клеток у пациентов с РС, одной из которых, возможно, является процесс презентации антигенов.

1.1.2.3. Роль В-клеток в патогенезе РС

Различные находки у пациентов с РС предполагают участие В-клеток в патогенезе заболевания, в частности, показано наличие олигоклональных антител и увеличение количества В-клеток в спинномозговой жидкости, осаждение иммуноглобулина и комплемента в бляшках РС, наличие фолликулоподобных структур из В-клеток в нервной ткани [163].

Олигоклональные антитела являются одним из немногих биомаркеров, используемых в клинической практике для установления диагноза РС [16]. В-клетки в спинномозговой жидкости продуцируют антитела интратекально, поэтому олигоклональные антитела не встречаются в сыворотке [149]. Более

того, В-клетки в спинномозговой жидкости аналогичны В-клеткам в бляшках РС, что указывает на функциональную связь между В-клетками в спинномозговой жидкости и паренхиме головного мозга [148].

В-клетки в ЦНС образуют фолликулоподобные структуры, так называемые зародышевые центры [75]. Ранее нервная ткань считалась «иммунно-привилегированным органом», только недавно было показано, что лимфатические сосуды действительно присутствуют в ЦНС и впадают непосредственно в шейные лимфатические узлы [123]. С другой стороны, нельзя исключать, что образование зародышевых центров может быть проявлением хронического менингеального воспаления, и не иметь отношения к синтезу интратекального Ig.

В литературе имеются противоречивые сведения о антигенпрезентирующей способности В-клеток. По одним данным, В-лимфоциты, выступая в качестве антиген-презентирующих клеток, могут вызывать пролиферацию наивных Т-клеток в провоспалительные популяции Th1 и Th17 [140], по другим - вызывать анергию и пролиферацию в Treg [143]. В экспериментальных моделях РС путем создания мышей с селективным дефицитом МНС II на В-клетках было показано, что антиген-презентация В-клетками имеет решающее значение для индукции MOG-индуцированного ЕАЕ [140]. В-клетки этих мышей все еще могли продуцировать аутоантитела, но больше не могли стимулировать Т-клетки. Снижение стимулирующей способности привело к резистентности к индукции ЕАЕ.

Кроме того, было показано, что В-клетки в ЦНС, вырабатывая провоспалительные цитокины, а именно TNF, лимфотоксины и IL-6, повторно активируют Т-клетки [158]. Исследования показали, что при истощении незрелых В-клеток активность заболевания значительно уменьшается. При этом уровень антител в крови не снижается, так как они вырабатываются зрелой формой В-лимфоцитов - плазматическими клетками [76].

Роль регуляторных В-клеток (Breg), которые подавляют воспаление за счет взаимодействия с регуляторными Т-клетками и АПК, а также продукции цитокинов, в патогенезе РС в настоящее время недостаточно ясна [188]. Некоторые исследования показали, что В-клетки от пациентов с РС обладают пониженной способностью секретировать IL-10 и что у пациентов с РС ниже доля регуляторных В-клеток, продуцирующих IL-10, чем у здоровых людей без РС [107].

Несмотря на имеющиеся данные в литературе, окончательно роль В-клеток в презентации аутоантигенов не определена.

1.1.2.4 Роль цитокинов в патогенезе РС

Цитокины - информационные молекулы, которые обеспечивают дистанционное взаимодействие между клетками иммунной системы [57]. В повреждении нервной ткани при РС участвуют провоспалительные цитокины: IL-2 [162], IL-12/IL-23 [122], INF γ , TNF α [2, 201], IL-6 [90], IL22 [210]. Эти вещества вызывают повышение проницаемости ГЭБ, миграцию клеток в очаг воспаления, повышение пролиферации аутоиммунных клеток [55].

Особенно интересна роль IL-17, который вырабатывают Th17 и минорная субпопуляция В-клеток. IL-17 представляет собой цитокин, который защищает ткани организма от внеклеточных бактериальных и грибковых инфекций и играет важную роль в воспалении [32]. IL-17 индуцирует выработку гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) и хемокинов, таких как CXCL1 и CXCL2 [110], активирует Т-клетки и нейтрофилы [209]. Выявлена связь содержания в нервной системе клеток, продуцирующих IL-17, и активности аутоиммунных заболеваний, в том числе и РС [199]. В экспериментальных моделях была показана роль IL-17 в демиелинизации посредством активации микроглии и привлечения гранулоцитов в очаг воспаления [212].

К противовоспалительным цитокинам относятся IL-10 [146], IL-4 [169] и TGFβ [115]. Эти цитокины вырабатываются в основном Treg и Th2. Одна из субпопуляций В-лимфоцитов - Breg, также вырабатывает IL-10 и TGFβ [171].

Соотношение IL-17/IL-10 при сдвиге в сторону IL-17, вероятно, можно рассматривать как показатель, указывающий на воспаление.

Повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов (IFNγ, TNF, IL-2 и IL-22) и молекул, связанных с устойчивой активностью В-клеток и лимфоид-неогенезом (CXCL13, CXCL10, IL-10), была обнаружена посмертно в мозговых оболочках и СМЖ больных РС с высоким уровнем менингеального воспаления и демиелинизации коры головного мозга [130].

В-клеточный активирующий фактор (BAFF) представляет собой цитокин, который действует как лиганд для нескольких рецепторов фактора некроза опухолей. Это мощный активатор В-клеток, который играет роль в пролиферации и дифференцировке В-клеток, необходимый для нормального функционирования иммунитета [125]. Чрезмерные уровни BAFF приводят к высокому продуцированию антител и связаны с рядом аутоиммунных состояний [83]. С другой стороны, BAFF в нормальной ткани мозга и накапливается в активных контролирует также развитие Breg [175]. BAFF также продуцируется астроцитами бляшках [105]. Предыдущие исследования показали повышение активности BAFF при РС до уровней, обычно наблюдаемых в лимфоидной ткани (в норме в десять раз больше, чем в мозговой ткани). Ингибирование BAFF на животных моделях уменьшает тяжесть заболевания. Интересны изменения BAFF у пациентов с РС. Уровни BAFF в плазме значительно выше у пациентов с РС по сравнению со здоровыми, но в то же время у стабильных пациентов на фоне лечения уровень BAFF в плазме выше, чем у пациентов без лечения [91].

Хемокин13 (CXCL-13) - единственный известный лиганд для рецептора CXCR5, который экспрессируется на зрелых наивных В-клетках (после активации В-клеток он исчезает), фолликулярных хелперных Т-клетках, Th17-клетках и Treg [99]. CXCL-13 вызывает миграцию В-клеток в ЦНС с

формированием фолликулов [127]. CXCL13 в норме продуцируется стромой В-клеточных зон вторичных лимфоидных органов, а в эксперименте продуцируется моноцитами и макрофагами [104]. Все эти данные свидетельствуют о том, что активированные и пролиферирующие клетки микроглии продуцируют большие количества цитокинов, таких как CXCL13, которые привлекают и поддерживают Т и В-клетки в очаге воспаления.

Выявлено, что уровень CXCL-13 у пациентов с РС в ЦСЖ связан с типом и стадией заболевания [167]. Возможно, высокое содержание этого цитокина в плазме крови также влияет на состояние пациентов [62]. Выявлено, что CXCL-13 в плазме крови коррелирует с активностью зародышевых центров В-клеток [118]. С другой стороны, уровень CXCL-13 в сыворотке при РС может быть ниже, чем в ЦСЖ, потому что действие хемокинов связано с различием их концентрации между кровью и нервной тканью [165].

1.1.3 Патоморфологические изменения при рассеянном склерозе и роль микроглии в его патогенезе

Основное морфологическое проявление РС - бляшки, формирующиеся в нервной ткани в процессе демиелинизации [8]. Развитая форма бляшек (острые активные бляшки) представляет собой периваскулярные муфты, образованные мигрирующими из посткапиллярных венул Т-лимфоцитами, активированными макрофагами и клетками микроглии [28]. Поражения разбросаны по всей паренхиме ЦНС и характеризуются обширной инфильтрацией иммунных клеток в периваскулярном пространстве сосудов малого и среднего калибра [113]. Стадии трансмиграции лимфоцитов через ГЭБ включают стадии скручивания, активации, остановки, ползания и миграции лейкоцитов [193]. Основные взаимодействия молекулы адгезии, важные для трансмиграции Т-клеток через ГЭБ, включают селектины [96], leukocyte very late antigen-4 (VLA-4) и endothelial vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), leukocyte lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) и endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) [35], а также

activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) и CD6 [43]. Инфильтрирующие клетки могут далее проникать в паренхиму ЦНС, вызывая демиелинизацию, гибель олигодендроцитов и повреждение аксонов [60]. Демиелинизация в нервной ткани сопровождается процессом нейродегенерации, так как процесс воспаления миелиновой оболочки вызывает снижение питания аксонов, нарушение митохондриальных функций и эксайтотоксичность [65]. Воспаление неизменно присутствует на всех стадиях и во всех формах заболевания, но степень его выраженности различается между различными стадиями заболевания [114]. При прогрессировании РС нейродегенерация может возникать независимо от воспаления [34,157].

Инфильтрация ЦНС лейкоцитами периферической крови, обусловленная дисфункцией ГЭБ, играет существенную роль в развитии поражения при РС [134]. Способность к миграции лимфоцитов зависит от активации рецепторов хемокинов, секреции матрикс-металлопротеиназ и связывания интегринов лейкоцитов с их эндотелиальными лигандами [84]. Гистопатологические исследования показали, что эндотелиальные факторы адгезии и их соответствующие лиганды на инфильтрирующих иммунных клетках активируются при острых поражениях РС [176]. Несмотря на то, что клетки эпителия ГЭБ способны экспрессировать МНС-II в условиях воспаления, они считаются непрофессиональными антигенпрезентирующими клетками [20], если только эта презентация антигена не поддерживается присутствием IL-2 или полностью компетентными АПК. Кроме того, эндотелиоциты и астроциты являются мощными продуцентами цитокинов и хемокинов. [42]. Эндотелиоциты продуцируют цитокины IL-6, IL1 α / β , GM-CSF и хемокины CCL2, CCL3, CCL5 / RANTES, CXCL8 / IL-8, CXCL10 в ответ на воспалительный процесс [130]. Хемокины и цитокины секретируются локально и отвечают за рекрутирование и активацию иммунных клеток. Это основа для воспалительного каскада, который приводит к очаговому воспалению ГЭБ и рекрутированию сторонних иммунных клеток.

Ремиелинизация при РС несовершенна, и в 80-90% очагов вместо полной ремиелинизации происходит формирование астроглиального рубца [29]. Ремиелинизация происходит в два этапа. Первый включает в себя пролиферацию и миграцию олигодендроцитарных клеток-предшественников в бляшку. На втором этапе клетки-предшественники связывают демиелинизированные аксоны и дифференцируются в миелиновую оболочку, образуя олигодендроциты [59]. Потенциально ремиелинизация может потерпеть неудачу на любой из этих двух стадий, обе из которых становятся менее эффективными вследствие прогрессии заболевания. Неясно, почему ремиелинизация неэффективна при РС, но с учетом сложности сигнальной среды возникает гипотеза «дизрегуляции», при которой не выделяется один компонент, а скорее, имеет место расстройство в регулировании передачи сигналов для миелинизации [64].

1.1.4 Особенности диагностики и потенциальные биомаркеры РС

Клинические испытания указывают на преимущества раннего использования ПИТРС. Назначение ПИТРС уже при первой эксацербации значительно продлевают ремиссию и уменьшают образование очагов на МРТ [48]. Поэтому диагностические критерии РС направлены на раннее установление наличия заболевания. Дебют РС в 85% может начинаться с поражения одной неврологической подсистемы, что не позволяет установить диагноз по клинической картине. Такое явление называется клинически изолированный синдром [138]. Критерии РС в настоящее время основаны на определении диссеминации очагов «в месте» и «времени» по данным МРТ, а также определении олигоклональных антител в спинномозговой жидкости [196]. Критерии постоянно пересматриваются и совершенствуются с целью более точной установки диагноза, исключения других состояний, похожих на РС.

Разработка новых биомаркеров при РС необходима для оценки долгосрочного прогноза, разработки индивидуальных планов лечения и

облегчения ранней диагностики, но потенциальным биомаркерам часто не хватает специфичности, воспроизводимости и доступности. Несмотря на значительный интерес, на протяжении многих лет единственными надежными маркерами, обычно используемыми в современной практике, остаются олигоклональные полосы в СМЖ [40]. Показано, что наличие олигоклональных антител в спинномозговой жидкости прогнозирует конверсию клинически изолированного синдрома в РС [58]. В качестве других биомаркеров рассматриваются CXCL13 [81], BAFF [167], семафорины [9], микроРНК [168]. Перспективны также поиски биомаркеров, которые могут предсказать активность и скорость прогрессии заболевания [52], а также эффективность терапии [185]

1.2 Фармакодинамика ПИТРС

До конца 20 века в лечении РС существовало 2 подхода: лечение обострений и симптоматическая терапия. Первые иммуномодулирующие препараты, к которым относились интерфероны- β и глатирамера ацетат, позволили сократить количество обострений на 30-35% [12].

За последние несколько лет возможности лечения значительно изменились, включили терапию с диапазоном дополнительных путей введения (оральный, внутривенный) и более высокой эффективностью, но значительно более серьезными побочными эффектами [142]. В настоящее время существует более 10 ПИТРС, одобренных Европейским комитетом исследования и лечения РС [206]. Наиболее распространенные в практике лечения РС в России - препараты интерферона- β , глатирамера ацетат и натализумаб, и в свете рассматриваемой проблемы определенный интерес представляет их влияние на цитокиновый статус больных РС.

1.2.1 Интерферон- β

Интерферон- β представляет собой природный полипептид, преимущественно продуцируемый фибробластами. Считается, что его

противовоспалительный эффект является результатом ингибирования пролиферации Т-лимфоцитов, сдвига ответа цитокинов с воспалительного ответа на противовоспалительный профиль и уменьшения миграции воспалительных клеток через ГЭБ [56]. Интерферон- β улучшает иммунорегуляцию аутоагрессивных Т-эффекторных клеток у пациентов с РС путем изменения пути передачи сигнала IL-6, таким образом восстанавливая их чувствительность к Treg-опосредованной супрессии [198]. По некоторым данным, интерферон- β -терапия при РС может основываться не только на ее признанных противовоспалительных действиях, но также на специфическом истощении памяти В-клеток, снижая их воспалительное воздействие в органах-мишенях [170]. Выявлено, что интерферон- β переводит некоторые В-клетки в переходную регуляторную популяцию В-регуляторных клеток, которая является критическим механизмом для терапии. Кроме того, переходные В-клетки как у здоровых добровольцев, так и у пациентов с РС, получавших Интерферон- β , являются мощными продуцентами IL-10 [187].

Несмотря на то, что Интерферон- β снижает количество провоспалительных цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α , IL-4) в крови [14], исследования показали, что инъекция этого ПИТРС через 9–12 ч после введения повышает количество BAFF в крови, который остается на уровне выше исходного без увеличения активности заболевания. Более того, повышение уровня BAFF сопровождается снижением (а не ожидаемым увеличением) аутоантител к основному белку миелина на 11–33% [78].

При исследовании эффективности препаратов интерферона- β по сравнению с плацебо отмечено снижение годовой частоты рецидивов примерно на 30-34%, уменьшение прогрессирования инвалидности и активности болезни по результатам МРТ [41]. Интерферон- β был первым препаратом, одобренным для лечения РС, поэтому используется в исследованиях, как препарат сравнения для оценки эффективности всех последующих ПИТРС.

1.2.2 Глатирамера ацетат

Глатирамера ацетат, аминокислотный сополимер, является одобренным лекарственным средством для лечения рецидивирующего РС. Эффективность в снижении частоты обострений и высокий профиль безопасности делают его препаратом первой линии терапии для РС [24]. Были идентифицированы четыре основных механизма действия препарата: 1) конкуренция с основным белком миелина (МВР) за связывание с основными молекулами МНС; 2) конкуренция глатирамера ацетата с МВР за связывание с рецептором Т-клеток; 3) частичная активация и индукция толерантности МВР-специфичных Т-клеток за счет действия в качестве измененного пептидного лиганда; 4) индукция Глатирамера ацетат-реактивных Th2 - подобных Treg. Из этих четырех механизмов первый и второй, по-видимому, встречаются только *in vitro* и поэтому не имеют значения для эффектов глатирамера ацетата. Напротив, третий и четвертый механизмы могут встречаться *in vivo*, и оба они могут способствовать клиническим эффектам препарата [147].

Выявлено также воздействие Глатирамера ацетата на В-клетки. Лечение препаратом изменяет профиль циркулирующих В-клеток у пациентов с РС: снижается общее количество В-клеток (в процентах от всех лимфоцитов), плазмобластов и клеток памяти (в процентах от всех CD19 + В-клеток) [85]. Глатирамера ацетат стимулирует функции Breg, главным образом, путем смещения пролиферации наивных В-клеток от В-клеток памяти, которые вносят вклад в Т-клеточно-зависимый воспалительный ответ, в клетки Breg [22]. Есть данные, что Глатирамера ацетат подавляет факторы выживания В-клеток - BAFF и пролиферативно-индуцирующий лиганд (APRIL), что потенциально приводит к апоптозу аутореактивных В-клеток [31]. Кроме того, при лечении глатирамера ацетатом снижается количество провоспалительных цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α , IL-4) в сыворотке больных РС [14]

Глатирамера ацетат имеет нейропротективную способность, увеличивая секрецию различных нейротрофических факторов: мозгового нейротрофического фактора, нейротропинов, инсулиноподобного фактора роста. Нейропротективные эффекты Глатирамера ацетата наблюдались в различных условиях: при нейровоспалении (ЕАЕ и РС) и нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и боковой амиотрофический склероз [164].

Показано, что эффективность Глатирамера ацетата и интерферона- β существенно не различается, а профили их безопасности и переносимости сопоставимы [137].

1.2.3 Натализумаб

Натализумаб является моноклональным антителом против $\alpha 4$ -интегрина, блокирующим взаимодействие с его лигандами. Натализумаб относится ко второй линии лечения РС. Применение натализумаба снижает годовую частоту рецидивов на первом году лечения на 65-75%, риск первого рецидива - на 53-82% и прогрессирование инвалидности - на 26% по сравнению с препаратами первой линии [187].

Основной механизм действия препарата заключается в предотвращении адгезии активированных лейкоцитов к воспаленному эндотелию, что препятствует миграции воспалительных клеток в ЦНС [197], не исключается наличие других иммунологических эффектов. У пациентов, принимавших Натализумаб, наблюдается уменьшение количества CD4 + клеток в СМЖ независимо от их реакции на лечение, а у пациентов, не имеющих активности заболевания, наблюдается снижение синтеза IgG и практически исчезновение В-клеток, в частности CD5 + и плазмобластов, [203]. Выявлено заметное снижение уровней цитокинов и хемокинов в СМЖ, включая провоспалительные цитокины (IL-1 β , IL-6 и IL-8), а также хемокины, связанные как с Th1 (CXCL9, CXCL10, CXCL11) и Th2 (CCL22). [135].

CXCL13 в СМЖ у пациентов, получающих натализумаб, значительно ниже по сравнению с лечившимися интерфероном- β [121].

Таким образом, можно предположить, что Глатирамера ацетат, Интерферон- β и Натализумаб оказывают влияние на цитокины, характеризующие активность В-клеток, Th17 и Treg лимфоцитов.

Резюмируя вышеизложенное, можно отметить, что не все звенья патогенеза раскрыты, некоторые из них могли бы стать мишенью таргетной терапии РС, которая, безусловно, нуждается в совершенствовании. Официально разрешенные препараты для лечения рецидивирующего РС имеют небольшую эффективность или не эффективны при прогрессирующем РС, а также при отсутствии активности воспаления при РС [150]. Кроме того, есть пациенты, резистентные к ПИТРС. Для улучшения персонализированного лечения РС необходимо расширять спектр возможных лекарственных средств. Перспективным направлением в этом отношении является производство препаратов на основе моноклональных антител, направленных на определенные точки патогенеза [151], как наиболее эффективных и безопасных методов лечения [133]. В-клетки сейчас используются как мишени моноклональных тел для лечения РС (например Окрелизумаб), а Th17 клетки могли бы стать потенциальными точками приложения терапии. В то же время цитокины BAFF, CXCL-13, IL-17 возможно рассмотреть и как потенциальные биомаркеры РС, и как показатели, которые нужно учитывать при подборе терапии.

ГЛАВА 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБЛЮДЕНИЙ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена за период с 2018 по 2020 г.г. на кафедре неврологии и медицинской генетики ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им.академика Е.А.Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Иммунологическое исследование проведено в лаборатории иммунорегуляции "Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук" – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН, г. Пермь).

2.1. Дизайн исследования, объем наблюдений

Общая совокупность обследуемых составила 81 человек, из них 68 - пациенты с диагнозом РС и 13 – здоровые доноры. Для исследования был использован дизайн открытого поперечного контролируемого исследования. Обследование пациентов было одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России. Все пациенты были осведомлены о целях и методах работы, возможных рисках и подписали информированное согласие перед исследованием.

Критериями включения в основную группу были: возраст от 18 до 60 лет, ремиттирующий-рецидивирующий тип течения РС, отсутствие обострения РС в период исследования и за 30 дней до него, достоверный диагноз РС соответственно критериям McDonald (2010), подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями исключения из основной группы были: возраст моложе 18 и старше 60 лет, первично-прогрессирующий и вторично-прогрессирующий тип РС, установленная беременность на момент исследования, сопутствующие аутоиммунные, онкологические и тяжелые соматические

заболевания, острые воспалительные заболевания или обострение РС на момент исследования, прием глюкокортикоидной терапии менее чем за 30 дней до исследования.

Все пациенты с диагнозом РС, принявшие участие в исследовании, удовлетворяли критериям включения. Пациенты с РС были в дальнейшем поделены на 4 подгруппы в зависимости от принимаемой терапии: глатирамера ацетат, интерфероны β , натализумаб, а так же подгруппа пациентов, не принимавших терапию, как минимум, 6 месяцев до исследования.

Достоверный диагноз РС основывался на критериях McDonald пересмотра 2010 года [4, 160], данных анамнеза, клинического обследования и результатов МРТ-исследований головного и спинного мозга. Критерии диагностики доказывали распространенность процесса во времени и пространстве при исключении альтернативных диагнозов. Клиническое обследование пациентов включало сбор данных о длительности заболевания, частоте обострений, симптомов в дебюте заболевания. Всем пациентам с РС была проведена оценка неврологического статуса по шкале EDSS.

Диагностические критерии РС (McDonald, 2010) включают клинические и параклинические методы для выявления диссеминации поражений в пространстве (DIS) и времени (DIT) и исключения альтернативных диагнозов. МРТ критерии для DIS: наличие очагов в режиме T2, расположенных в 2-х из 4-х локализаций, характерных для РС: юкстакортикально, перивентрикулярно, инфратенториально и в спинном мозге. МРТ критерии для DIT: появление нового очага в режиме T2 по сравнению с МРТ, выполненной не менее чем через 30 дней после начала клинических проявлений, или одновременное наличие очагов, накапливающих и не накапливающих вводимый внутривенно контраст. [141]

Хотя диагноз может быть поставлен только на основании клинических данных, МРТ ЦНС может поддерживать, дополнять или даже заменять некоторые клинические критерии. Критерии Макдональда привели к более

ранней диагностике РС с высокой степенью специфичности и чувствительности, что позволило улучшить ведение пациентов и обеспечило более раннее назначение терапии. [160].

Обострением РС считалось острое или подострое развитие неврологических симптомов, новых или имевшихся когда-либо ранее, продолжительностью более 24 ч в отсутствие признаков инфекции или повышения температуры тела [124]. Для объективизации обострения субъективную симптоматику подтверждали нарастанием неврологического дефицита не менее, чем на 2 балла по одной из функциональных шкал или не менее, чем на 1 балл по двум функциональным шкалам и/или не менее, чем на 1 балл при исходной EDSS менее 4,0 или нарастание общего балла по шкале инвалидизации EDSS на 0,5 балла при исходной EDSS 4,0 и более балла [3].

В исследуемой группе было 40 женщин (59%) и 28 мужчин (41%) (соотношение 1,4:1) в возрасте 20 - 57 лет. Клиническая характеристика пациентов с РС представлена в табл. 2.1.

Таблица 2.1.

Клиническая характеристика пациентов с РС

№ п.п	Показатель	Me [LQ;UQ]	Крайние значения показателей
1	Возраст (лет) Ж/М	34,50 (29;40) 35,50 (30;40)/ 36 (29;40)	20-57
2	пол (Ж/М) (n)	40/28	
3	Продолжительность заболевания (лет) Ж/М	6,0(3,0;10,0) 6,0(3,0;10,5)/ 6,0 (3,5;9,0)	0,5-25
4	Частота обострений (раз в год)	0,60(0,38;1,00) 1,00 (0,40;1,25)/	0-3

	Ж/М	0.50 (0,25;1,00)	
5	EDSS (баллы) Ж/М	3,00 (2,00;4,00) 3,00 (2,50;4,00)/ 3,00 (1,75;4,00)	1,00-6,00

Между мужчинами и женщинами не было выявлено различия по EDSS ($p=0,400$), продолжительности заболевания ($p=0,950$) и частоте обострений ($p=0,260$).

В зависимости от характера терапии выделено 4 подгруппы пациентов:

1 группа - 19 человек, принимавших интерфероны β в течение не менее 6 месяцев (Интерферон бета-1а по 12000000МЕ (44мкг) 0,5мл внутримышечно 3 раза в неделю, интерферон бета-1а по 6000000 МЕ (30 мкг) 1 мл внутримышечно 1 раз неделю, интерферон бета-1b 9600000 МЕ (30 мкг) по 1мл внутримышечно через день).

2 группа - 18 человек, которые принимали глатирамера ацетат в течение не менее 6 месяцев (по 20 мг 1 раз в день в виде подкожной инъекции).

3 группа - 20 человек, получавших натализумаб в течение не менее 6 месяцев (300 мг в виде внутривенной инфузии 1 раз в 28 дней).

4 группа – 11 человек не получали ПИТРС в течение как минимум 6 месяцев до начала исследования. В эту группу вошли пациенты, которым диагноз РС был поставлен недавно и иммуномодулирующая терапия только планировалась, либо пациенты, отказавшиеся от ПИТРС по различным соображениям (плохая переносимость, личные особенности пациентов).

Клиническая характеристика пациентов по подгруппам представлена в табл. 2.2.

Таблица 2.2

Клиническая характеристика пациентов с РС по подгруппам терапии

Показатель	Пациенты, принимавшие ПИТРС (n=57)	Интерфероны β (n=19)	Глатирамера ацетат (n=18)	Натализумаб (n=20)	Без ПИТРС (n=11)	p
	1	2	3	4	5	
Возраст (лет)	36,00 (30,00; 41,00)	39,00 (27,50; 42,00)	38,00 (32,25; 44,00)	33,00 (28,75; 36,50)	33,00 (26,00; 37,50)	нет
Пол (n) (Ж/М)	33/24	11/8	12/6	10/10	7/4	
Длительность заболевания (лет)	7,0 (4,0;11,0)	5,0 (3,0;7,0)	9,5 (6,5; 12,5)	7,0 (5,0;9,25)	1,01 (0;3,0)	$p^{1-5}=0,000$
Частота обострений (количество в год)	0,50 (0,20;1,00)	0,40 (0,50; 1,00)	0,55 (0,20; 1,00)	0,50 (0,20; 1,12)	1,00 (0,85; 1,75)	$p^{1-5}=0,009$
EDSS (баллы)	3,50 (2,50;4,00)	3,00 (2,25; 4,00)	3,00 (2,50; 4,00)	3,75 (3,00; 4,00)	2,00 (1,50; 2,50)	$p^{1-5}=0,020$

Примечание: здесь и далее представлены только статистически значимые различия.

Из таблицы видно, что продолжительность заболевания пациентов без терапии была значительно ниже ($p^{1-5}=0,000$), чем у пациентов, принимавших ПИТРС, так как ПИТРС принято назначать как можно раньше после

установки диагноза. В этой же группе (без терапии) была ожидаемо ниже EDSS. Частота обострений в год была достоверно выше у пациентов без терапии по сравнению с остальными пациентами ($p^{1-5}=0,009$). Это соотносится с данными исследований эффективности ПИТРС в отношении снижения частоты обострений [194].

Не смотря на более частые обострения у пациентов без ПИТРС EDSS у них была ниже, чем у пациентов, получающих ПИТРС ($p^{1-5}=0,020$), за счет подгруппы натализумаба ($p=0,026$), что вполне объяснимо тем, натализумаб, являющийся препаратом второй линии терапии, предназначен для лечения активных форм РС. Отметим, что подгруппы пациентов с различными видами терапии по тяжести неврологического дефицита не отличались от пациентов без лечения.

Таким образом, группа пациентов, не принимавших ПИТРС, была сравнима с группами пациентов, принимавших терапию первой линии по основным параметрам – возрасту, полу, тяжести неврологического дефицита.

Ожидается при нарастании длительности заболевания и увеличении возраста пациентов нарастала EDSS (соответственно $R=0,43$, $p=0,000$ и $R=0,44$, $p=0,000$).

Все подгруппы пациентов, получавших ПИТРС, значимо не отличались между собой по количеству обострений и длительности заболевания.

Таблица 2.3.

Показатели функциональных систем (FS) у пациентов при разных вариантах ПИТРС и без терапии

Показатель (баллы)	Группы терапии		Me [LQ;UQ]	p
FS1 (зрительные функции)	1	интерфероны β	0,0 (0,0;1,0)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	0,0 (0,0;1,0)	
	3	натализумаб	1,0 (0,0;1,0)	
	4	без терапии	0,0 (0,0;1,0)	
FS2 (функции ствола мозга)	1	интерфероны β	1,0 (1,0;2,0)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	1,0 (1,0;2,0)	
	3	натализумаб	1,0 (1,0;2,0)	
	4	без терапии	1,0 (1,0;2,0)	
FS3 (пирамидные функции)	1	интерфероны β	2,0 (1,0;3,0)	$p^{2-4}=0,032$ $p^{3-4}=0,038$
	2	глатирамера ацетат	2,0 (2,0;3,0)	
	3	натализумаб	2,5 (1,0;3,0)	
	4	без терапии	1,0 (1,0;1,5)	

FS4 (мозжечковые функции)	1	интерфероны β	2,0 (2,0;2,0)	$p^{2-4}=0,033$ $p^{3-4}=0,025$
	2	глатирамера ацетат	1,0 (1,0;2,0)	
	3	натализумаб	2,0 (2,0;2,0)	
	4	без терапии	1,0 (1,0;1,5)	
FS5 (сенсорные функции)	1	интерфероны β	1,0 (0,5;2,0)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	2,0 (0,3;2,0)	
	3	натализумаб	2,0 (1,0;2,0)	
	4	без терапии	1,0 (0,0;2,0)	
FS6 (функции кишечника и мочевого пузыря)	1	интерфероны β	0,0 (0,0;2,0)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	0,5 (0,0;2,0)	
	3	натализумаб	1,5 (0,0;2,0)	
	4	без терапии	0,0 (0,0;0,5)	
FS7 (мыслительные функции)	1	интерфероны β	0,0 (0,0;1,0)	$p^{2-3}=0,040$ $p^{2-4}=0,018$
	2	глатирамера ацетат	1,0 (0,0;1,0)	
	3	натализумаб	0,0	

			(0,0;1,0)	
	4	без терапии	0,0 (0,0;0,0)	
FS8 (передвижение, ambulation score)	1	интерфероны β	0,0 (0,0;0,0)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	0,0 (0,0;0,8)	
	3	натализумаб	0,0 (0,0;1,0)	
	4	без терапии	0,0 (0,0;0,0)	

Таким образом, было выявлено, что у пациентов без терапии состояние функциональных систем (пирамидной, мозжечковой и церебральной) было лучше, чем у пациентов на терапии, а особенно, принимающих натализумаб и глатирамера ацетат, что объясняется влиянием длительности заболевания на состояние пациентов.

Часть пациентов помимо РС имела сопутствующие заболевания (табл. 2.4), а так же их сочетания, которые, вероятно, не влияли на исследованные иммунологических показателей.

Таблица . 2.4.

Сопутствующие заболевания у пациентов с РС

Заболевание	Количество пациентов (n)
Аномалия Арнольда-Киари	1
Хронический гастрит вне стадии обострения	3
Симптоматическая эпилепсия с редкими первично-генерализованными припадками	2
Гипертоническая болезнь I –III ст., 2-3 ст., риск 2-3	11
Дорсопатия различной локализации	11

Миопия	3
Мастопатия	1
Синдром Жильбера	1
Гиперметропия	1
Мочекаменная болезнь почек	1
Хронический тонзиллит вне обострения	1
Билиарный панкреатит вне обострения	1
Полип матки	1
Диффузный зоб	1
Микроаденома гипофиза	1
Синдром раздраженного кишечника	1
Закрытая черепно-мозговая травма (сотрясение головного мозга) в анамнезе	1

Симптомы дебюта РС у пациентов были достаточно разнообразны. Чаще всего заболевание начиналось с чувствительных нарушений и с ретробульбарного неврита (табл. 2.5).

Таблица 2.5

Варианты дебюта у пациентов с РС

Вид дебюта	Количество пациентов	% от общего числа
Чувствительные нарушения	19	28%
ретробульбарный неврит	17	25%
Пирамидные нарушения	8	12%
Мозжечковые нарушения	7	10%
Стволовые	3	4%

нарушения		
Тазовые нарушения	2	3%
Полисимптомный дебют	12	18%

Таким образом, по всем характеристикам – возрастной и половой структуре, обострениям заболевания, клиническим проявлениям, характеризующим топику поражения, получаемой терапии – пациенты исследуемой группы не отличалась от классических больных с РС.

2.2. Основные методы исследования

РС, как хроническое заболевание с прогрессирующим течением, требует стандартизированного метода оценки клинического состояния. Expanded Disability Status Scale (EDSS), предложенная John F. Kurtzke, является самой известной международной шкалой, применимой для оценки динамики состояния, обострений, степени инвалидности и эффективности лечения пациентов с РС [109]. EDSS включает оценку по функциональным системам и оценку амбулаторного индекса (возможности передвижения).

Проведение EDSS достаточно для клинической практики, но для научных исследований часто используются более углубленные методики обследования: скорость ходьбы [144], функциональных возможностей по Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) [136]. При использовании EDSS не все неврологические функции характеризуются достаточно полно, поэтому целесообразно использование специальных методов баллированной оценки двигательных функций, психического и когнитивного состояния пациентов [183].

2. 2.1. Тестирование функциональных возможностей пациентов

Тестирование функциональных возможностей верхних и нижних конечностей, а также когнитивных функций проводилось по MSFC (Multiple Sclerosis Functional Composite) [161]. Для оценки скорости и точности работы рук, а также зрительного контроля использовался девяти-луночный тест (9-NTP) с использованием специального планшета с девятью колышками и девятью лунками. Исследование начинали с доминантной руки. Цель испытуемого - как можно быстрее одной рукой расставить колышки в лунки по одному, а затем убрать. Испытания проводились по два раза каждой рукой.

Для оценки скорости ходьбы и старт-реакции был проведен тест ходьбы на двадцать пять футов (25Tw). Пациенту предлагалось как можно быстрее по сигналу врача пройти заранее отмеченную дистанцию в 25 футов. Бежать во время теста не разрешалось.

Для оценки гибкости мышления и внимания проводился слуховой тест на сложение в заданном темпе PASAT-3 (Paced Auditory Serial Addition Test). Материалы теста представляют собой стандартную аудиозапись с перечислением с промежутком 3 секунды последовательности цифр, которые необходимо сложить попарно (всего 10 сложений для тренировочного теста и 60 для основного теста) и бланк для записи правильных ответов. Тренировочный вариант теста, включающий набор из 11 цифр, можно было пройти не более 3-х раз, пока пациент не был в состоянии дать хотя бы 2 правильных ответа при сложении цифр. Цифры необходимо было складывать по цепочке с предыдущим названным числом и называть результат. Запоминать сумму чисел пациенту было не нужно. Если пациент сбивался, тест продолжался. Ответы пациента фиксировались на отдельном бланке, затем подсчитывалось набранное количество баллов из 60 возможных.

2.2.2. Оценка утомляемости, качества жизни и аффективных расстройств пациентов

Психометрическое обследование пациентов проводилось с помощью анкет:

- Госпитальная шкала тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale, A. S. Zigmond, R. P. Snaith, 1983) для оценки аффективных нарушений у пациентов с РС [13]. Шкалу необходимо было заполнить за 10-15 минут самостоятельно, без обсуждения с кем-либо. Каждому утверждению шкалы HADS соответствуют четыре варианта ответа. Необходимо было отметить тот из ответов, который соответствовал состоянию пациентов в течение последних 7 дней. После заполнения всей шкалы суммировались баллы отдельно для каждой части. Полученный результат был интерпретирован по схеме: 0-7 баллов - отсутствие достоверно выраженных симптомов; 8-10 баллов - субклинически выраженная тревога или депрессия; 11 баллов и более - клинически выраженная тревога или депрессия.

- MSIS-29 (Multiple Sclerosis Impact Scale) для оценки качества жизни пациентов в течение последних 2-х недель. Тест включает 20 вопросов по самостоятельной оценке физического состояния и 9 вопросов по оценке психического состояния. По каждому пункту следует выбрать степень нарушения из пяти возможных, от незначительной, соответствующей 1 баллу, до выраженной, соответствующей 5 баллам [79].

- FSS (Fatigue Severity Scale) для оценки выраженности утомляемости пациентов. Опросник включает 9 утверждений по утомляемости, по каждому из которых следует указать, насколько оно соответствует состоянию пациента по шкале от 1 до 7 [106]

2.2.3. Способы оценки и характеристика функциональных возможностей пациентов основной группы

Функциональные возможности обследованных пациентов по шкале MSFC описаны в таблице 2.6

Таблица 2.6.

Характеристика функциональных возможностей пациентов с РС

№ п.п	Показатель	Me [LQ;UQ]	Крайние значения показателей
1	Ходьба на 25 футов (секунды)	5,28 (4,20;5,90)	3,50-11,30
2	9-ти луночный тест доминантной руки (секунды)	20,68 (18,56;23,95)	10,65-30,35
3	9-ти луночный тест недоминантной руки (секунды)	21,95(19,45;25,95)	15,95-53,25
4	PASAT (ответы)	44(38;50)	19-60

При проведении сравнительного анализа была выявлена связь между EDSS и функциональными показателями рук (доминантной и недоминантной - $R=0,55$, $p=0,000$ и $R=0,45$, $p=0,000$) и ходьбы на 25 футов ($R=0,65$, $p=0,000$), что указывает на связь физиологических показателей с клиническими данными [153].

При сравнении функциональных тестов в группах с различной терапией были получены результаты, описанные в таблице 2.7.

Таблица 2.7

Функциональные возможности пациентов с РС по группам сравнения

Показатель	Группы сравнения		Me [LQ;UQ]	p
Ходьба на 25 футов (секунды)	1	Интерфероны β	4,55(4,35;6,10)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	4,68(4,25;5,65)	
	3	натализумаб	4,93(4,15;6,12)	

	4	Без терапии	4,45(4,05;6,15)	
9-ти луночный тест доминантной руки (секунды)	1	Интерфероны β	21,75 (18,25;25,20)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	20,17 (18,9;22,10)	
	3	натализумаб	19,87 (18,42;25,25)	
	4	Без терапии	20,20 (18,55;23,65)	
9-ти луночный тест недоминантной руки (секунды)	1	интерфероны β	21,80 (19,45;25,2)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	21,95 (19,45;25,85)	
	3	натализумаб	22,42 (19,68;26,56)	
	4	Без терапии	21,15 (20,15;24,55)	
PASAT (ответы)	1	Интерфероны β	46 (38;51)	p ²⁻ ³ =0,026 p ³⁻ ⁴ =0,037
	2	глатирамера ацетат	48 (40;54)	
	3	натализумаб	39 (34;45)	
	4	Без терапии	41 (37;44)	

Не было выявлено разницы между подгруппами по показателям функциональных возможностей рук и ходьбы, но когнитивные способности по тесту PASAT были значимо ниже у пациентов, принимающих натализумаб, чем у пациентов, получавших глатирамера ацетат и пациентов без терапии.

Кроме описанных выше закономерностей была выявлена разница между мужчинами и женщинами по показателям ходьбы на 25 футов (у мужчин

4,22(3,90;4,90) сек, у женщин 5,02(4,50;6,17) сек, $U=288$, $p=0,001$) и 9-ти луночного теста для недоминантной руки (у мужчин 23,05(21,15; 26,85) сек, у женщин 20,95(19,07;24,78) сек, $U=383$, $p=0,005$). Более высокая скорость ходьбы у мужчин с РС была уже показана в исследованиях [37] как и лучшее выполнение тестов на ловкость рук у женщин с РС [19].

2.3. Способы оценки и характеристика эмоционального состояния, утомляемости и качества жизни у пациентов с РС

Пациенты предъявляли жалобы на утомляемость [1]. При объективной оценке наличие этого симптома обнаружено у 93% пациентов, а среднее значение показателя по FSS составило 31,0 (14,0;46,0) баллов, при норме – 9.

Многие пациенты жаловались на тревожные расстройства, которые при психометрическом тестировании были выявлены у 19% - в виде субклинической тревоги, у 16% - клинически выраженной. Депрессивные расстройства отмечены реже (у 13% - субклиническая депрессия, у 12% - клинически выраженная). Качество жизни было нарушено в той или иной степени у всех пациентов с РС, среднее значение MSIS 29 (49,5(37,0;72,0) баллов) существенно превышало норму (29 баллов). Все эти показатели приведены в таблице 2.8.

Таблица 2.8

Характеристика эмоционального состояния, утомляемости и качества жизни у пациентов с РС

№ п.п	Показатель	Me [LQ;UQ]	Крайние значения показателей
1	Тревога по шкале HADS (баллы)	6 (4,0;9,0)	0,0-21,0
2	Депрессия по шкале HADS (баллы)	4,0 (2,0;7,5)	0,0-18,0
3	Оценка утомляемости по	31,0(14,0;46,0)	9,0-63,0

	FSS (баллы)		
4	Качество жизни по шкале MSIS 29	49,5(37,0;72,0)	30,0-128,0

Значимые корреляционные связи EDSS с данными показателями составляли: $R=0,54$, $p=0,000$ – для депрессии по шкале HADS; $R=0,24$, $p=0,030$ - для тревоги по шкале HADS; $R=0,61$, $p=0,000$ - для утомляемости по FSS; $R=0,76$, $p=0,000$ для качества жизни по шкале MSIS 29. Таким образом, все данные показатели прямо коррелировали с выраженностью неврологического дефицита.

При сравнении данных показателей по группам терапии были получены результаты, описанные в таблице 2.9.

Таблица 2.9.

Характеристика субъективного состояния пациентов с РС по группам сравнения

Показатель		Группы сравнения	Me [LQ;UQ]	p
Тревога по шкале HADS(баллы)	1	интерфероныβ	5,0(4,0;6,0)	$p^{1-4}=0,020$
	2	глатирамера ацетат	6,5(5,0;8,0)	
	3	натализумаб	6,0(4,0;9,0)	
	4	Без терапии	7,0(6,0;13,0)	
Депрессия по шкале HADS(баллы)	1	интерфероныβ	3,0 (1,0;5,0)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	5,5 (2,0;8,0)	
	3	натализумаб	4,5(2,0;6,0)	
	4	Без терапии	4,0 (3,0;12,0)	
Оценка утомляемости по FSS (баллы)	1	интерфероныβ	22,0 (13,0;47,0)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	28,0 (13,0;43,0)	

	3	натализумаб	35,5 (29,0;45,0)	
	4	Без терапии	24,0 (13,0;55,0)	
Уровень жизни по шкале MSIS 29	1	интерфероныβ	46,0 (38,0;87,0)	Нет значимых различий
	2	глацирамера ацетат	43,5 (34,0;59,0)	
	3	натализумаб	59,5 (38,0;72,5)	
	4	Без терапии	46,0 (35,0;72,0)	

Не было выявлено разницы между подгруппами по показателям депрессии, утомляемости и оценке уровня жизни, но тревога у пациентов, не принимающих терапию, была более выражена, чем у пациентов, принимающих интерфероны β. Это возможно было связано с тем, что на ранних этапах заболевания более выражена реактивная тревога в связи с большей озабоченностью пациентов по поводу своей судьбы. В связи с тем, что тревога наблюдалась не у всех пациентов, медиана показателя была невысокой - 7 баллов, что почти соответствует субклинической тревоге [2].

2.4. Лабораторные методы исследования

У всех пациентов и здоровых доноров были взяты образцы периферической крови. Забор крови проходил с соблюдением асептики из кубитальной вены. Венозную кровь в сухих пробирках (10 мл) центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут, затем отделившуюся сыворотку отбирали в эппендорфы и хранили при температуре - 20° С для дальнейшего определения уровней IL-17A, IL -10, CXCL-13, BAFF и общего Ig иммуноферментным анализом (ИФА).

Одновременно был исследован потенциальный вклад В-лимфоцитов в синтез IL-17 при рассеянном склерозе – двумя путями: 1) *in vitro* оценивали роль В-зависимой презентации антигенов в регуляции дифференцировки Т-хелперов (Th17/Treg) – по экспрессии соответствующих внутриклеточных маркеров - проточной цитометрией, а также по уровню ключевых цитокинов

(IL-17/IL-10) в культуральных супернатантах - иммуноферментным анализом; 2) *ex vivo* определяли способность В-лимфоцитов непосредственно синтезировать IL-17 – по внутриклеточной экспрессии данного цитокина в свежесыведенных клетках - проточной цитометрией.

В исследовании участвовали 13 пациентов с РС и 11 здоровых доноров. Для этого дополнительно 15 мл крови собирали в стерильные пластиковые пробирки, содержащие гепарин (25 ед/мл крови).

Исследования проводили в Лаборатории иммунорегуляции ИЭГМ УрО РАН (г. Пермь).

Дизайн лабораторного исследования приведен на рисунке 1.



Рис.1. Дизайн лабораторного исследования

2.4.1. Выделение и культивирование клеток периферической крови

Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см³). Из полученной суспензии МПК далее выделяли В-лимфоциты (клетки CD19⁺), CD3⁺T-лимфоциты и, для оценки Т-хелперной дифференцировки, наивные CD4⁺T лимфоциты – путем фракционирования на иммуномагнитных частицах с использованием стандартных систем для выделения (R&D Systems). В-лимфоциты инкубировали с экзогенным антигеном, столбнячным анатоксином (Tetanus toxoid, ТТ, 5 мкг/мл) или с аутоантигеном, ассоциированным с рассеянным склерозом - миелиновым олигодендроцитарным гликопротеином (Myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG, 5 мкг/мл) в течение 12 часов, затем отмывали от несвязанного антигена и культивировали совместно с аутологичными фракционированными CD3⁺T/CD4⁺T-лимфоцитами (для оценки пролиферации и Т-хелперной дифференцировки, соответственно) или с РВМС в соотношении 1:10 в течение 48 часов (для оценки Т-хелперной дифференцировки) или 72 часов (для оценки пролиферации). Инкубацию клеток проводили в полной питательной среде на основе среды RPMI-1640 (Gibco), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 300 мкг/мл L-глутамин (Gibco), 0,01М HEPES (Sigma) и 100 мкг/мл гентамицина (Pharmacia), при 37° и 5% CO₂.

По окончании 48-часового культивирования оценивали содержание в пробе Т-хелперных субпопуляций Th17 и Treg – по экспрессии соответствующих субпопуляционных маркеров ROR γ t и FoxP3, а также уровень ключевых цитокинов, IL-17 и IL-10, в супернатантах клеточных культур. Экспрессию ROR γ t и FoxP3 определяли проточной цитометрией, с использованием соответствующих моноклональных антител: анти-CD4*FITC, анти-ROR γ t*PerCP, анти-FoxP3*PE/PerCP (R&D Systems, Biolegend) и набора фиксирующих/пермеабелизирующих буферов для оценки внутриклеточных молекул (Biolegend). Уровень цитокинов в

супернатантах оценивали иммуноферментным анализом, с помощью стандартных тест-систем.

Кроме того, *ex vivo*, в суспензии мононуклеарных клеток, оценивалось содержание Th17 и Treg – по экспрессии транскрипционных факторов ROR γ t и FoxP3, проточной цитометрией, а также определялась внутриклеточная экспрессия IL-17 В-лимфоцитами – также проточной цитометрией, с использованием моноклональных антител анти-CD4*FITC, анти-CD19*FITC и анти-IL-17*PE (R&D Systems, Biolegend).

2.4.2. Оценка экспрессии лимфоцитами мембранных и внутриклеточных молекул методом проточной цитометрии

Мембранные молекулы, экспрессия которых оценивалась в работе, представляют собой субпопуляционные маркеры Т- и В-лимфоцитов (CD3/CD19), а также основной Т-клеточной субпопуляции – Т-хелперов (CD4). Внутриклеточные молекулы, исследованные в работе, – транскрипционные факторы ROR γ t и FoxP3, служащие маркерами Т-хелперных субпопуляций Th17 и Treg, соответственно. Кроме того, в В-лимфоцитах оценивалась внутриклеточная экспрессия цитокина IL-17.

2.4.2.1. Подготовка проб для проточной цитометрии

РВМС или фракционированные лимфоциты (CD4⁺/CD19⁺-клетки) инкубировали с моноклональными антителами к мембранным маркерам (анти-CD4*FITC, анти-CD19*PE/Cy5) в концентрации, рекомендованной производителем, в течение 20 минут в темноте при комнатной температуре. После этого фиксировали клетки добавлением 1 мл фиксирующего буфера, инкубировали 15 мин. в темноте, отмывали 2 раза в 1 мл буфера Cell Wash (Veston Dickinson) центрифугированием при 1500 оборотов в минуту в течение 10 минут, добавляли в пробирки по 500 мкл пермеабилзирующего буфера, инкубировали 1 час в темноте. После этого клетки окрашивали антителами к транскрипционным факторам или цитокинам (ROR γ t*PerCP, анти-FoxP3*PE/PerCP, анти-IL-17*PE), инкубировали 30 мин. в темноте,

отмывали клетки от антител в 1 мл CellWash и анализировали на проточном цитофлюориметре (проточном цитофлюориметре FACS Calibur ("Becton Dickinson", США).

2.4.2.2. Алгоритм цитометрического исследования

В качестве негативного контроля использовали неокрашенные пробы (то есть пробы, не обработанные моноклональными антителами, мечеными флуорохромом). Кроме того, чтобы учесть возможное неспецифическое связывание, для моноклональных антител, применяли изотипические контроли, то есть моноклональные антитела того же изотипа, что и основные, меченые тем же флуорохромом, но не обладающими специфичностью к исследуемым маркерам.

На первом этапе в соответствии с параметрами переднего (FSC-H) и бокового (SSC-H) светорассеяния выделяли лимфоцитарный гейт – R1 (рис. 2а). На втором этапе в лимфоцитарном гейте на основе экспрессии мембранных маркеров идентифицировали субпопуляции CD4⁺T-лимфоцитов или В-лимфоцитов (CD19⁺-клетки) – гейт R2 (рис. 2б). На третьем этапе в субпопуляциях CD4⁺T-лимфоцитов или В-лимфоцитов (CD19⁺-клетки) определяли экспрессию внутриклеточных молекул – транскрипционных факторов RORγt/FoxP3 или цитокина IL-17 (рис. 2в). Аналогичной была стратегия цитометрического анализа клеток в культуре.

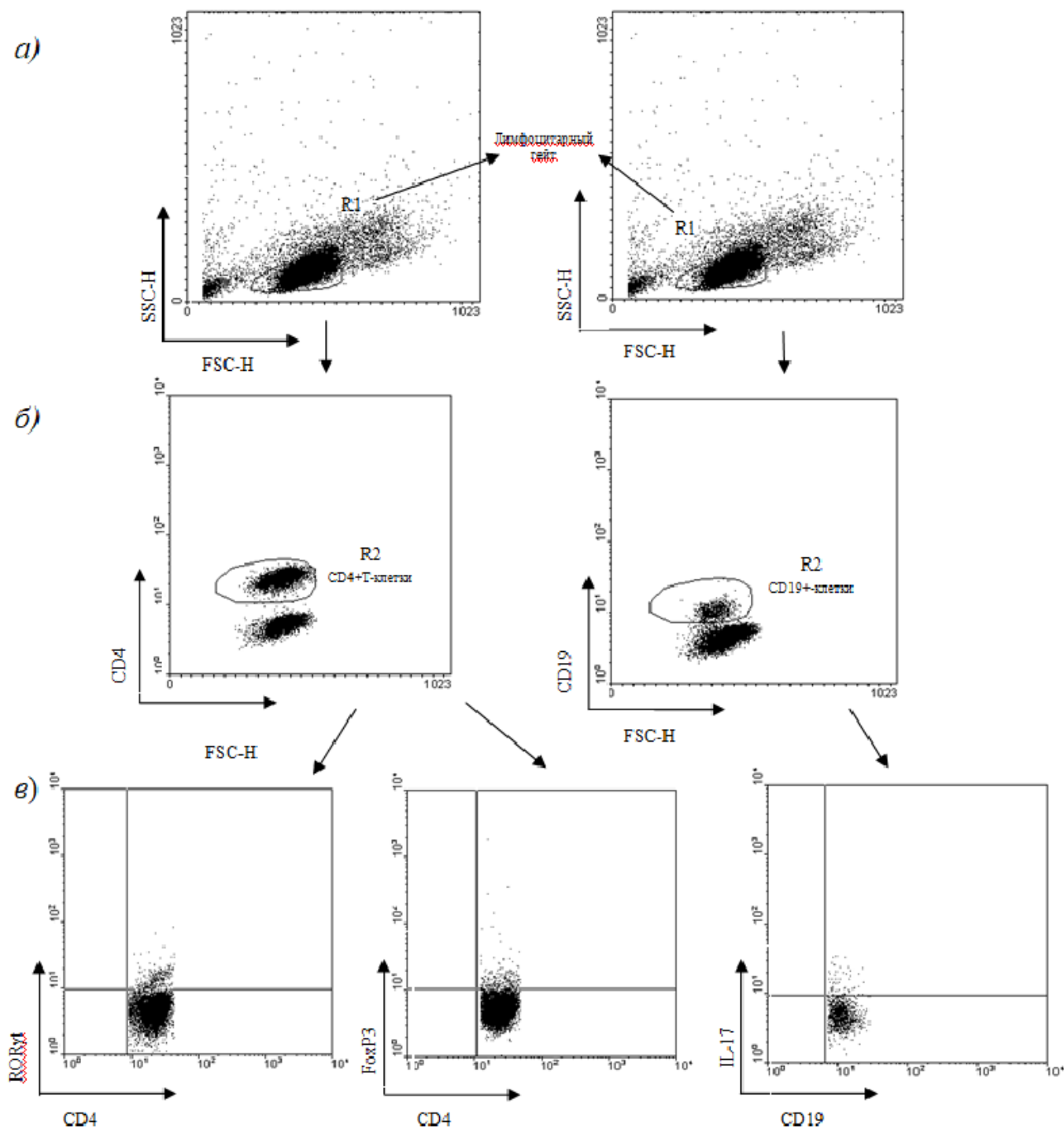


Рис. 2. Стратегия анализа результатов цитометрического исследования.

а – гейтирование общей лимфоцитарной популяции на основе параметров переднего и бокового светорассеяния; б – гейтирование субпопуляций CD4+Т-лимфоцитов и CD19+В-клеток на основе экспрессии мембранных маркеров CD4+/CD19+; в – анализ экспрессии выделенными субпопуляциями внутриклеточных факторов ROR γ t, FoxP3 и IL-17.

2.4.3. Оценка пролиферативного ответа CD4⁺T-лимфоцитов на антигены, представленные В-лимфоцитами

Для определения потенциальной антигенпрезентирующей активности В-лимфоцитов перед оценкой Т-хелперной дифференцировки в той же системе определялся пролиферативный ответ CD3⁺T-лимфоцитов на экзо- и аутоантигены, представленные аутологичными В-лимфоцитами. Для этого фракционированные В-лимфоциты (1×10^5 клеток/мл) культивировали с аутологичными CD3⁺T-лимфоцитами (1×10^6 клеток/мл) или МПК в соотношении 1:10 в полной питательной среде в присутствии антигенов (экзогенного СА (5 мкг/мл) или MOG (10 мкМ)) в течение 72 часов. По окончании культивирования определяли пролиферативный ответ CD3⁺T-лимфоцитов по включению синтетического аналога тимидина, 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU), который выявляли соответствующими моноклональными антителами против BrdU, с помощью набора Biotrack™ cell proliferation ELISA system (Amersham). BrdU вносили в пробу за 18 часов до окончания культивирования. Результаты представляли как показатели оптической плотности для каждой пробы (y.e.) при длине волны 450 нм.

2.4.4. Оценка уровня цитокинов и общего IgG в плазме крови

В сыворотке крови были исследованы концентрации IL-17A, IL -10, CXCL-13, BAFF и общего IgG методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Использовались двухфазные варианты анализов, когда моноклональное антитело к одному из эпитопов было зафиксировано на твердофазном носителе (ячейках планшета), а к другому в реагенте с конъюгатом.

Исследование IL-17A, IL -10 проводилось с помощью наборов «ИФА-IL-17A» и «ИФА -IL -10» производства ООО «Цитокин», Россия . Для определения IL-17A образцы плазмы и калибровочные пробы добавлялись в лунки с иммобилизованными антителами к IL-17A, а затем производилась инкубация в течение 2 часов при 37°C со встряхиванием. Затем происходила

отмывка образцов трехкратно с использованием промывочного буфера. К образцам добавлялись антитела анти- IL-17A-биотин (Антитела), с последующей инкубацией в течение 1 часа при 37°C . Далее проводилась повторная отмывка образцов и добавление анти-IL-17-пероксидаза (Конъюгат Е). Производилась инкубация с встряхиванием в течение 30 мин. при 37°C с последующей отмывкой образцов. Затем добавляется субстратная смесь(субстратный буфер и раствор тетраметилбензидина), производилась инкубация 15 минут в темноте для развития окраски. Ферментную реакцию останавливали стоп-реагентом (10 % кислотой). Определение IL-10 производилось по аналогичному алгоритму, на лунках иммобилизованы моноклональные антитела к IL-10, реагент «Антитела»содержал раствор конъюгата анти-IL-10-биотин, а «Конъюгат Е» - раствор авидин-пероксидазы.

Исследование CXCL-13 с помощью «ELISA Kit for B-Lymphocyte Chemoattractant 1(BCL-1)», Cloud-Clone Corp, USA. Образцы сыворотки вводили в ячейки с адсорбированными антителами к CXCL-13 и выдерживали в течение 1 часа при температуре +37°C. Жидкость из ячеек выливали и без отмывки добавляли антитела анти- CXCL-13-биотин (Реагент А) и вновь инкубировали 1 час при +37°C. После трехкратной отмывки в ячейки добавили авидин-пероксидазу хрена (Реагент В). Инкубировали 30 минут при +37°C и отмывали пятикратно. Затем запускали ферментную реакцию с субстратным буфером, инкубировали 20 минут при +37°C, и останавливали стоп-раствором (серная кислота 10%).

Исследование BAFF проведено с помощью «Human BAFF Instant ELISA» производителя eBioscience, Austria. В ячейки с адсорбированными поликлональными покрывающими антителами к BAFF человека добавлялись образцы сыворотки, затем проводилась инкубация в шейкере при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 3 часов. Ячейки шестикратно промывали , и добавляли окрашивающий субстрат (субстратный буфер и раствор тетраметилбензидина). После инкубации в течение 10 минут при комнатной температуре , добавляли стоп-реагент (10% фосфорная кислота).

Исследование общего IgG проведено с помощью набора «IgG-общий-ИФА-БЕСТ», Вектор-БЕСТ, Россия. Исследуемые образцы вносились в лунки с иммобилизованными антителами к гамма-цепям IgG человека, затем планшет заклеивался пленкой и инкубировался 20 минут при температуре 37°C со встряхиванием. Лунки подвергались пятикратной отмывке. В последствии вводился раствор конъюгата моноклональных антител к лямбда и каппа-цепям иммуноглобулинов человека с пероксидазой хрена, и вновь производилась инкубация в течение 20 минут 37°C в шейкере. После повторной пятикратной промывки вводился раствор тетраметилбензидина, с последующей инкубацией в темноте при комнатной (+18-25°C) температуре. Затем в реакцию останавливали введением стоп-раствора.

После использования стоп-реагентов во всех случаях определялась оптическая плотность раствора в лунках спектрофотометром при длине волны 450 ± 10 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации определяемого показателя. Для пробы рассчитывалась величина $V - V_0$, где V – среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы, V_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 IL-17A, IL-10, CXCL-13 в пг/мл, BAFF в нг/мл и общего IgG в мг/мл. На основании калибровочной кривой рассчитывалась концентрация цитокинов образцах плазмы.

2.5. Статистические методы, применяемые в исследовании

Статистическая обработка данных исследования проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., USA). В виду небольшого объема выборок и неправильного распределения значений были использованы непараметрические статистические методы. Для описания количественных признаков использовался формат с указанием

медианы, первого и третьего квартиля – Me (UQ; LQ). Сравнительный анализ полученных в ходе исследования количественных данных в 2-х независимых группах был выполнен с использованием U критерия Манна-Уитни, в 3-х и более по анализу ANOVA, а в случае сравнения показателей в группе – критерий знаковых рангов Вилкоксона. Корреляционный анализ произведен с использованием рангового коэффициента Спирмена (R). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ. ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ НА ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ В-КЛЕТОК (РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)

3.1 Факторы, ассоциированные с активностью Т-хелперных субпопуляций Th17/Treg и В-лимфоцитов в сыворотке крови пациентов с РС и связь их уровня с клиническим состоянием пациентов

В работе исследовали уровни ключевых цитокинов, продуцируемых субпопуляциями Th17/Treg – IL-17 и IL-10, а также основных факторов, ассоциированных с дифференцировкой (BAFF), миграцией (CXCL-13) и функционированием (IgG) В-лимфоцитов.

3.1.1. Исследование уровня интерлейкина 17 в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров

У пациентов с РС уровень IL-17 в сыворотке крови был 39,75(18,6;70,81) пг/мл, а у здоровых добровольцев - 48.05(39,75; 124,48) пг/мл, разница между ними оказалась статистически не значимой ($p=0,150$).

Содержание IL17 в сыворотке пациентов с разными вариантами терапии, здоровых доноров и значимые различия между ними указаны в таблице 3,1.

Таблица. 3.1

IL-17 в сыворотке крови у пациентов с РС при различных видах ПИТРС и здоровых доноров, Me [LQ;UQ]

№	Подгруппа терапии	Уровень цитокина, пг/мл	p
1	интерфероны β	51.62 (11.63; 70.80)	$p^{1-4}=0,042$
2	глатирамера ацетат	43.37(32.67; 56.39)	$p^{2-3}=0,010$
3	Натализумаб	24.45 (16.28; 37.38)	$p^{2-4}=0,038$
4	Без терапии	78.06 (65.98; 175.40)	$p^{3-4}=0,001$
5	Здоровые	48.05(39.75; 124.48)	$p^{3-5}=0,000$

Содержание IL-17 в сыворотке крови пациентов, принимавших терапию, оказалось ниже, чем у пациентов, не принимавших терапии. Прием терапии первой линии одинаково влиял на продукцию IL-17, приближая его концентрацию в сыворотке крови к значению здоровых доноров. Это, вероятно, связано с тем, что применяемая при РС патогенетическая терапия опосредованно через регуляцию Т-хелперов снижает выработку IL-17. У пациентов, принимавших натализумаб, было отмечено более выраженное снижение IL-17, чем у пациентов, получающих глатирамера ацетат, его значение при лечении натализумабом было даже ниже, чем у здоровых доноров, что отражает эффективность данного препарата в подавлении аутоиммунитета. Эти данные расходятся с результатами исследования Kivisäkk, В. С:etal. (2009), согласно которому количество CD4 + Т-клеток, продуцирующих гамма-интерферон, фактор некроза опухоли и интерлейкин (IL) -17, увеличивалось через 6 месяцев после начала лечения натализумабом и оставалось повышенным на протяжении всего периода наблюдения [97]. Таким образом, вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

В наших исследованиях было проведено исследование связи содержания IL-17 в сыворотке крови с клиническими и функциональными особенностями пациентов с РС (таб 3.2).

Таблица. 3.2

Связь содержания IL-17 в сыворотке крови с клиническими и функциональными особенностями пациентов с РС

Показатели	R	p
IL-17&EDSS	-0,09	0,467
IL-17& Visual FS	0,06	0,617
IL-17& Brainstem FS	0,003	0,980
IL-17& Pyramidal FS	-0,15	0,215
IL-17& Cerebellar FS	0,06	0,648
IL-17& Sensory FS	0,06	0,624

IL-17& Bowel and bladder FS	-0,16	0,189
IL-17& Cerebral FS	0,23	0,061
IL-17& Ambulation	0,11	0,823
IL-17&MSIS -29	0,61	0,914
IL-17&FSS	0,12	0,537
IL-17& Тревога по HADS	0,09	0,448
IL-17& Депрессия по HADS	-0,02	0,882
IL-17&25 TMW	-0,03	0,769
IL-17&9-HPT Dominant hand	0,04	0,721
IL-17&9-HPT Nondominant hand	-0,21	0,088
IL-17&PASAT	-0,13	0,290
IL-17& частота обострений	0,17	0,174
IL-17& длительность заболевания	-0,26	0,035

Примечание: здесь и во всех последующих таблицах статистически значимые корреляции выделены цветом.

При проведении корреляционного анализа (табл.3.2) выявлена отрицательная связь содержания IL-17 с длительностью заболевания ($R=-0,26$, $p=0,035$), что согласуется с рядом исследований, показывающих снижение роли воспалительных механизмов поражения ЦНС на поздних этапах заболевания [69]. Корреляционных связей уровня IL-17 с клиническим состоянием пациентов не было выявлено. Была установлена тенденция к связи уровня IL-17 и состояния церебральной функциональной системы ($p=0,061$). Корреляционный анализ не выявил значимых связей между функциональным состоянием и IL-17 в крови пациентов с РС, но обнаружил тенденцию к связи скорости выполнения девяти-луночного теста с уровнем IL-17 ($p=0,088$). С частотой обострений, уровнем депрессии и тревоги корреляций и тенденций к ним выявлено не было.

Для проведения сравнительного анализа клинических параметров пациенты были разделены по содержанию IL-17 на две группы относительно значения медианы здоровых доноров. В первой группе значение IL-17 было ниже медианы (от 0 до 48.05 пг/мл), в нее вошли 41 человек, во вторую группу вошли 27 пациентов с $IL-17 \geq 48.05$ пг/мл. Результаты анализа представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3

Клинические и функциональные особенности пациентов с РС с разным уровнем IL-17 в сыворотке крови, Me [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=41)	2 группа (n=27)	p
IL-17, пг/мл	23,29(11,64; 37,39)	73,22(56,40;185,73)	0,000
EDSS, баллы	3,50(2,50;4,00)	2,50(2,00;4,00)	0,428
Visual FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,788
Brainstem FS баллы	1,0(1,0;2,0)	1,0(1,0;2,0)	0,994
Pyramidal FS, баллы	2,0(1,0;3,0)	2,0(1,0;3,0)	0,292
Cerebellar FS, баллы	2,0(1,0;2,0)	2,0(1,0;2,0)	0,303
Sensory FS, баллы	1,0(1,0;2,0)	2,0(0,0;2,0)	0,793
Bowel and bladder FS,баллы	1,0 (0,0;2,0)	0,0(0,0;2,0)	0,354
Cerebral FS, баллы	0,0 (0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,303
Ambulation, баллы	0,0 (0,0;1,0)	0,0(0,0;0,0)	0,418
MSIS -29, баллы	48,0 (36,0;73,0)	53,0 (38,0;72,0)	0,602

FSS, баллы	30,0 (14,0;43,0)	36,0 (14,0;49,0)	0,455
Тревога по HADS, баллы	6,0 (4,0;9,0)	6,0(5,0;8,0)	0,919
Депрессия по HADS, баллы	4,0 (2,0;7,0)	4,0(1,0;8,0)	0,724
25 TMW, секунды	4,80(4,20;5,75)	4,55(4,20;6,10)	0,547
9-НРТ Dominant hand, секунды	19,90(18,60;23,85)	21,00(18,55;24,05)	0,647
9-НРТ Nondominant hand, секунды	22,80(19,95;26,73)	21,15(19,45;24,55)	0,294
PASAT, ответы	45,0(38,0;50,0)	41,5(37,0;47,0)	0,193
частота обострений в год, раз	0,50(0,20;1,00)	1,00(0,50;1,50)	0,053
длительность заболевания, годы	7,0(5,0;11,0)	4,0(2,0;7,0)	0,010

У пациентов с разным уровнем ИЛ-17 в крови не было достоверной разницы в клиническом и функциональном состоянии, а так же в состоянии эмоциональной сферы.

При этом у пациентов с уровнем ИЛ-17 ниже, чем у здоровых доноров, длительность заболевания была достоверно выше, чем у пациентов с более высоким уровнем ИЛ-17 ($p=0,010$) (что совпадает с данными корреляционного анализа), а частота обострений имела тенденцию к снижению ($p=0,053$).

3.1.2. Исследование уровня интерлейкина 10 в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров

У пациентов с РС концентрация ИЛ-10 составила 22,68(11,24;48,52) пг/мл, у здоровых доноров - 43,60(34,16;47,99). Таким образом, уровень ИЛ-10 в сыворотке у пациентов с РС был пониженным в сравнении с содержанием этого интерлейкина у здоровых доноров ($U=266$, $p=0,009$). Полученные данные согласуются с концепцией недостаточности лимфоцитов субпопуляции Treg и, соответственно, их продуктов у пациентов с РС [82].

Содержание ИЛ10 в сыворотке крови пациентов с РС при различных видах иммуномодулирующей терапии и значимые различия указаны в таблице 3.4.

Таблица. 3.4

Уровень ИЛ-10 в сыворотке крови у пациентов с РС с различными видами ПИТРС и здоровых доноров

№	Группа	Уровень цитокина, пг/мл	р.
1	интерфероны β	32,64 (9.07; 47.99)	$p^{2-5}=0,038$
2	глатирамера ацетат	26,89 (21.20; 47.73)	$p^{3-5}=0,002$
3	натализумаб	17,77 (13.88; 35.68)	$p^{4-1}=0,003$
4	без терапии	6.69 (2.90; 72.44)	$p^{4-2}=0,005$
5	Здоровые	43,60 (35.93; 51.39)	$p^{4-3}=0,003$ $p^{4-5}=0,001$

Уровень ИЛ-10 был особенно низким у тех пациентов с РС, которые не получали терапию. Таким образом, ПИТРС повышали содержание этого противовоспалительного цитокина в сыворотке крови. Особенно выраженным этот эффект был у интерферонов- β . При лечении этими препаратами уровень ИЛ-10 практически нормализовался. У пациентов, принимавших глатирамера ацетат и натализумаб, концентрация этого цитокина повышалась, но не нормализовалась (табл.3.4). В исследованиях описывается положительное действие глатирамера ацетата на продукцию ИЛ-

10 клетками Treg [166], и, наоборот, небольшое снижение продукции IL-10 при приеме натализумаба [94]. Пациенты, принимавшие интерферон β , имели высокий уровень IL-10 в сыворотке крови, существенно превышающий таковой у пациентов без терапии и практически не отличающийся от уровня здоровых добровольцев. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об увеличении синтеза IL-10 под действием интерферона β , что соответствует данным ряда исследований [173].

Было проведено исследование связи содержания IL-10 в сыворотке крови с клиническими и функциональными особенностями пациентов с РС (таб 3.5).

Таблица. 3.5

Связь содержания IL-10 в сыворотке крови и клинических и функциональных особенностей у пациентов с РС

Показатели	R	p
IL-10&EDSS	0,06	0,648
IL-10& Visual FS	0,03	0,836
IL-10& Brainstem FS	0,02	0,877
IL-10& Pyramidal FS	-0,03	0,836
IL-10& Cerebellar FS	0,17	0,163
IL-10& Sensory FS	0,04	0,744
IL-10& Bowel and bladder FS	0,05	0,680
IL-10& Cerebral FS	0,42	0,000
IL-10& Ambulation	0,022	0,857
IL-10&MSIS -29	0,13	0,288
IL-10&FSS	0,17	0,155
IL-10& Тревога (HADS)	0,16	0,191
IL-10& Депрессия (HADS)	0,08	0,428
IL-10&25 TWM	-0,08	0,599
IL-10&9-HPT Dominant hand	0,01	0,964
IL-10&9-HPT Nondominant hand	-0,21	0,085

IL-10&PASAT	0,05	0,361
IL-10& частота обострений	0,09	0,474
IL-10& длительность заболевания	-0,00	0,969

Содержание IL-10 было связано (таб. 3.5) с показателем корковой функциональной системы, причем связь имела положительный характер ($R=0,42$, $p=0,000$). Учитывая, что IL-10 является противовоспалительным цитокином, его связь с выраженностью заболевания, имеющего в основе нейровоспаление, выглядит не вполне закономерной, логичнее было бы ожидать обратную корреляцию IL-10 с выраженностью симптомов РС – такая связь действительно показана в целом ряде исследований [88].

Тем не менее, важно учитывать, что IL-10 продуцируется не только противовоспалительной Т-хелперной субпопуляцией Th2, но и является ключевым цитокином для Treg, а Treg активируются не только в ответ на определенные стимулы, они активируются на заключительном этапе любого иммунного ответа и подавляют этот ответ, предупреждая избыточную активацию иммунной системы, потенциально опасную для окружающих тканей. И чем интенсивнее иммунная реакция организма на антиген, тем интенсивнее противодействие, то есть формирование и функционирование Treg. Поэтому IL-10 часто рассматривается как негативный прогностический маркер при различных воспалительных заболеваниях. Возможно, аналогичный механизм имеет место и в нашем случае.

С другими клиническими особенностями заболевания связи выявлено не было. При определении связи между функциональными особенностями заболевания и концентрацией IL-10 была выявлена тенденция к обратной связи с временем выполнения девяти-луночного теста для недоминантной руки ($p=0,085$). С уровнем депрессии, тревоги, длительностью, частотой обострений связи не обнаружено.

Для сравнительного анализа были выделены 2 группы пациентов с РС. В первой группе значение IL-10 было ниже 43,60 пг/мл (медиана здоровых

доноров), в нее вошли 28 человек, во вторую группу вошли 19 пациентов с IL-10 $\geq 43,60$ пг/мл . Выявленные различия описаны в таблице 3.6.

Таблица. 3.6

Значение клинических и функциональных показателей у пациентов с РС с нормальным и высоким уровнем IL-10 в сыворотке крови, Me [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=49)	2 группа (n=19)	p
IL-10, пг/мл	15,83(7,64;25,64)	53,22(49,55;72,44)	0,000
EDSS, баллы	3,005(2,00;4,00)	3,00(2,00;4,00)	0,772
Visual FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,920
Brainstem FS баллы	1,0(1,0;2,0)	1,0(1,0;2,0)	0,696
Pyramidal FS, баллы	2,0(1,0;3,0)	2,0(1,0;3,0)	0,351
Cerebellar FS, баллы	2,0(1,0;2,0)	2,0(1,0;2,0)	0,845
Sensory FS, баллы	2,0(1,0;2,0)	2,0(0,0;2,0)	0,774
Bowel and bladder FS, баллы	1,0(0,0;2,0)	0,0(0,0;2,0)	0,842
Cerebral FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	1,0(0,0;1,0)	0,005
Ambulation, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;0,0)	0,288
MSIS -29, баллы	49,0(36,0;70,0)	23,0(39,0;80,0)	0,428
FSS, баллы	29,0(14,0;43,0)	39,0(15,0;49,0)	0,223
Тревога (HADS), баллы	6,0(4,0;8,0)	6,0(4,0;10,0)	0,928
Депрессия (HADS), баллы	4,0(2,0;8,0)	4,0(1,0;8,0)	0,685
25 TMW, секунды	4,90(4,20;5,90)	4,40(4,15;5,65)	0,173
9-HPT Dominant hand, секунды	20,20(18,25;23,85)	21,00(18,90;24,05)	0,477
9-HPT Nondominant hand, секунды	22,43(19,95;26,73)	21,10(19,45;23,05)	0,231
PASAT, ответы	44,5(38,0;50,0)	40,0(37,0;47,0)	0,530

Частота обострений в год	0,50(0,20;1,00)	1,00(0,40;1,50)	0,232
Длительность заболевания, годы	6,0(4,0;10,0)	5,0(3,0;8,0)	0,209

Данные сравнительного анализа соответствовали результатам корреляционного анализа. Как и в случае с IL-17, у пациентов с нормальными значениями IL-10 состояние по Cerebral FS было значимо лучше, чем у пациентов с IL-10, превышающим нормальное значение ($p=0,005$). То есть когнитивные расстройства, астения, эмоциональные нарушения, оцениваемые в подшкале EDSS как «церебральные функции», маркируются высокой концентрацией IL-10, отражающей активный противовоспалительный ответ, сопровождающий воспаление.

При исследовании цитокинового профиля у пациентов с IL-10 ниже, чем у здоровых доноров, было достоверно ниже содержание IL-17 в сыворотке 30,32(13,96;49,24) пг/мл, чем у пациентов с высокой концентрацией IL-10 (70,81(49,24;283,84) пг/мл, $p=0,000$). Это подтверждает, что основным источником IL-10 у пациентов с РС является не классическая противовоспалительная Т-хелперная субпопуляция Th2, а упомянутые выше регуляторные Т-лимфоциты, поскольку субпопуляции Th17 и индуцибельных Treg дифференцируются из общего Т-клеточного предшественника.

3.1.3. Исследование В-клеточного активирующего фактора (BAFF) в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров

Содержание BAFF в крови пациентов с РС было 0,35 (0,19;1,48) нг/мл, а у здоровых доноров - 0,30 (0,23;0,58) нг/мл, то есть практически не различалось ($p=0,910$).

Содержание BAFF в сыворотке групп пациентов с различной терапией указано в таблице 3.7

Таблица.3.7

BAFF в сыворотке крови у пациентов с РС и здоровых доноров

№	Группа	Уровень цитокина, нг/мл	p
1	интерфероны β	0.40 (0.21; 0.83)	>0,050
2	глатирамера ацетат	0.22 (0.16; 5.46)	
3	Натализумаб	0.26 (0.17; 2.41)	
4	без терапии	0.56 (0.40; 1.26)	
5	Здоровые	0.30 (0.25; 0.80)	

Пациенты, получавшие различные ПИТРС, не отличались по содержанию в крови BAFF от не лечившихся и между собой.

Было проведено исследование связи содержания BAFF в сыворотке крови с клиническими и функциональными особенностями пациентов с РС. (таб 3.8).

Таблица 3.8

Связь содержания BAFF в сыворотке крови и клинических и функциональных особенностей у пациентов с РС

Показатели	R	p
BAFF & EDSS	-0,07	0,561
BAFF & Visual FS	-0,10	0,394
BAFF & Brainstem FS	0,01	0,952
BAFF & Pyramidal FS	-0,13	0,275
BAFF & Cerebellar FS	-0,12	0,339
BAFF & Sensory FS	0,21	0,075
BAFF & Bowel and bladder FS	-0,05	0,675
BAFF & Cerebral FS	0,02	0,868
BAFF & Ambulation	-0,15	0,198
BAFF & MSIS -29	0,12	0,379
BAFF & FSS	0,14	0,248
BAFF & Тревога по HADS	0,19	0,117
BAFF & Депрессия по HADS	0,02	0,895

BAFF &25 TWM	-0,05	0,708
BAFF &9-HPT Dominant hand	-0,04	0,731
BAFF &9-HPT Nondominant hand	-0,18	0,141
BAFF &PASAT	0,11	0,378
BAFF & частота обострений	0,13	0,274
BAFF & длительность заболевания	-0,13	0,259

Корреляционный анализ не выявил статистически значимой связи содержания BAFF в сыворотке крови с клиническими и функциональными особенностями пациентов (таб 3.8) и с особенностями заболевания. Отмечена лишь тенденция к связи между чувствительной функциональной системой и уровнем BAFF в крови ($p=0,075$), не достигшая статистической значимости.

Сравнительный анализ не выявил значимых различий между пациентами со значением ниже (от 0 до 0,30 нг/мл) и выше ($\geq 0,30$ нг/мл) медианы содержания BAFF в сыворотке крови здоровых добровольцев. Результаты сравнения групп описаны в таблице 3.9.

Таблица. 3.9

Различие клинических и функциональных особенностей у пациентов с РС, имеющих разный уровень BAFF в сыворотке крови, Me [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=31)	2 группа(n=37)	p
BAFF нг/мл	0,19(0,14;0,23)	0,93(0,49;26,92)	0,000
EDSS, баллы	3,00(2,50;4,00)	3,00(2,00;4,00)	0,375
Visual FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,463
Brainstem FS баллы	1,0(1,0;2,0)	1,0(1,0;2,0)	0,819
Pyramidal FS, баллы	2,0(1,0;3,0)	2,0(1,0;3,0)	0,091
Cerebellar FS, баллы	2,0(2,0;2,0)	2,0(1,0;2,0)	0,196

Sensory FS, баллы	1,0(0,0;2,0)	2,0(1,0;2,0)	0,094
Bowel and bladder FS,баллы	1,0(0,0;2,0)	0,0(0,0;2,0)	0,777
Cerebral FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,193
Ambulation, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;0,0)	0,336
MSIS -29, баллы	53,0(34,0;66,0)	48,0(38,0;78,0)	0,530
FSS, баллы	30,0(12,0;46,0)	32,0(15,0;46,0)	0,441
Тревога по HADS, баллы	6,0(3,0;8,0)	6,0(5,0;9,0)	0,133
Депрессия по HADS, баллы	4,0(3,0;7,0)	4,0(2,0;8,0)	0,777
25 TMW, секунды	4,65(4,20;5,90)	4,55(4,20;5,70)	0,767
9-НРТ Dominant hand, секунды	22,65(18,25;23,85)	19,90(18,60;24,05)	0,605
9-НРТ Nondominant hand, секунды	23,10(20,40;26,55)	21,10(19,05;23,55)	0,120
PASAT, ответы	40,5(37,0;50,0)	44,5(38,5;50,5)	0,290
Частота обострений в год	0,50(0,20;1,00)	1,00(0,40;1,00)	0,278
Длительность заболевания, годы	7,0(5,0;11,0)	4,0(3,0;9,0)	0,052

При сравнении клинических особенностей и концентрации цитокинов между группами не было выявлено достоверных различий, но была выявлена тенденции к ухудшению чувствительных ($p=0,091$) и двигательных функций ($p=0,095$), а также к меньшей длительности заболевания ($0,052$) у пациентов с высоким уровнем ВАФФ в сыворотке крови (табл.3.9). Последняя тенденция была практически закономерностью, и может свидетельствовать о большей активации дифференцировки В-лимфоцитов на ранних этапах заболевания.

3.1.4 Исследование хемокина CXCL-13 в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров

Определен уровень CXCL-13 у пациентов с РС. Его концентрация в сыворотке крови ($39,96(24,48;54,32)$ пг/мл) была достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев ($61,75(49,52;138,13)$ пг/мл, $p=0,000$). Сравнение концентрации CXCL-13 в сыворотке у пациентов с разными вариантами терапии показало, что самой низкой она была у пациентов, не получавших ПИТРС, самой высокой – у пациентов, получавших натализумаб. В этой группе концентрация CXCL-13 не отличалась достоверно от такового у здоровых доноров. Достоверно выше, чем у пациентов без терапии, была концентрация CXCL-13 в сыворотке крови у пациентов, лечившихся интерферонами-бета (табл. 3.10).

Таблица 3.10

СХСL-13 в сыворотке крови у пациентов с РС и здоровых доноров

№	Группа	Уровень цитокина, пг/мл	p
1	интерфероны β	34.25 (19.77; 42.82)	$p^{1-3}=0,001$
2	глатирамера ацетат	40.12 (32.67;52.72)	$p^{1-5}=0,000$
3	Натализумаб	54.32 (43.77; 71.43)	$p^{2-3}=0,010$
4	без терапии	18.5 (11.04; 19.77)	$p^{2-4}=0,004$
5	Здоровые	61.75 (49.84; 184.13)	$p^{2-5}=0,001$
			$p^{3-4}=0,003$
			$p^{4-5}=0,000$

Есть данные о том, что данный хемокин повышается при активности РС [62], а во время ремиссии, напротив, остается пониженным. Данные корреляционного анализа связи CXCL-13 с клиническими особенностями РС приведены в таб.3.11.

Таблица. 3.11

Связь содержания CXCL-13 в сыворотке крови и клинических и функциональных особенностей у пациентов с РС

Показатели	R	p
CXCL-13 & EDSS	0,38	0,001
CXCL-13 & Visual FS	0,11	0,386
CXCL-13 & Brainstem FS	0,08	0,526
CXCL-13 & Pyramidal FS	0,20	0,088
CXCL-13 & Cerebellar FS	0,30	0,014
CXCL-13 & Sensory FS	0,21	0,081
CXCL-13 & Bowel and bladder FS	0,37	0,002
CXCL-13 & Cerebral FS	0,32	0,009
CXCL-13 & Ambulation	0,21	0,080
CXCL-13 & MSIS -29	0,29	0,015
CXCL-13 & FSS	0,27	0,022
CXCL-13 & Тревога по HADS	0,08	0,442
CXCL-13 & Депрессия по HADS	0,10	0,375
CXCL-13 & 25 TWM	0,26	0,030
CXCL-13 & 9-HPT Dominant hand	0,05	0,735
CXCL-13 & 9-HPT Nondominant hand	0,06	0,643
CXCL-13 & PASAT	-0,11	0,373
CXCL-13 & частота обострений	-0,12	0,322
CXCL-13 & длительность заболевания	0,29	0,018

Из таблицы видно, что существует достоверная связь уровня CXCL-13 с показателем инвалидизации по EDSS ($R=0,38$, $p=0,001$), а так же с нарушениями в функциональных системах: мозжечковой ($R=0,29$, $p=0,014$), тазовых органов ($R=0,37$, $p=0,002$) и корковой ($R=0,31$, $p=0,009$).

Концентрация CXCL-13 в сыворотке крови была связана с длительностью заболевания ($R=0,28$, $p=0,018$).

Обращает на себя внимание положительная связь CXCL-13 между качеством жизни по MSIS-29 ($R=0,29$, $p=0,015$) и утомляемостью по FSS ($R=0,27$, $p=0,022$).

Обнаружена связь CXCL-13 с функциональными возможностями ног по тесту на ходьбы 25 футов ($R=0,26$, $p=0,030$) (таб. 3.11).

CXCL-13 рассматривается как биомаркер активности болезни при РС и других демиелинизирующих заболеваниях [21]. Однако в основном проводятся исследования содержания данного хемокина в ЦСЖ, а не в плазме крови. Одни исследования показывают, что уровни CXCL-13 в сыворотке крови и ЦСЖ имеют прямую связь с клиническими показателями [207], другие исследования указывают на отсутствие достоверной корреляции между этими показателями [165]. Наше исследование показывает, что содержание CXCL-13 в сыворотке коррелирует со многими характеристиками заболевания.

Для проведения сравнительного анализа были выделены 2 группы пациентов с РС. В первой группе значение CXCL-13 было 61.75 пг/мл - ниже медианы здоровых доноров, в нее вошли 54 человек, во вторую группу вошли 14 пациентов с $CXCL-13 \geq 61.75$ пг/мл. Выявленные различия описаны в таблице 3.12.

Таблица. 3.12

Значение клинических и функциональных показателей у пациентов с РС с нормальным и высоким уровнем CXCL-13 в сыворотке крови, Ме [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=54)	2 группа (n=14)	p
CXCL-13, пг/мл	34,88(19,78;45,05)	75,98(68,84;90,71)	0,000
EDSS, баллы	3,00(2,00;4,00)	4,00(3,50;4,50)	0,031
Visual FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,924
Brainstem FS баллы	1,0(1,0;2,0)	1,0(1,0;2,0)	0,850
Pyramidal FS, баллы	2,0(1,0;3,0)	2,0(1,0;3,0)	0,685
Cerebellar FS, баллы	2,0(1,0;2,0)	2,0(2,0;2,0)	0,210
Sensory FS, баллы	1,0(0,0;2,0)	2,0(1,0;3,0)	0,051
Bowel and bladder FS, баллы	0,0(0,0;2,0)	3,0(2,0;3,0)	0,007
Cerebral FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,5(0,0;2,0)	0,182
Ambulation, баллы	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;2,0)	0,211
MSIS -29, баллы	46,0(36,0;67,0)	69,0(41,0;82,0)	0,069
FSS, баллы	25,0(13,0;44,0)	42,0(34,0;49,0)	0,021
Тревога по HADS, баллы	6,0(4,0;9,0)	6,0(5,0;9,0)	0,725
Депрессия по HADS, баллы	4,0(2,0;7,0)	4,5(1,0;8,0)	0,737
25 TMW, секунды	4,55(4,20;5,70)	5,25(4,25;6,35)	0,242
9-НРТ Dominant hand, секунды	20,38(18,55;23,50)	21,92(19,05;26,05)	0,963
9-НРТ Nondominant hand,	21,45(19,45;24,80)	24,20(21,10;26,95)	0,190

секунды			
PASAT, ответы	44,0(37,5;49,5)	44,5(38,0;52,0)	0,706
Частота обострений в год	0,85(0,40;1,00)	0,5(0,20;1,00)	0,144
Длительность заболевания, годы	6,0(3,0;10,0)	6,5(5,0;11,0)	0,326

Пациенты из первой группы имели достоверно более низкие показатели EDSS ($p=0,31$), нарушений тазовых функций ($p=0,007$), а так же утомляемости по FSS ($p=0,021$). Кроме того были выявлены тенденции к ухудшению чувствительной функциональной системы ($p=0,051$) и качества жизни по MSIS-29 ($p=0,069$) во второй группе.

3.1.5 Исследование общего иммуноглобулина класса G в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров

Концентрация IgG в сыворотке крови пациентов с РС и здоровых доноров достоверно не отличались (у пациентов с РС - 87,80(81,48;103,33) мг/мл, у здоровых добровольцев - 85,32(81,83;94,45) мг/мл, $p=0,426$).

Значения концентрации IgG в сыворотке у пациентов с разными вариантами терапии представлены в табл. 3.13.

Таблица. 3.13

Концентрация IgG в сыворотке крови у пациентов с РС и здоровых доноров

№	Группа	Уровень общего IgG, мг/мл	p
1	интерфероны β	93.22 (78.99; 104.86)	$p^{2-3}=0,045$
2	глатирамера ацетат	93.99 (85.08; 106.97)	
3	натализумаб	83.70 (75.67; 92.24)	
4	без терапии	87.80 (86.18; 91.7)	
5	Здоровые	85.31(81.90; 94.68)	

Изучение общего IgG не выявило разницы между содержанием его в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров, хотя есть исследования, описывающие повышение этого показателя при РС [6]. Различия по исследуемому показателю найдены только между группами, получавшими натализумаб и глатирамера ацетат. В первой группе концентрация IgG в сыворотке была ниже, чем во второй. Вероятно, это связано с тем, что Натализумаб мешает циркуляции В-клеток, что может привести к нарушению дифференцировки в плазматические клетки и, как следствие, нарушению синтеза иммуноглобулина [180]. Между тем, связи между IgG и клиническими, функциональными особенностями пациентов не выявлено (табл. 3.14).

Таблица 3.14

Связь содержания IgG в сыворотке крови и клинических и функциональных особенностей пациентов с РС

Показатели	R	p
IgG & EDSS	0,12	0,339
IgG & Visual FS	0,11	0,367
IgG & Brainstem FS	-0,08	0,520
IgG & Pyramidal FS	0,13	0,284
IgG & Cerebellar FS	0,12	0,337
IgG & Sensory FS	0,08	0,525
IgG & Bowel and bladder FS	0,15	0,218
IgG & Cerebral FS	0,14	0,253
IgG & Ambulation	0,08	0,531
IgG & MSIS -29	-0,03	0,664
IgG & FSS	0,01	0,944
IgG & Тревога по HADS	-0,04	0,722
IgG & Депрессия по HADS	0,03	0,836
IgG & 25 TWM	0,12	0,348

IgG&9-HPT Dominant hand	0,03	0,821
IgG&9-HPT Nondominant hand	0,09	0,475
IgG&PASAT	0,08	0,511
IgG& частота обострений	0,02	0,873
IgG& длительность заболевания	0,10	0,414

Для проведения сравнительного анализа были выделены 2 группы пациентов с РС. В первой группе значение IgG было меньше 85,32 мг/мл (медиана IgG здоровых доноров), в нее вошли 22 человека, во вторую группу - 46 пациентов с высоким значением показателя ($IgG \geq 85,32$ мг/мл). Выявленные различия представлены в табл. 3.15.

Таблица 3.15

Значение клинических и функциональных показателей у пациентов с РС при нормальном и высоком уровне IgG в сыворотке крови, Me [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=22)	2 группа(n=46)	p
IgG, мг/мл	78,02(73,06;82,98)	96,07(87,80;106,97)	0,000
EDSS, баллы	3,00(2,50;4,00)	3,00(2,00;4,00)	0,801
Visual FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,335
Brainstem FS баллы	1,0(1,0;2,0)	1,0(1,0;2,0)	0,745
Pyramidal FS, баллы	2,0(1,0;3,0)	2,0(1,0;3,0)	0,757
Cerebellar FS, баллы	2,0(2,0;2,0)	2,0(1,0;2,0)	0,931
Sensory FS, баллы	1,5(0,0;2,0)	2,0(1,0;2,0)	0,842
Bowel and bladder FS, баллы	0,0(0,0;2,0)	1,0(0,0;2,0)	0,676

Cerebral FS, баллы	0,0(0,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	0,291
Ambulation, баллы	0,0(0,0;0,0)	0,0(0,0;1,0)	0,802
MSIS -29, баллы	54,5(42,0;72,0)	47,0(36,0;72,0)	0,390
FSS, баллы	29,0(15,0;46,0)	31,0(13,0;44,0)	0,926
Тревога по HADS, баллы	6,5(4,0;9,0)	6,0(4,0;8,0)	0,673
Депрессия по HADS, баллы	4,5(3,0;8,0)	4,0(2,0;7,0)	0,410
25 TMW, секунды	4,53(4,15;5,70)	4,67(4,20;6,15)	0,693
9-НРТ Dominant hand, секунды	20,10(17,80;24,20)	20,90(18,65;26,85)	0,689
9-НРТ Nondominant hand, секунды	20,85(18,95;25,10)	22,45(20,15;25,95)	0,276
PASAT, ответы	41,0(38,0;48,0)	44,0(38,0;50,0)	0,684
частота обострений в год	0,50(0,20;1,00)	0,85(0,40;1,00)	0,195
длительность заболевания, годы	6,0(4,0;11,0)	6,0(3,0;9,0)	0,585

Из таблицы следует, что сравнительный анализ также, как и корреляционный, не выявил связи IgG с клиническим и функциональным особенностями пациентов.

3.3.6. Взаимосвязь концентрации IL-17, IL-10, BAFF, CXCL-13 и общего IgG у больных РС

Таблица 3.16

Корреляционная связь содержания цитокинов и общего IgG в сыворотке крови у пациентов с РС

Показатели	R	p
IL-17&IL-10	0,44	0,000
IL-17&BAFF	0,20	0,098
IL-17& CXCL-13	0,07	0,591
IL-17&IgG	0,14	0,277
IL-10& BAFF	0,07	0,570
IL-10& CXCL-13	0,25	0,045
IL-10& IgG	0,05	0,674
BAFF& CXCL-13	-0,13	0,306
BAFF& IgG	0,22	0,066
CXCL-13& IgG	-0,04	0,718

Концентрации IL-10 и IL17 в сыворотке крови пациентов с РС прямо коррелировали ($R=0,42$, $p=0,000$). Как уже говорилось выше, IL-10 является ключевым цитокином не только для Th2, но и для Treg, а Treg и Th17 дифференцируются в ответ на антигенную активацию из общего предшественника, что и объясняет, по-видимому, высокий уровень корреляции между концентрациями данных цитокинов. Кроме того, уровень IL-10 статистически значимо коррелировал с концентрацией CXCL13 в сыворотке крови пациентов с РС ($R=0,24$, $p=0,045$) (таб. 3.16).

Было проведено сравнение уровня цитокинов и общего IgG при разном содержании IL-17, IL-10, BAFF, CXCL-13 и общего IgG в крови пациентов с РС. Полученные данные отражены в таблицах для каждого фактора : IL-17 (таб. 3.17), IL-10 (таб. 3.18), BAFF (таб. 3.19), CXCL-13 (таб. 3.20), общего IgG (таб. 3.21).

Таблица 3.17

Значение изучаемых цитокинов и общего IgG пациентов с РС с разным уровнем IL-17 в сыворотке крови, Ме [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=41)	2 группа(n=27)	p
IL-17, пг/мл	23,29(11,64;37,39)	73,22(56,40;185,73)	0,000
IL-10, пг/мл	17,28(9,08;27,64)	48,00(18,26;68,12)	0,002
BAFF, нг/мл	0,24(0,16;0,93)	0,51(0,25;1,69)	0,063
CXCL-13, пг/мл	39,33(23,54;54,01)	42,82(25,42;54,64)	0,885
IgG, мг/мл	86,63(79,98;102,93)	92,31(86,19;105,83)	0,132

Проведена оценка содержания в сыворотке противовоспалительного цитокина IL-10 при разных уровнях IL-17: у пациентов при высоком уровне IL-17 было достоверно выше (48,00(18,26;68,12) пг/мл) содержание IL-10 в сыворотке крови, чем при низком (17,28(9,08;27,64) пг/мл, p=0,002).

Важно также отметить, что высокий уровень IL-17 в сыворотке пациентов с РС был ассоциирован с повышенной (вдвое) концентрацией В-клеточного активатора BAFF по сравнению с таковой у пациентов с низким уровнем IL-17 (табл.3.17). Это видимо, связано с тем, что В-клетки участвуют в выработке IL-17

Таблица. 3.18

Значение изучаемых цитокинов у пациентов с РС с нормальным и высоким уровнем IL-10 в сыворотке крови, Ме [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=49)	2 группа(n=19)	p
IL-10, пг/мл	15,83(7,64;25,64)	53,22(49,55;72,44)	0,000
IL-17, пг/мл	30,32(13,96;49,24)	70,81(49,24;283,84)	0,000
BAFF, нг/мл	0,29(0,19;1,27)	0,41(0,25;1,69)	0,283
CXCL-13, пг/мл	39,64(22,60;54,65)	42,82(29,52;53,36)	0,556
IgG, мг/мл	87,21(79,98;103,73)	92,77(86,04;100,38)	0,469

При исследовании цитокинового профиля у пациентов с IL-10 ниже, чем у здоровых доноров, было достоверно ниже содержание IL-17 в сыворотке 30,32(13,96;49,24) пг/мл), чем у пациентов с высокой концентрацией IL-10 (70,81(49,24;283,84) пг/мл, $p=0,000$). Это подтверждает, что основным источником IL-10 у пациентов с РС является не классическая противовоспалительная Т-хелперная субпопуляция Th2, а упомянутые выше регуляторные Т-лимфоциты, поскольку субпопуляции Th17 и индуцибельных Treg дифференцируются из общего Т-клеточного предшественника.

Таблица. 3.19

Различие изучаемых цитокинов у пациентов с РС, имеющих разный уровень BAFF в сыворотке крови, Ме [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=31)	2 группа(n=37)	p
BAFF нг/мл	0,19(0,14;0,23)	0,93(0,49;26,92)	0,000
IL-17, пг/мл	35,03(16,29;54,01)	49,24(25,63;78,06)	0,062
IL-10, пг/мл	22,19(14,37;41,80)	25,65(9,08;50,60)	0,542
CXCL-13, пг/мл	41,54(32,67;99,59)	38,06(19,15;56,90)	0,333
IgG, мг/мл	87,07(79,00;99,59)	92,16(85,01;104,70)	0,237

Важно отметить, что высокий уровень BAFF в сыворотке пациентов с РС был ассоциирован с повышенной концентрацией IL-17 (49,24(25,63;78,06) пг/мл) по сравнению с таковой у пациентов с низким уровнем BAFF (35,03(16,29;54,01) пг/мл, $p=0,062$).

Таблица. 3.20

Концентрация изучаемых цитокинов у пациентов с РС с нормальным и высоким уровнем CXCL-13 в сыворотке крови, Ме [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=54)	2 группа (n=14)	p
CXCL-13, пг/мл	34,88(19,78;45,05)	75,98(68,84;90,71)	0,000
IL-17, пг/мл	39,75(18,63;70,80)	40,93(20,94;142,34)	0,699
BAFF, нг/мл	0,38(0,19;0,93)	0,33(0,20;3,97)	0,855
IL-10, пг/мл	23,67(9,07;45,92)	22,68(18,26;60,08)	0,400
IgG, мг/мл	89,22(83,70;102,93)	87,51(77,74;105,83)	0,849

При исследовании по группам, разделенным по содержанию CXCL-13, значимых различий выявлено не было.

Таблица 3.21

Концентрация изучаемых цитокинов у пациентов с РС при нормальном и высоком уровне IgG в сыворотке крови, Ме [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=22)	2 группа(n=46)	p
IgG, мг/мл	78,02(73,06;82,98)	96,07(87,80;106,97)	0,000
IL-17, пг/мл	27,97(18,61;46,86)	46,86(20,94;73,22)	0,088
BAFF, нг/мл	0,26(0,19;0,49)	0,44(0,20;4,76)	0,147
IL-10, пг/мл	20,71(13,40;45,95)	24,41(9,07;49,03)	0,849
CXCL-13, пг/мл	42,66(29,52;54,64)	39,00(23,53;53,69)	0,435

Обращает на себя внимание, что у пациентов с высоким уровнем ключевого показателя В-клеточной активации – IgG, в сыворотке концентрация IL-17 также была вдвое выше 46,86(20,94;73,22) пг/мл) по сравнению с таковой у пациентов с низким уровнем IgG (27,97(18,61;46,86)пг/мл, p=0,088).

Было исследовано и проведено сравнение содержания цитокинов у пациентов с разным уровнем EDSS (таб 3.22). Для этого всех пациентов с РС поделили на 3 группы. В первую вошли люди с минимальными проявлениями заболевания (EDSS до 2 баллов включительно), во вторую - пациенты с EDSS от 2,5 до 3,5 баллов, а в третью - пациенты с EDSS равным или больше 4 баллов.

Таблица. 3.22

Цитокины в сыворотке крови у пациентов с РС при различных показателях EDSS, Ме [LQ;UQ]

Показатель	1 группа (n=18) EDSS \leq 2	2 группа (n=25) 2<EDSS<4	3 группа (n=25) EDSS \geq 4	p
IL-17, пг/мл	57,60 (18,61;175,42)	49,24 (25,62;70,80)	27,97 (16,28;39,75)	0,049
IL-10, пг/мл	25,94 (6,69;52,16)	26,14 (14,37;45,99)	18,26 (13,88;33,66)	0,423
BAFF, нг/мл	0,42 (0,19;1,69)	0,30 (0,21;0,70)	0,40 (0,18;11,37)	0,634
CXCL-13, пг/мл	33,93 (13,84;39,96)	43,77 (25,42;54,64)	46,32 (30,77;64,95)	0,043
IgG, мг/мл	86,99 (83,70;95,22)	87,80 (87,70;105,83)	90,65 (79,98;103,71)	0,761

При сравнении методом ANOVA было выявлено достоверно высокое содержание IL-17 у пациентов с небольшим баллом по EDSS (p=0,049) с

последующим снижением, и наоборот, увеличение уровня CXCL-13 при повышении EDSS ($p=0,043$).

Подводя итоги исследования цитокинового статуса следует отметить, что результаты оценки сывороточных факторов иммунного ответа у пациентов с РС указывают на наличие связи между провоспалительным цитокином IL-17 и факторами, ассоциированными с функционированием В-лимфоцитов – В-клеточным активатором BAFF и основным продуктом этих клеток IgG: несмотря на отсутствие прямых корреляций между этими факторами, в группе пациентов с высоким уровнем IL-17 концентрация BAFF была вдвое выше таковой у пациентов с низким уровнем IL-17, и наоборот - высокие уровни BAFF и IgG ассоциированы с вдвое более высокой концентрацией IL-17 по сравнению с таковой у пациентов с низкими уровнями В-клеточных факторов.

Следующий этап работы посвящен исследованию механизмов взаимодействия двух ключевых лимфоцитарных популяций, участвующих в патогенезе РС – В-лимфоцитов и Th17, а именно - оценке вклада В-лимфоцитов в продукцию IL-17 при рассеянном склерозе *in vitro*.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИИ В-ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ВКЛАДА В ПРОДУКЦИЮ IL-17 ПРИ РС

В исследовании участвовали пациенты с РС, принимавшие ГА в течение как минимум 6 месяцев. По механизму действия ГА не является регулятором функций иммунных клеток, это структурный аналог основного белка миелина (МВР) – ключевого аутоантигена, ассоциированного с РС. Он отвлекает ресурсы иммунной системы от МВР, конкурентно взаимодействуя с МВР-специфичными Т-лимфоцитами. Учитывая это, при оценке ответа Т-клеток на активацию использовали другой ключевой аутоантиген, ассоциированный с РС – MOG.

Согласно данным литературы, В-лимфоциты могут вносить вклад в продукцию IL-17 двумя путями: во-первых, презентировав антиген Т-лимфоцитам и инициировав их дифференцировку в Th17; во-вторых, за счет собственной продукции данного цитокина.

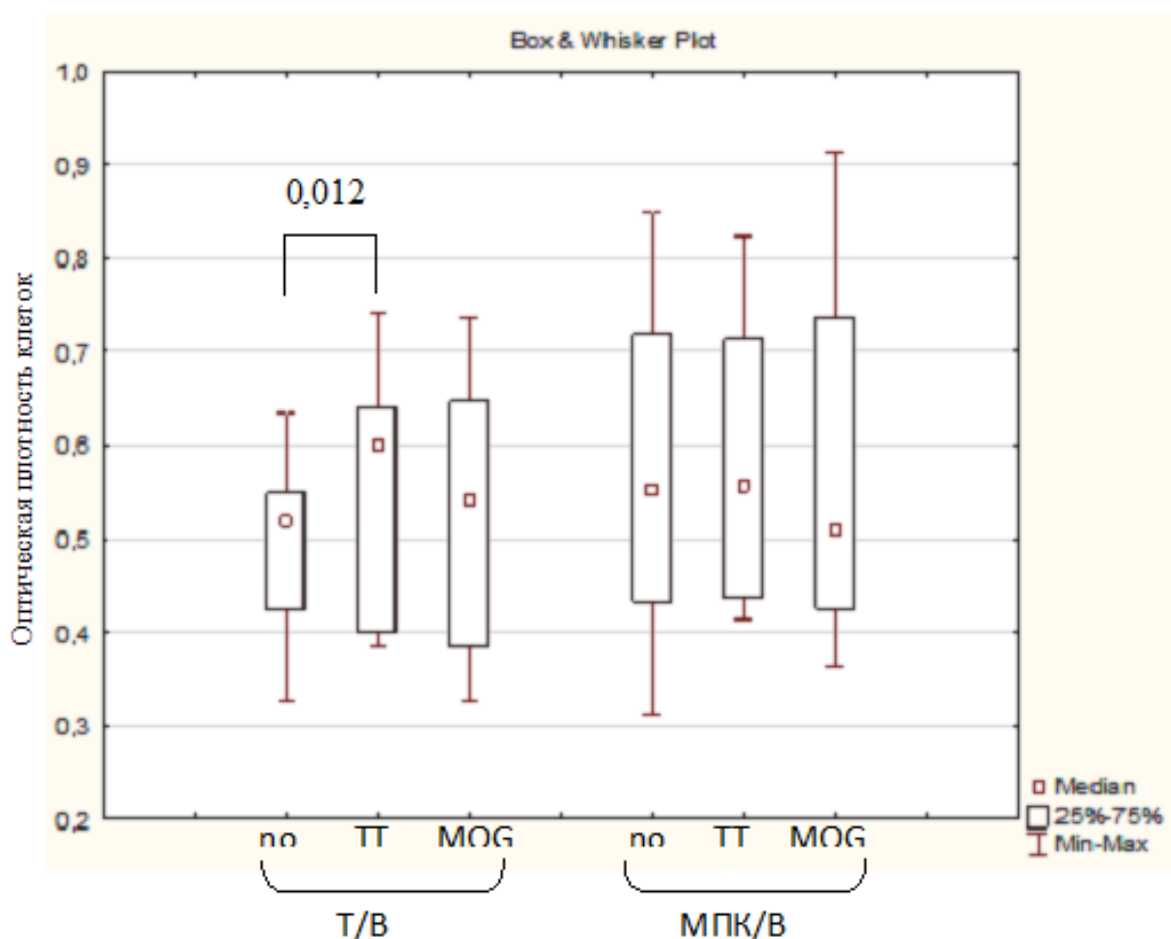
4.1. Роль антигенпрезентирующей функции В-лимфоцитов в дифференцировке наивных Т-клеток в Th17/Treg

Антигенпрезентирующую активность В-лимфоцитов оценивали по ответу Т-клеток на экзоантиген (ТТ) или ключевой аутоантиген, ассоциированный с РС (MOG), представленный аутологичными В-лимфоцитами в совместной культуре В-клеток с фракционированными Т-лимфоцитами или с МПК в соотношении 1:10. На первом этапе определяли ранний ответ Т-лимфоцитов на антигенную активацию – пролиферацию, на втором - оценивали их последующую дифференцировку в Th17. При этом одновременно с Th17 оценивали дифференцировку второй важнейшей Т-хелперной субпопуляции с противоположными функциями – регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Обе субпопуляции развиваются из общего Т-клеточного предшественника и конечный результат зависит не столько от содержания и активности отдельных субпопуляций Th17 и Treg, сколько от их баланса.

4.1.1 Проллиферативный ответ CD3⁺T-лимфоцитов на антигены, презентруемые В-клетками

Исследования показали статистически значимый пролиферативный ответ CD3⁺T-лимфоцитов на облигатный антиген (ТТ), представленный аутологичными В-лимфоцитами в совместной культуре В-клеток с фракционированными Т-лимфоцитами, но не с МПК (рис. 3). Этот эффект выявлен как у здоровых доноров, так и у пациентов с РС (рис. 3), и по величине, выраженной как отношение показателя для пробы с антигеном к соответствующему значению для пробы без антигена, был сопоставим у этих двух групп (рис. 4).

а)



б)

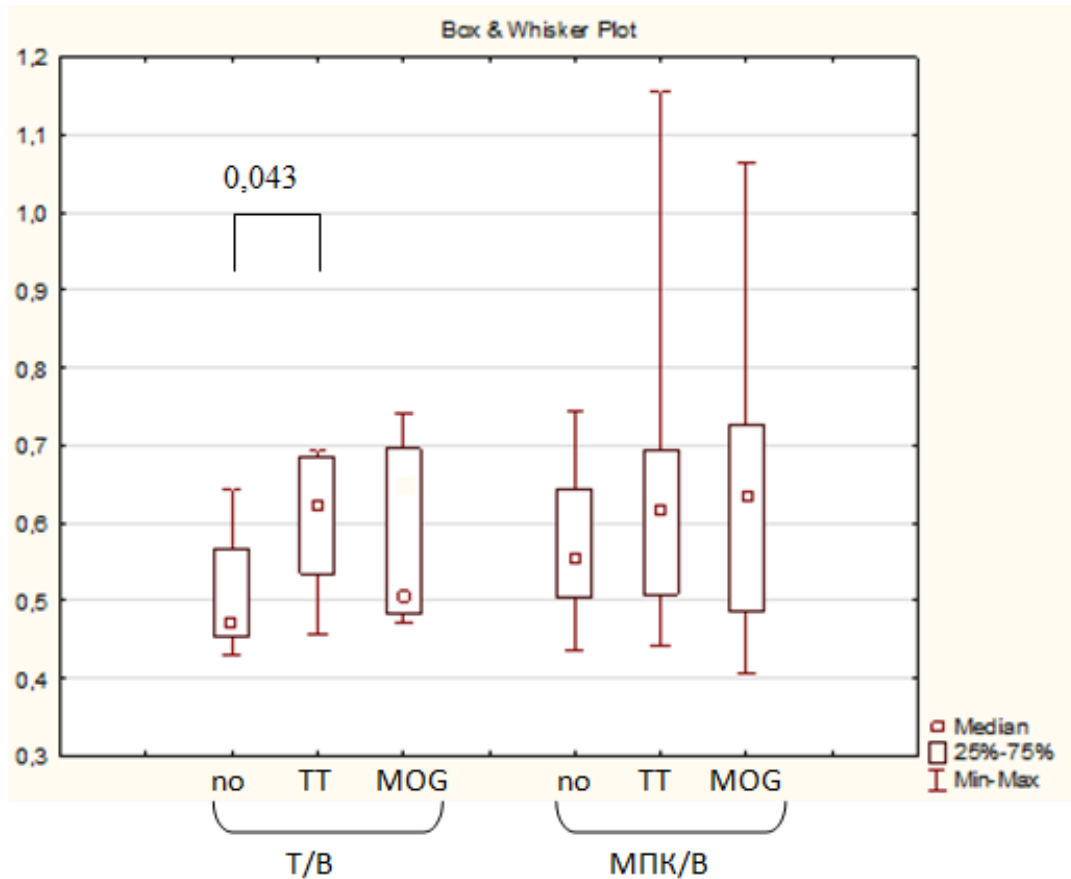


Рис.3. Пролiferация Т-лимфоцитов у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б) в ответ на антигены, представленные аутологичными В-лимфоцитами в совместной культуре В-клеток с фракционированными CD3⁺Т-лимфоцитами или мононуклеарными клетками периферической крови (МПК). Значимость отличий оценивалась с помощью критерия знаковых рангов Вилкоксона, представлены значения $p < 0,05$.

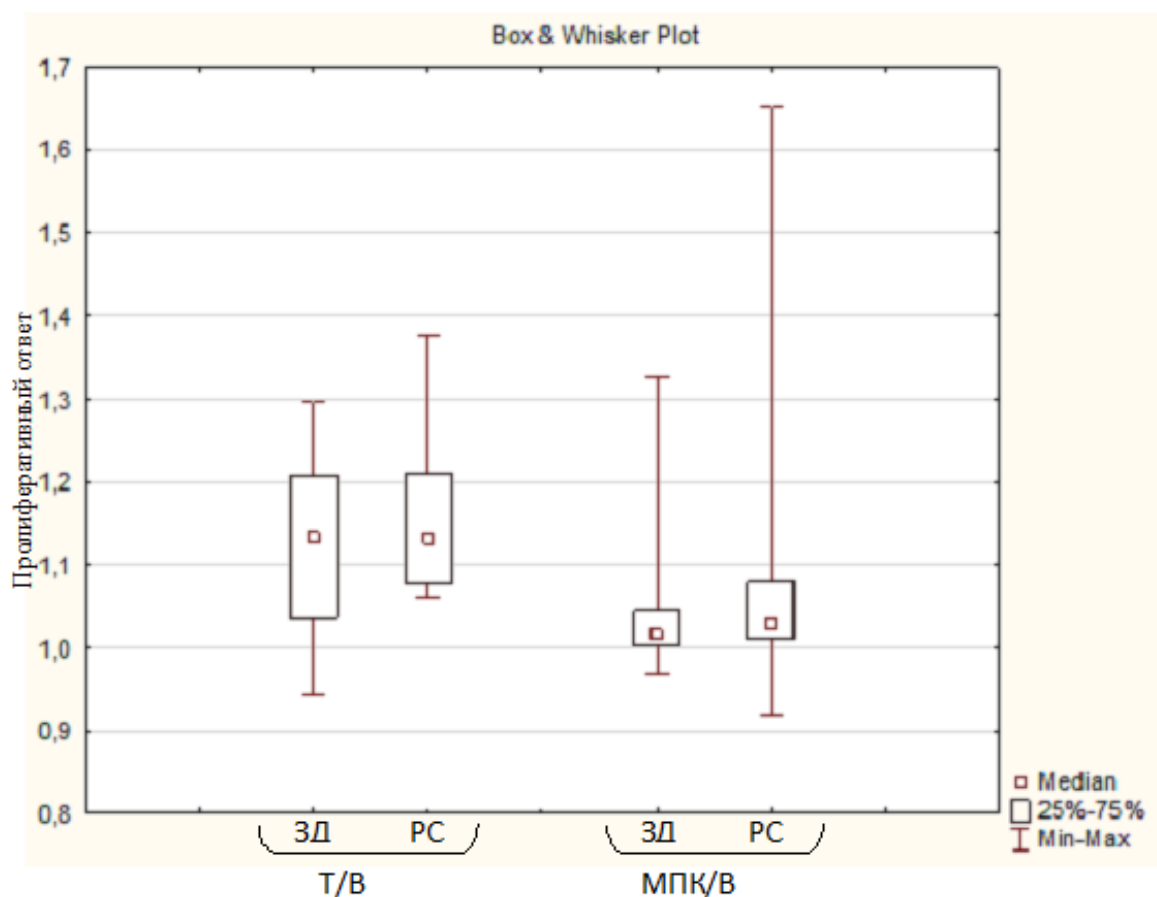


Рис.4. Сопоставление пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на облигатный антиген (ТТ), представленный аутологичными В-лимфоцитами, выраженного как отношение показателя пролиферации для пробы с антигеном к соответствующему показателю для пробы без антигена. Значимость отличий оценивалась с помощью U-критерия Манна — Уитни. Разницу значений принимали статистически значимой при $p < 0,05$.

Представленные данные указывают на способность В-лимфоцитов эффективно представлять антигены (по крайней мере, экзогенные) Т-клеткам.

4.1.2. Дифференцировка наивных $CD4^+$ Т-клеток в Th17/Treg в ответ на антиген, представленный В-лимфоцитами

Для оценки Т-хелперной дифференцировки использовали два показателя: 1) процент Th17/Treg в совместной Т-/В-клеточной культуре, по внутриклеточной экспрессии ключевых маркеров данных Т-клеточных субпопуляций – транскрипционных факторов ROR γ t для Th17 и Foxp3 для

Treg; 2) уровень IL-17 в супернатантах Т-/В-клеточной культуры. При этом, наряду с непосредственным определением содержания Th17/Treg и IL-17 в культуре, оценивались эффекты антигенов, выраженные как отношение исследуемого показателя в пробе с антигеном к соответствующему показателю в пробе без антигена.

В группе здоровых доноров содержание Th17 в культуре не изменялось в присутствии экзо- или аутоантигенов, представленных аутологичными В-лимфоцитами, (рис. 5, ба), однако у пациентов с РС оно статистически значимо возрастало в ответ на ключевой аутоантиген-MOG, в совместной культуре В-лимфоцитов как с изолированными CD4⁺Т-клетками, так и с МПК в качестве источника Т-лимфоцитов (рис. 5, бб).

Анализ эффектов В-зависимой антигенной презентации на дифференцировку Th17, выраженной как отношение процента Th17 клеток в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена, показал статистически значимые различия между эффектами облигатного антигена (ТТ) и аутоантигена (MOG) в обеих исследуемых группах доноров, однако у здоровых доноров эффект ТТ был выше такового для MOG, тогда как у больных РС, напротив, MOG-зависимая стимуляция дифференцировки Th17 была статистически значимо выше эффекта облигатного антигена (рис. 7). Более того, сопоставление эффектов конкретного антигена в разных группах доноров выявило статистически значимо более высокий эффект MOG в отношении дифференцировки Th17 у пациентов с РС по сравнению с таковым у здоровых доноров (рис. 8).

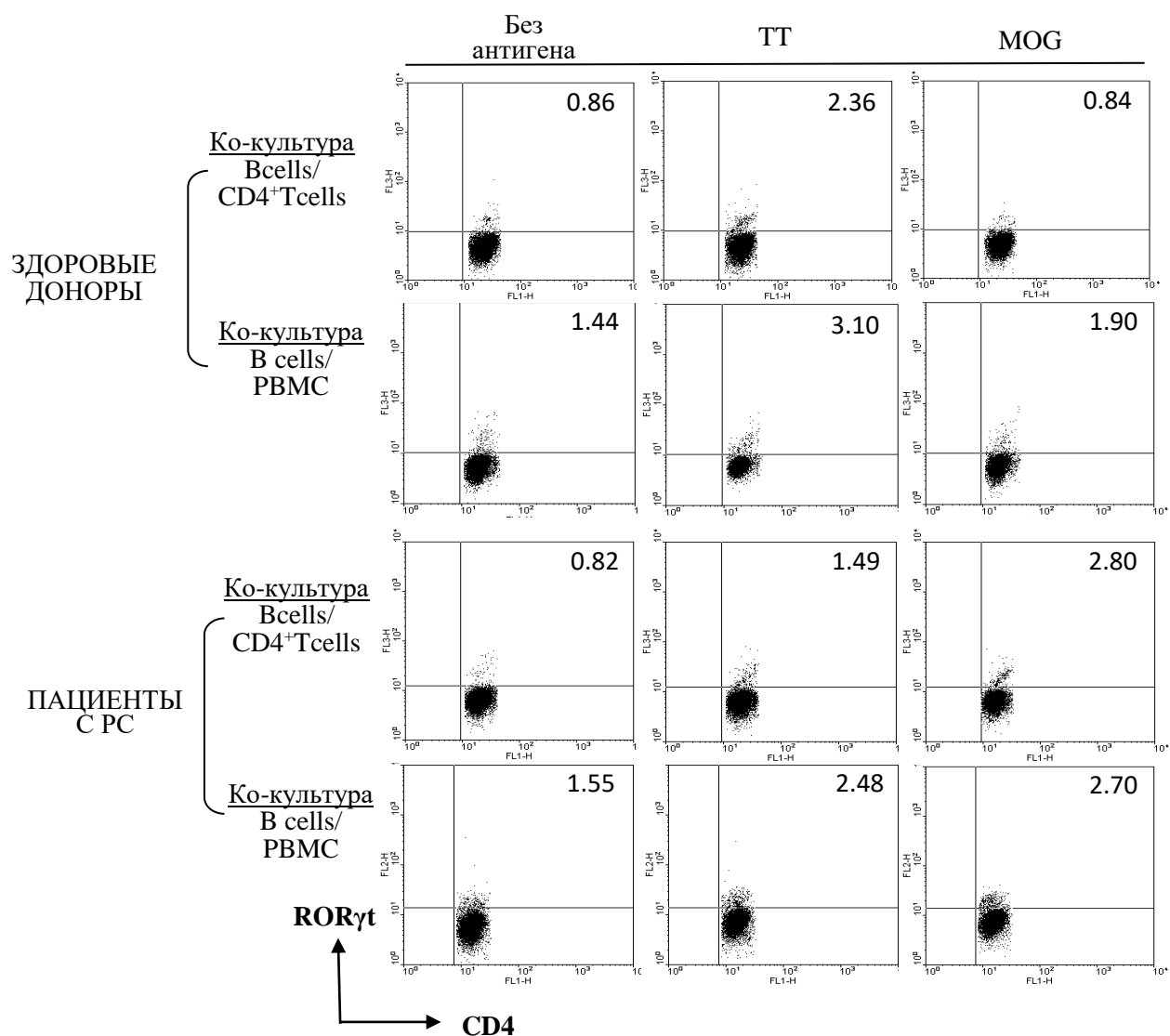
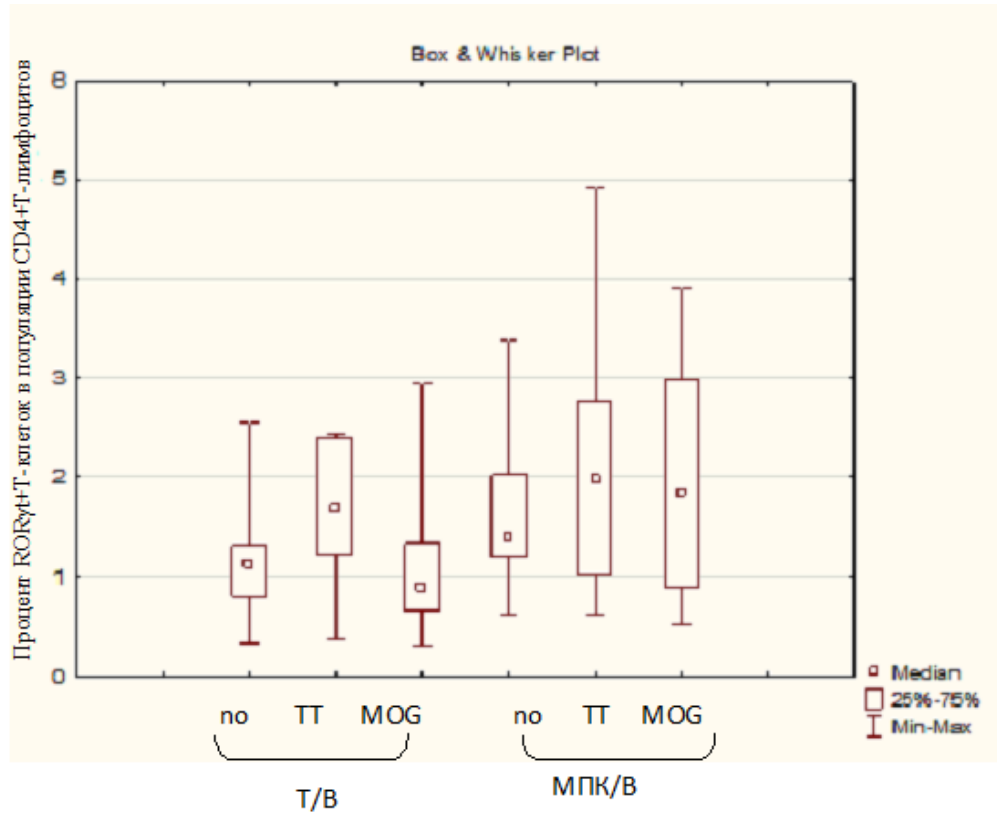


Рис. 5. Роль В-лимфоцитов в формировании Th17 при рассеянном склерозе.

Диаграмма демонстрирует экспрессию транскрипционного фактора ROR γ t CD4⁺T-лимфоцитами здоровых доноров и пациентов с РС в ответ на антигены, презентруемые аутологичными В-лимфоцитами в совместной культуре. По осям X и Y – интенсивность флуоресценции; указан процент ROR γ t⁺ клеток в популяции CD4⁺T-лимфоцитов. Представлены результаты одного из 11 аналогичных экспериментов для здоровых доноров (одного из 6 для фракционированных CD4⁺T-клеток) и одного из 13 для пациентов с РС (одного из 6 для фракционированных CD4⁺T-клеток).

а)



б)

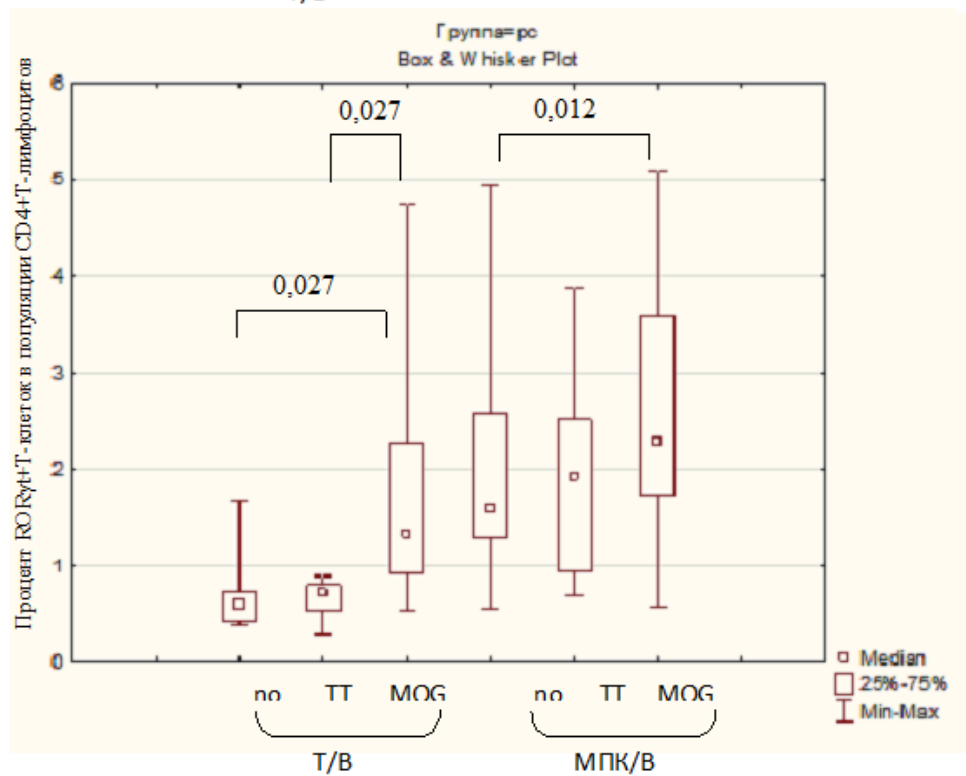
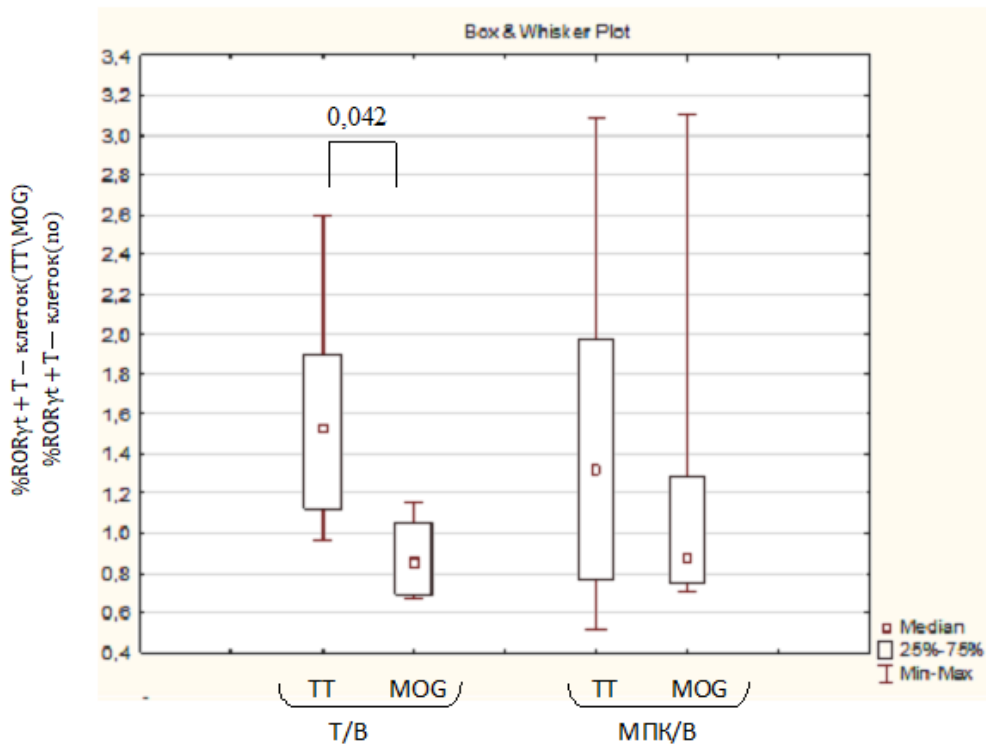


Рис.6.Содержание Th17 в ко-культуре CD4⁺T-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) с аутологичными В-лимфоцитами, нагруженными экзо- или аутоантигеном, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью критерия знаковых рангов Вилкоксона, представлены значения $p < 0,05$.

а)



б)

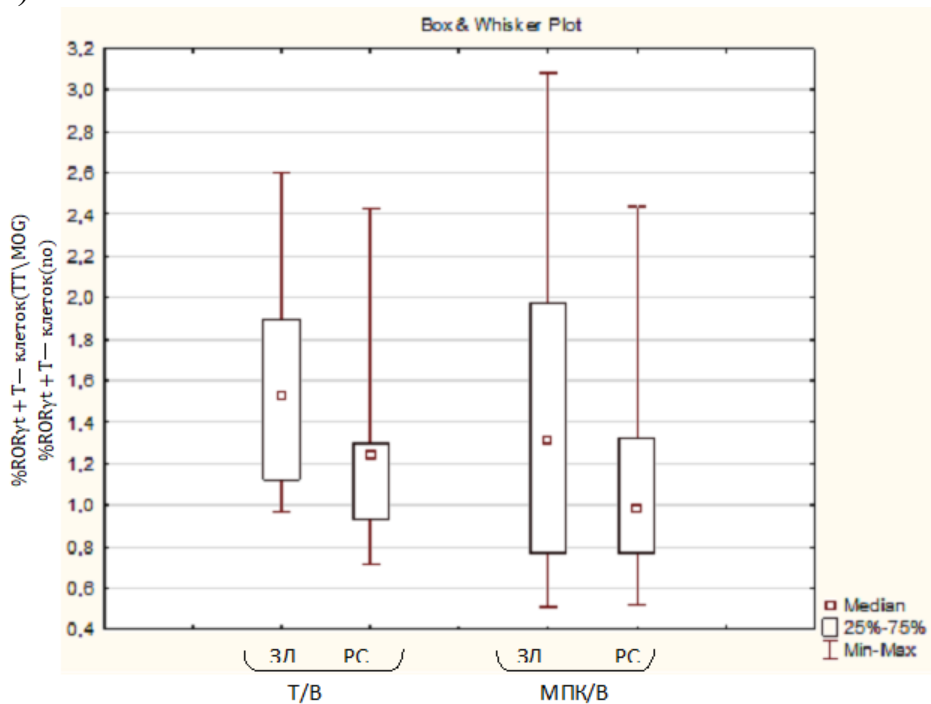
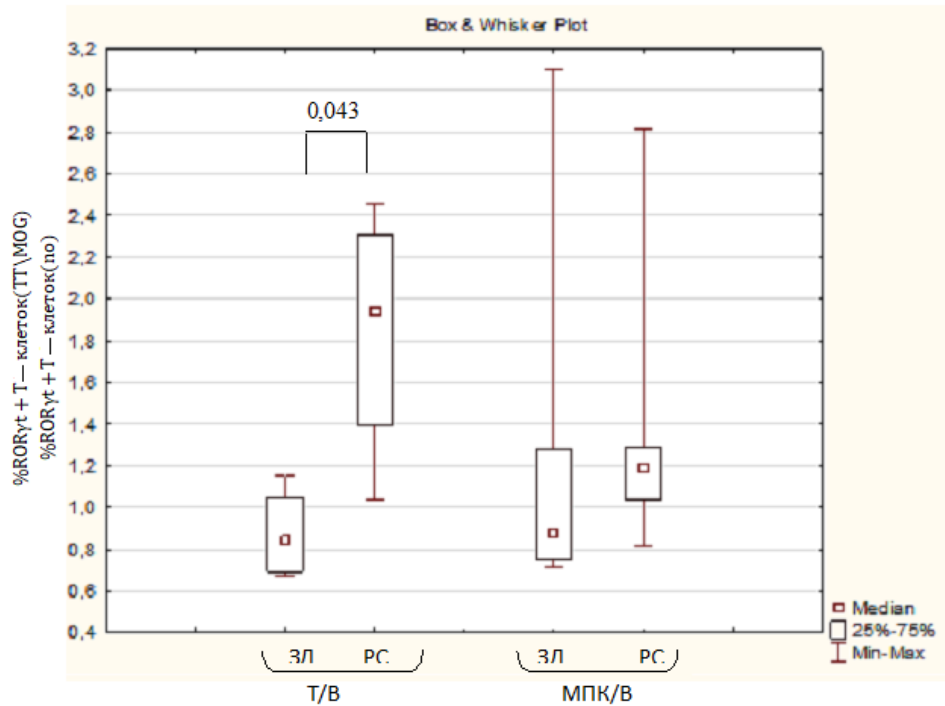


Рис. 7. Эффекты антигенов, представленных В-лимфоцитами, в отношении дифференцировки Th17, выраженные как отношение процента Th17 в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью критерия знаковых рангов Вилкоксона, представлены значения $p <$

0,05

a)



б)

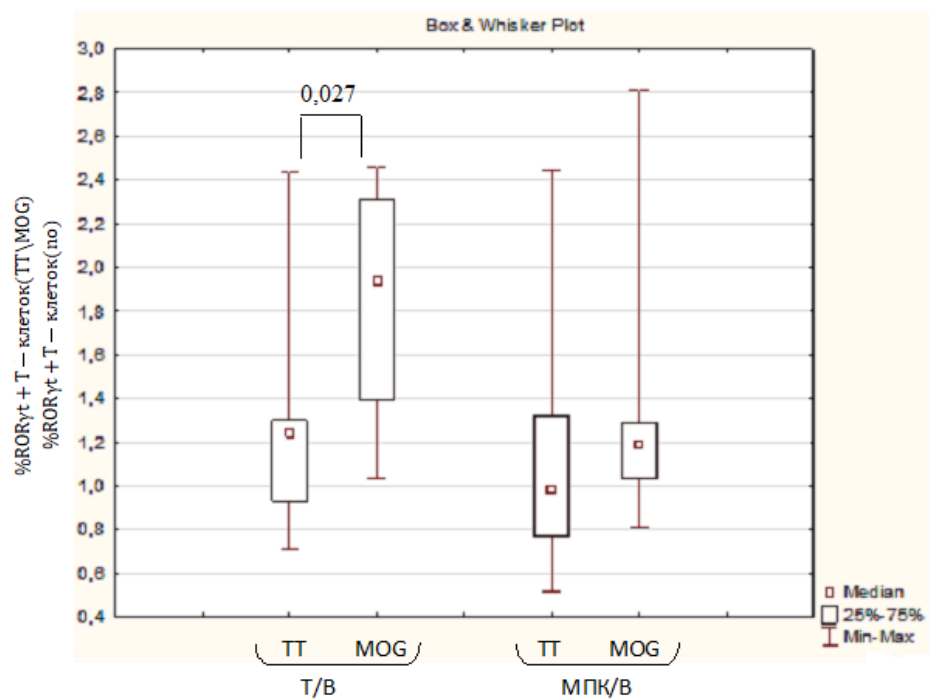


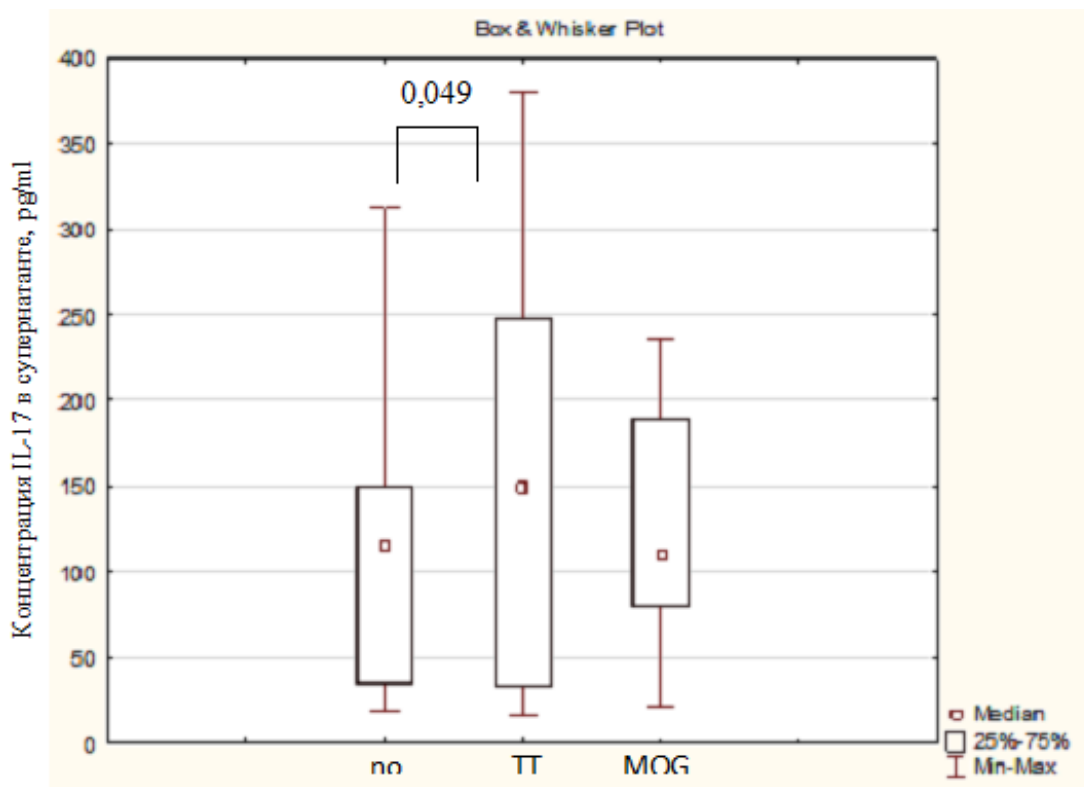
Рис. 8. Сопоставление эффектов антигенов, представленных В-лимфоцитами, в отношении дифференцировки Th17, выраженных как отношение процента Th17 в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью U-критерия Манна — Уитни, представлены $p < 0,05$.

Вклад В-зависимой презентации антигена в направленную дифференцировку Th17 *in vitro* подтверждается и результатами оценки уровня IL-17 в супернатантах клеточных культур: он статистически значимо возрастал в ответ на облигатный антиген-ТТ, у здоровых доноров (рис. 9а) и в ответ на аутоантиген -МОГ, у пациентов с РС (рис. 9б). При этом анализ эффектов антигенов в исследуемых группах, выраженный как отношение концентрации IL-17 в пробах с антигеном к таковому в соответствующих пробах без антигена, не выявил статистически значимых отличий (рис. 10).

Аналогичные исследования в отношении дифференцировки Treg выявили статистически значимое повышение содержания этих клеток в ответ на облигатный антиген (ТТ) в 48-часовой ко-культуре В-лимфоцитов как с изолированными CD4⁺T-клетками, так и с МПК – это показано для здоровых доноров (рис. 11а), но не для пациентов с РС (рис. 11б).

Эффекты экзогенного антигена (ТТ) и аутоантигена (МОГ) в отношении дифференцировки Treg, выраженные как отношение процента Treg в пробе с антигеном к соответствующему показателю в пробе без антигена, статистически значимо различались у здоровых доноров, причем эффект ТТ был выше такового для МОГ (рис. 12а). У пациентов с РС значимых различий в эффектах антигенов не выявлено (рис. 12б). Сопоставление эффектов ТТ в отношении дифференцировки Treg у здоровых доноров и пациентов с РС также выявило статистически значимое отличие между исследуемыми группами, с более высоким показателем у здоровых доноров (рис. 13).

Учитывая, что субпопуляции Th17/Treg развиваются из общего T-клеточного предшественника, и результат иммунорегуляции зависит не столько от уровня и активности этих субпопуляций, сколько от их баланса, мы оценили соотношение Th17/Treg в исследуемой системе – в 48-часовой совместной культуре CD4⁺T-лимфоцитов или МПК с аутологичными В-клетками, нагруженными экзо- или аутоантигеном.



а)

б)

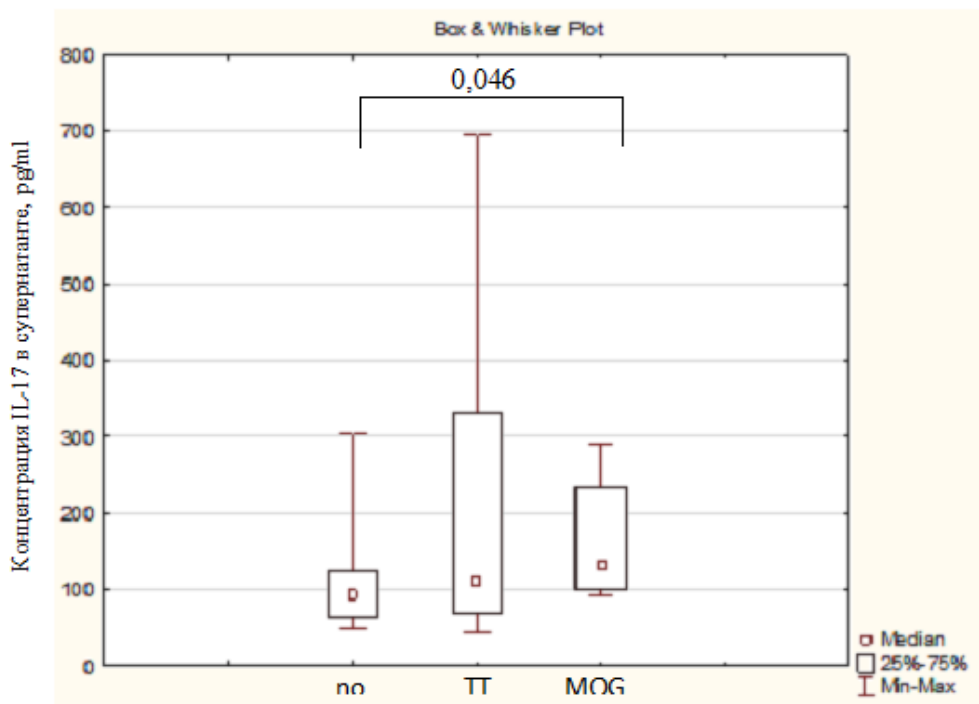


Рис. 9. Уровень IL-17 в супернатантах ко-культуры CD4⁺T-лимфоцитов с аутологичными В-клетками, нагруженными антигенами, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью критерия знаковых рангов Вилкоксона, представлены значения $p < 0,05$.

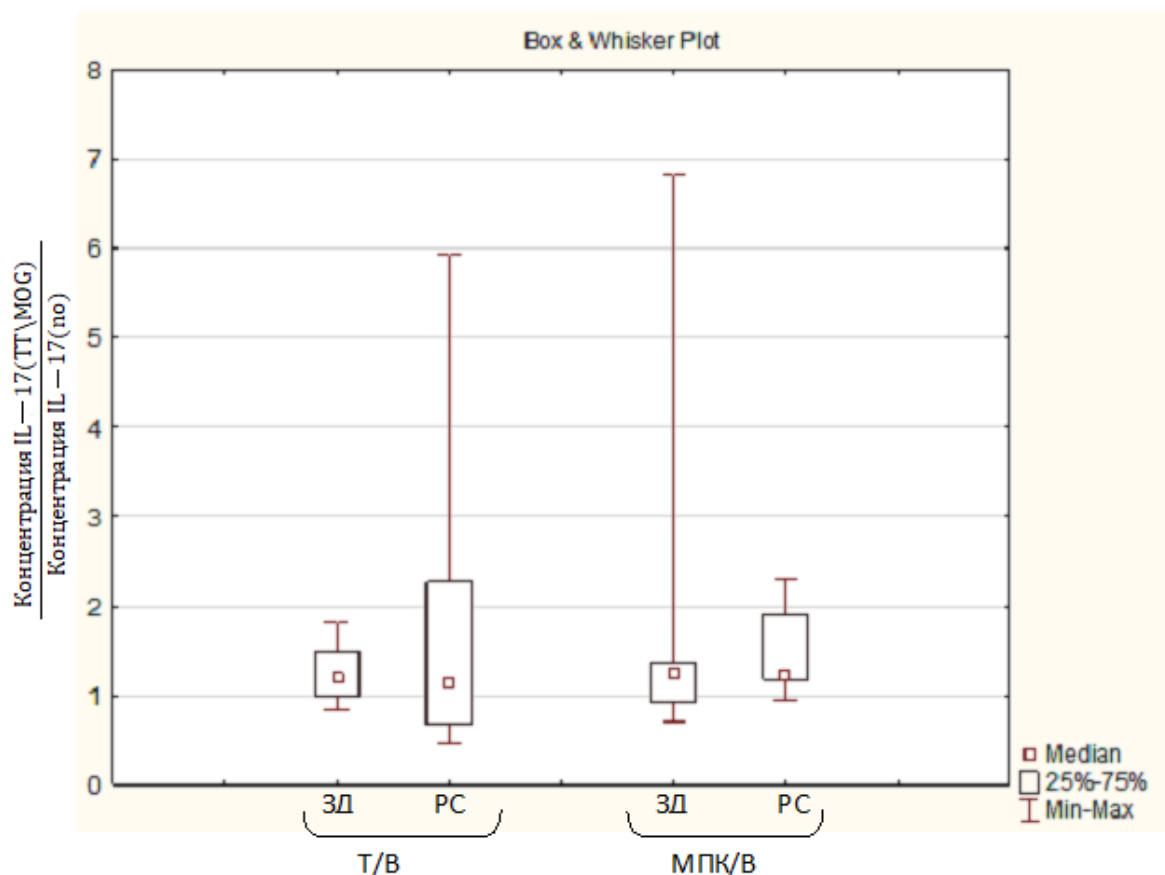
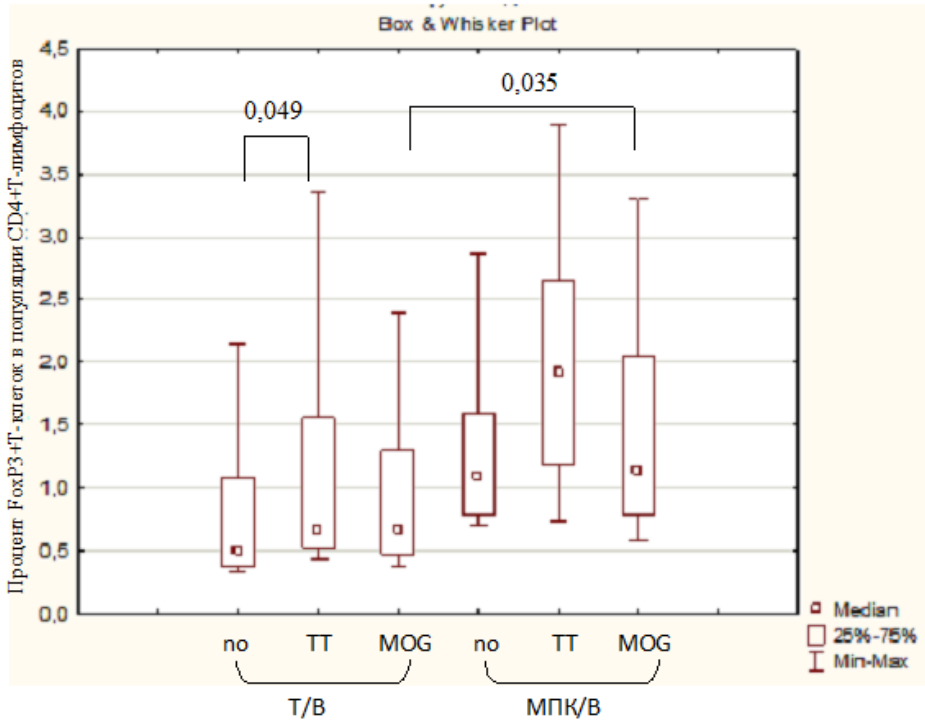


Рис. 10. Эффекты В-зависимой презентации антигена в отношении продукции IL-17 в ко-культуре CD4⁺T-лимфоцитов с аутологичными В-клетками, определяемые как отношение уровня IL-17 в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена. Значимость отличий оценивалась с помощью U-критерия Манна — Уитни. Разницу значений принимали статистически значимой при $p < 0,05$.

Соотношение Th17/Treg было статистически значимо более высоким в ответ на MOG в сопоставлении с облигатным антигеном как у здоровых доноров, в ко-культуре В-лимфоцитов с МПК (рис. 14а), так и у пациентов с РС, в ко-культуре В-клеток с изолированными CD4⁺T-лимфоцитами (рис. 14б).

В целом, мы показали, что В-лимфоциты способны эффективно презентировать Т-клеткам не только экзо-, но и аутоантигены, стимулируя преимущественную дифференцировку последних в Th17 и сдвигая баланс Th17/Treg. Этот эффект существенно более выражен у пациентов с РС в ответ на MOG, указывая на вклад В-клеток в продукцию IL-17 при РС.

а)



б)

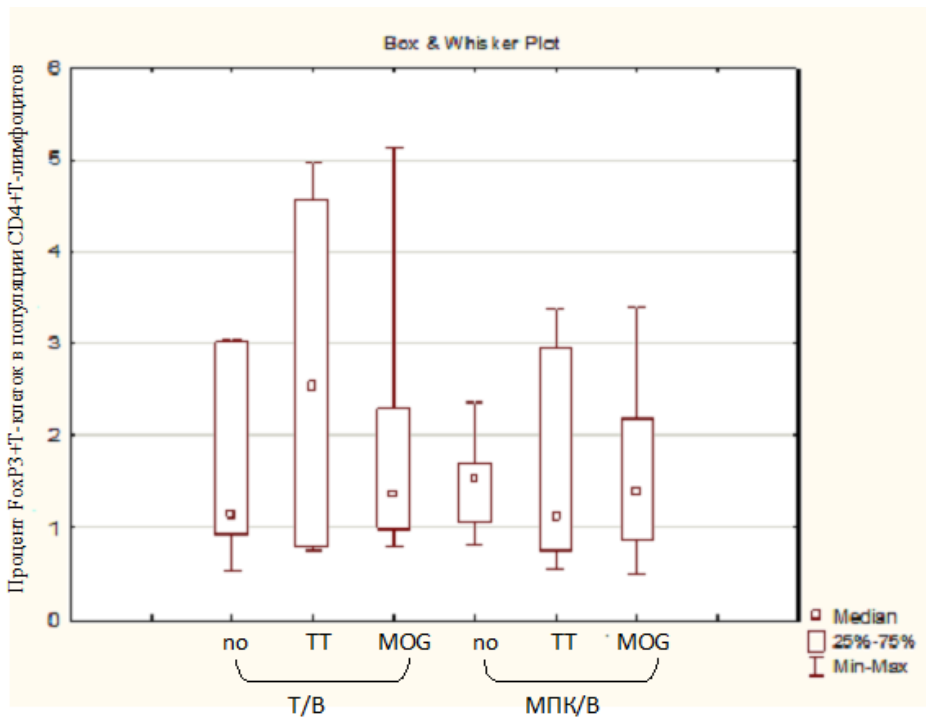
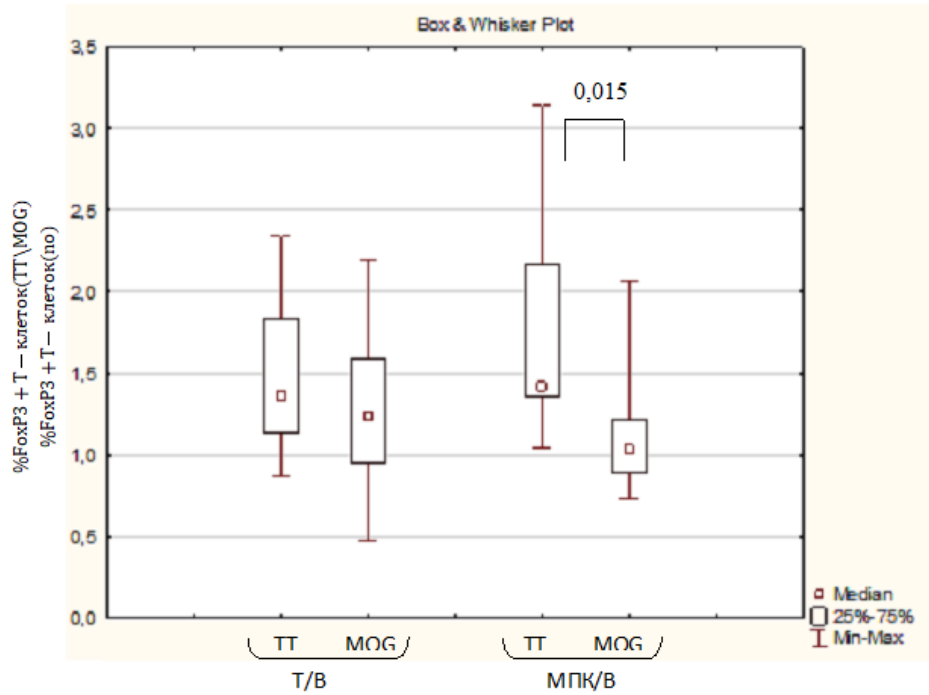


Рис.11. Содержание Treg в ко-культуре CD4⁺T-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) с аутологичными В-лимфоцитами, нагруженными экзо- или аутоантигеном, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью критерия знаковых рангов Вилкоксона, представлены значения $p < 0,05$.

а)



б)

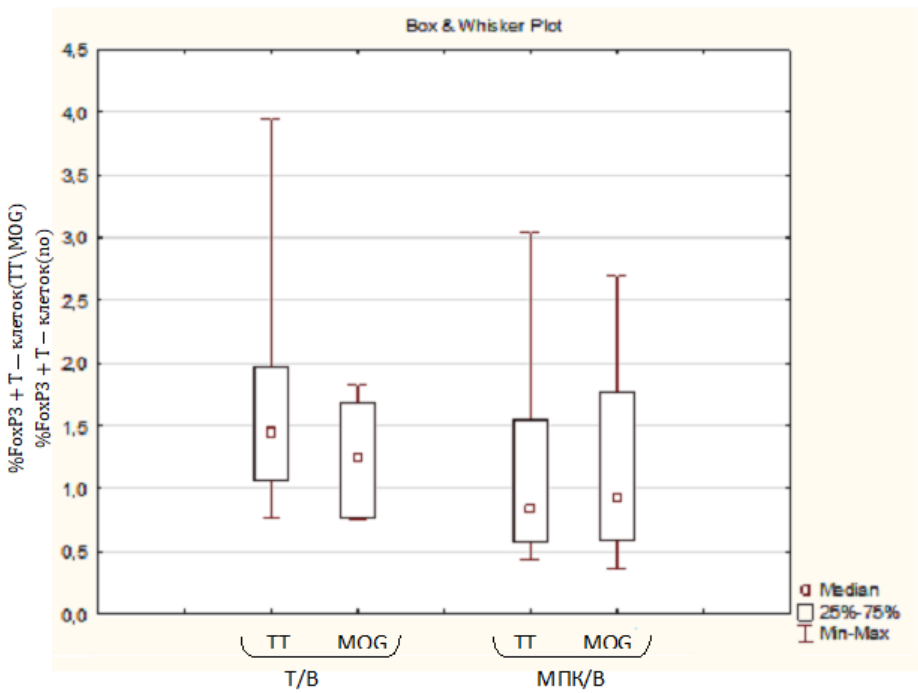
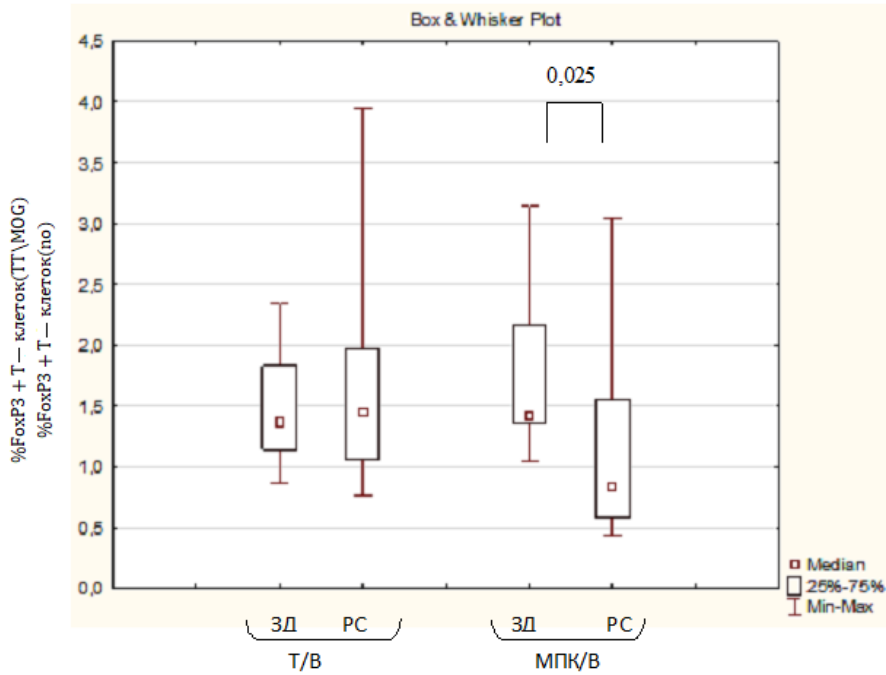


Рис. 12. Эффекты антигенов, представленных В-лимфоцитами, в отношении дифференцировки Treg, выраженные как отношение процента Treg в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Достоверность отличий оценивалась с помощью критерия знаковых рангов Вилкоксона, представлены значения $p < 0,05$.

a)



б)

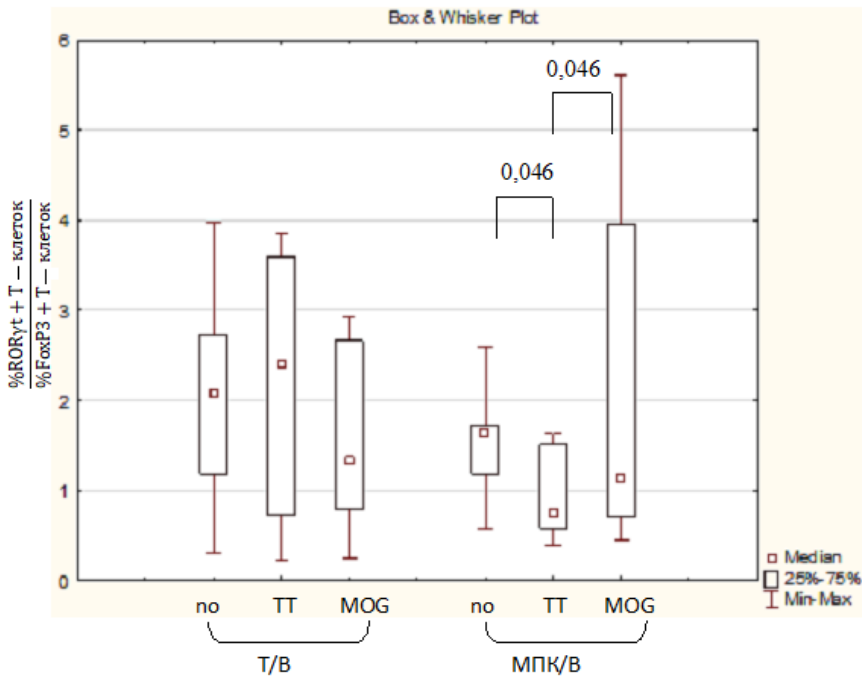
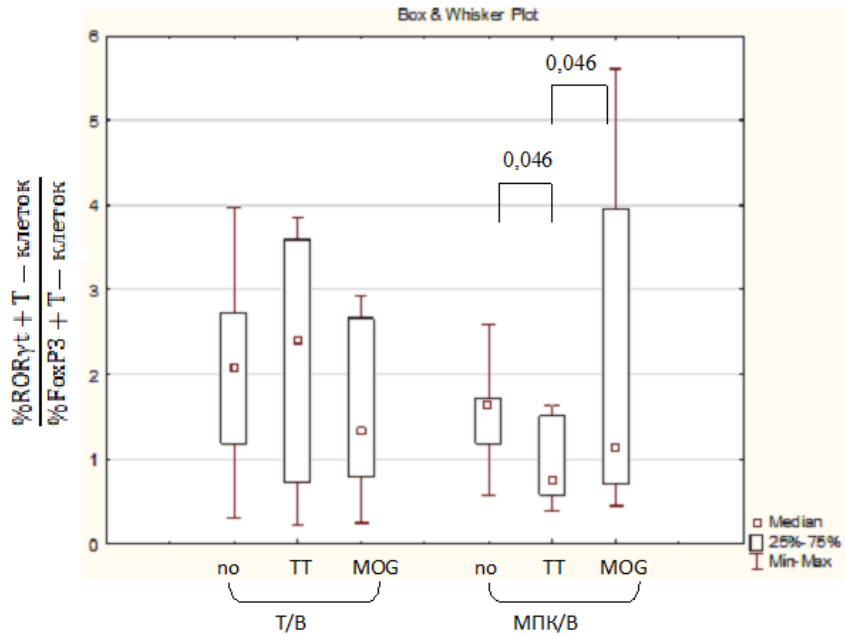


Рис. 13. Сопоставление эффектов антигенов, представленных В-лимфоцитами, в отношении дифференцировки Treg, выраженных как отношение процента Treg в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью U-критерия Манна — Уитни, представлены $p < 0,05$.

a)



б)

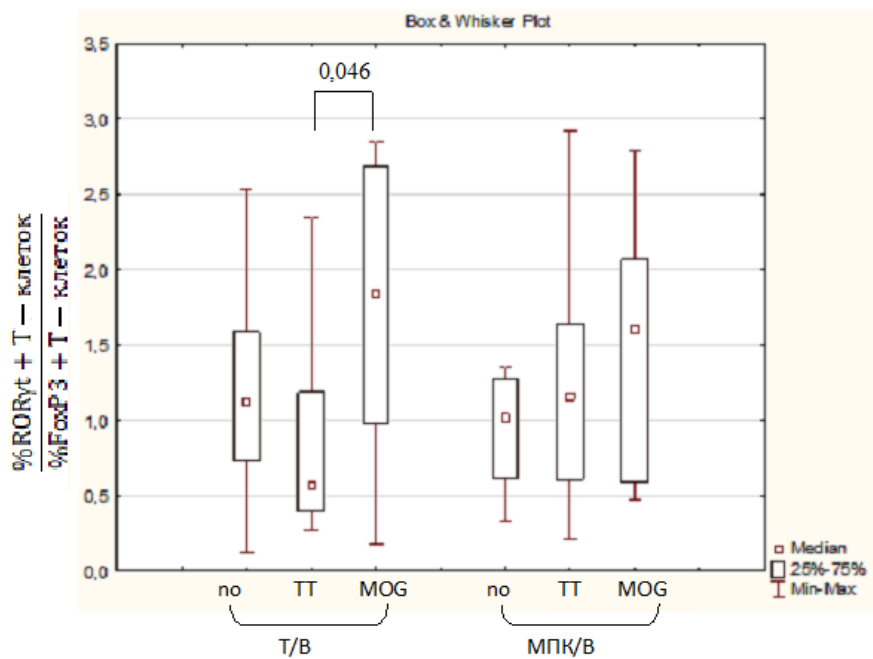


Рис. 14. Соотношение Th17/Treg в ко-культуре CD4⁺T-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (МПК) с аутологичными В-лимфоцитами, нагруженными экзо- или аутоантигеном, у здоровых доноров (a) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью критерия знаковых рангов Вилкоксона, представлены значения $p < 0,05$.

Наряду с этим, согласно данным литературы, В-лимфоциты способны в некоторых условиях сами продуцировать IL-17. Мы оценили эту способность у пациентов с РС.

4.2. Исследование продукции В-лимфоцитами IL-17 при РС

У пациентов с РС и контрольной группы было определено содержание в периферической крови В-клеток с внутриклеточной экспрессией IL-17 (CD19⁺IL-17⁺-клеток) *ex vivo*. Показано статистически значимо более высокое содержание IL-17-позитивных В-лимфоцитов при РС (рис. №15,16), что, наряду с В-зависимой презентацией аутоантигенов, должно вносить вклад в продукцию цитокина при данной патологии.

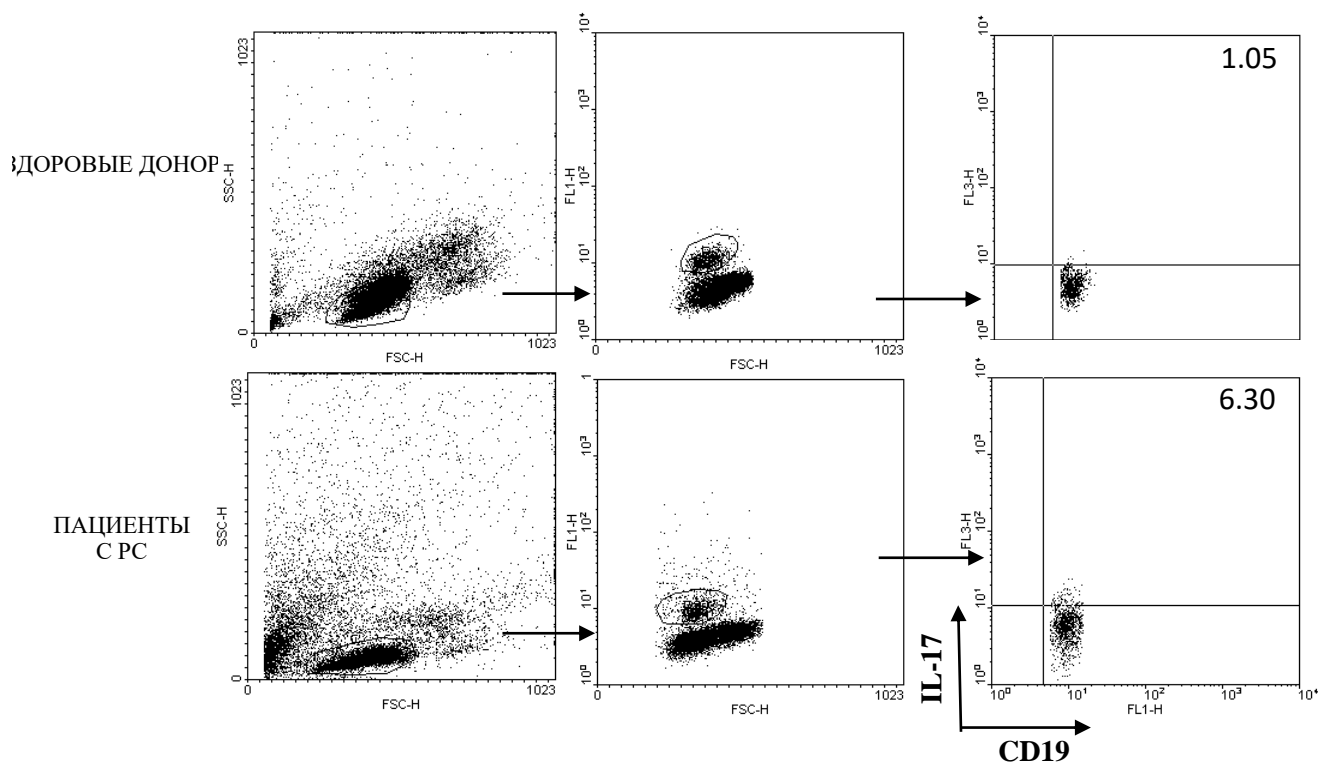


Рис. 15. В-лимфоциты как потенциальные продуценты IL-17 при рассеянном склерозе.

На диаграмме представлена экспрессия IL-17 В-лимфоцитами (CD19⁺ клетками) здоровых доноров и пациентов с РС *ex vivo*. Показан процент клеток, несущих IL-17 в популяции CD19⁺-клеток. Представлены результаты одного из 5 аналогичных экспериментов для здоровых доноров и одного из 6 для пациентов с РС.

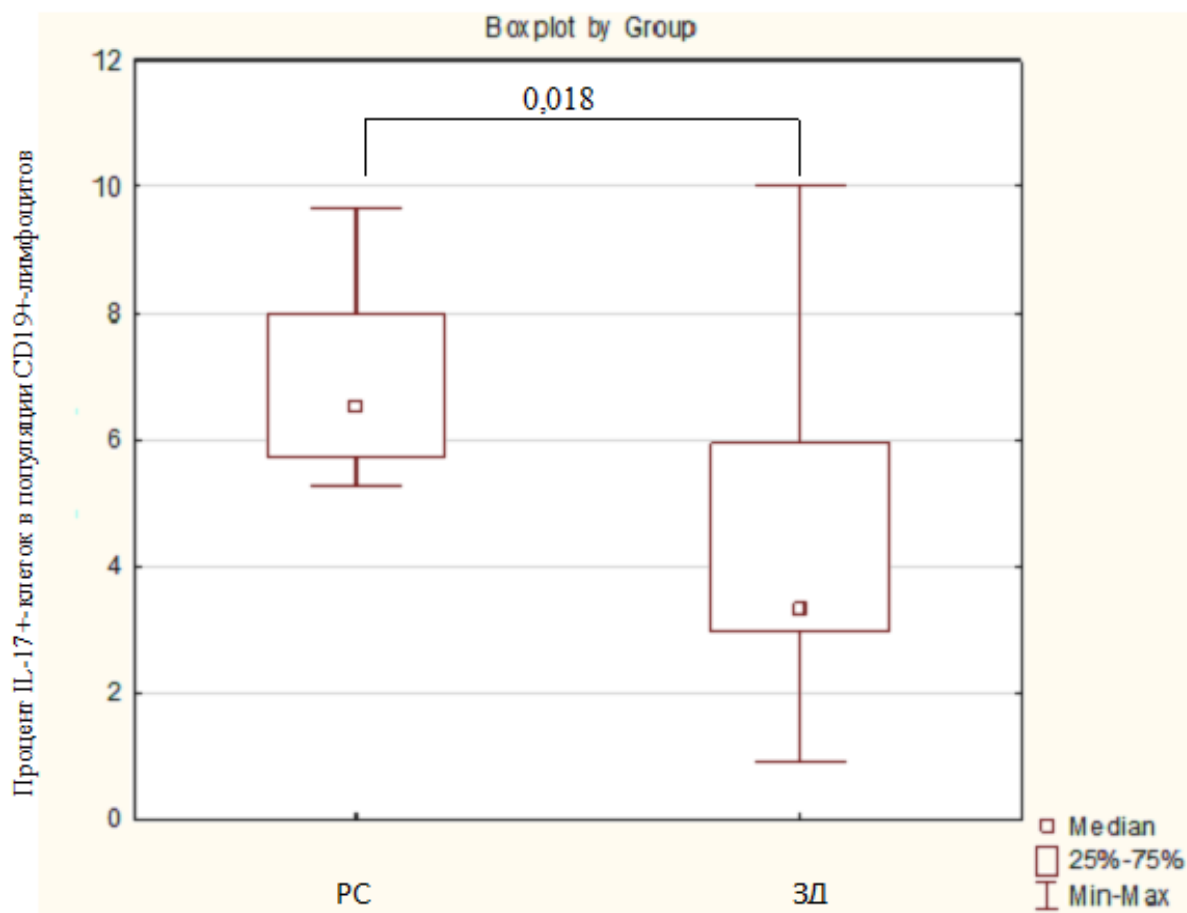


Рис 16. Экспрессия IL-17 В-лимфоцитами периферической крови пациентов с РС *ex vivo*. Значимость отличий оценивалась с помощью U-критерия Манна — Уитни, представлены значения $p < 0,05$.

Полученные исследования показывают, что активность продуцентов IL-17 в пробах с облигатным антигеном выше, чем в пробах без антигена у обеих исследуемых групп, но только у пациентов с РС их активность также высока в пробе с аутоантигеном.

4.6. Клинические примеры.

В данном разделе представлены примеры, иллюстрирующие особенности развития заболевания и исследуемые иммунологические параметры.

Пример пациента с РС, не принимающего ПИТРС

Пациентка А., 26 лет, менеджер. Из анамнеза: начало заболевания в апреле 2018 года, на момент участия в исследовании болеет полтора года. Первыми симптомами были чувствительные нарушения – парестезии в левой руке. Симптомы купировались самостоятельно, но через год рецидивировали. В апреле 2019 г. проведено МРТ головного мозга, установлен диагноз Рассеянный склероз. Цереброспинальная форма. Ремиттирующее течение. Стадия экзацербации. Легкие чувствительные нарушения. Легкий атактический синдром. Проведено лечение курсом глюкокортикоидных гормонов с купированием симптомов в апреле 2019. Неврологический статус на момент осмотра в сентябре 2019 г: острота зрения 1,0 - справа, 1,0 - слева, нистагма нет, глазодвигательных нарушений 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, снижение брюшных рефлексов. Патологические знаки не получены. Легкая неустойчивость в позе Ромберга с закрытыми глазами, пальце-носовую и пяточно-коленную пробы выполняет без интенционного дрожания и дисметрии. Легкое онемение левой ладони. Легкие тазовые нарушения по центральному типу. Оценка состояния больной по клиническим шкалам представлена в табл.4.1.

Таблица 4.1.

Исследуемые клинические показатели пациентки А.

Показатель	Значения
EDSS	2,5
FS1 (зрительные функции)	0
FS2 (функции ствола мозга)	2
FS3 (пирамидные функции)	1

FS4 (мозжечковые функции)	1
FS5 (сенсорные функции)	2
FS6 (функции кишечника и мочевого пузыря)	1
FS7 (мыслительные функции)	0
FS8 (передвижение, ambulation score)	0
Ходьба на 25 футов (секунды)	4,05
9-ти луночный тест доминантной руки (секунды)	17,15
9-ти луночный тест недоминантной руки (секунды)	18,95
PASAT (ответы)	35
Тревога по шкале HADS (баллы)	5
Депрессия по шкале HADS (баллы)	0
Оценка утомляемости по FSS (баллы)	21
Качество жизни по шкале MSIS 29	46

МРТ головного мозга 24.04.2019 г. – множественные очаги демиелинизации без признаков перифокального отека. Диагноз: РС. Цереброспинальная форма. Ремиттирующее течение. Стадия относительной ремиссии. Рефлекторный тетрапарез. Легкие стволовые нарушения. Легкий атактический синдром. Тазовые нарушения по центральному типу. Клиническое состояние в течение года стабильное. Обострений за год не было. Пациентка в данный момент от приема ПИТРС воздерживается. Иммунологические показатели данной пациентки представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2.

Исследуемые иммунологические показатели пациентки А.

№	Показатель	Значения
1	IL-17, пг/мл	65,99
2	IL-10, пг/мл	0,08
3	BAFF, нг/мл	1,29
4	CXCL-13, пг/мл	25,42
5	Общий IgG, мг/мл	87,80

Данный пример иллюстрирует выявленные нами закономерности: увеличение уровня IL-17 и уменьшение IL-10 сыворотке крови пациентов, не принимавших терапии, а также тенденцию к повышению ВАФФ у пациентов с небольшим сроком заболевания.

Пример пациента с РС, принимающего глатирамера ацетат.

Пациент К., 44 года, юрист. Из анамнеза: дебют заболевания с чувствительных нарушений в левой руке осенью 2003 г. Симптомы регрессировали самостоятельно. Через год подобное состояние повторилось. Обратился к неврологу по месту жительства, установлен диагноз РС. Цереброспинальная форма. Стадия ухудшения. Легкие чувствительные нарушения. Атактический синдром. Проведен курс гормонотерапии. Затем обострения возникали не чаще, чем раз в 5 лет, были купированы курсами гормонотерапии. С 2010 принимает глатирамера ацетат. Неврологический статус на момент осмотра: острота зрения не снижена. Нистагма нет, легкая асимметрия лица. Сила конечностей 5 баллов. Сухожильные рефлексы D=S, оживлены с рук и ног, патологические симптомы Бабинского с обеих сторон. Легкая неустойчивость в позе Ромберга с закрытыми глазами, хождение по прямой линии нарушено, пальце-носовую и пяточно-коленную пробы с выполняет хорошо. Снижена вибрационная чувствительность в ногах. Тазовые функции сохранены. Пациент отмечает повышенную утомляемость. EDSS=2,5 балла.

Таблица 4.2

Исследуемые клинические показатели пациента К.

Показатель	Значения
EDSS	2,5
FS1 (зрительные функции)	0
FS2 (функции ствола мозга)	2
FS3 (пирамидные функции)	2
FS4 (мозжечковые функции)	2

FS5 (сенсорные функции)	1
FS6 (функции кишечника и мочевого пузыря)	0
FS7 (мыслительные функции)	0
FS8 (передвижение, ambulation score)	0
Ходьба на 25 футов (секунды)	4,05
9-ти луночный тест доминантной руки (секунды)	21,65
9-ти луночный тест недоминантной руки (секунды)	25,10
PASAT (ответы)	48
Тревога по шкале HADS (баллы)	8
Депрессия по шкале HADS (баллы)	6
Оценка утомляемости по FSS (баллы)	49
Качество жизни по шкале MSIS 29	45

МРТ головного мозга с контрастированием 03.10.2013 г. – демиелинизирующий процесс головного мозга, множественные очаги демиелинизации, активности процесса нет, очаги не накапливают контраст. МРТ головного мозга 14.06.2018 г. – демиелинизирующий процесс головного мозга, небольшая отрицательная динамика в сравнении с 3.10.2013 г., увеличение количества и размеров очагов демиелинизации, накопления контраста в очагах нет. Диагноз, форма, течение: РС. Цереброспинальная форма. Ремитирующее течение. Стадия ремиссии. Рефлекторный тетрапарез. Легкий атактический синдром. Легкие чувствительные нарушения. Легкие стволовые нарушения. Иммунологические показатели данного пациента представлены в табл. 4.4.

Таблица 4.4

Исследуемые иммунологические показатели пациента К

№	Показатель	Значения
1	IL-17, пг/мл	44,48

2	IL-10, пг/мл	25,15
3	BAFF, нг/мл	0,22
4	CXCL-13, пг/мл	21,65
5	Общий IgG, мг/мл	84,57

Показатели данного пациента демонстрируют следующие закономерности: снижение IL-10 у пациентов с РС, уменьшение выработки IL-17 при большом сроке заболевания.

При исследовании содержания клеток крови *in vivo* были выявлены следующие показатели (таб. 4.5).

Таблица 4.5

Исследуемые иммунологические показатели пациента К.

Показатель	Значения
В-клетки с способностью продуцировать IL-17, %	9,16
Th-17, %	3,02
Treg %	2,07

У пациента К. количество В-клеток со способностью продуцировать IL-17 и Th-17 клеток выше, чем у здоровых доноров, это показывает повышенную потенциальную способность иммунной системы пациента К. к выработке IL-17, что показано и для других пациентов с РС по сравнению с здоровыми донорами.

Таблица 4.6.

Исследования антигенпрезентирующей функции В-клеток пациента К

Показатель	Значения пациента
Th-17 в пробе без антигена, %	2,58
Th-17 в пробе с облигатным антигеном, %	2,25
Th-17 в пробе с MOG, %	3,16

Трег в пробе без антигена,%	1,70
Трег в пробе с облигатным антигеном,%	2,38
Трег в пробе с MOG,%	2,20

Этот пример иллюстрирует выявленные закономерности: у пациента К, как и других пациентов с РС, количество Th-17 возросло в ответ на стимуляцию ключевым аутоантигеном-MOG, в совместной культуре В-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РС является наиболее распространенным хроническим воспалительным, демиелинизирующим и нейродегенеративным расстройством ЦНС, поражающим молодых людей. Течение заболевания характеризуется длительной выживаемостью и возрастающей инвалидностью с течением времени, что является основной нагрузкой для пациента, его семьи и государства. Поэтому постоянно разрабатываются новые подходы к лечению РС. Тщательно исследуются патогенетические системы, участвующие в РС, чтобы определить их звенья дерегуляции и дисфункции, и разработать стратегии создания лекарств для целевого вмешательства. Одним из таких звеньев является провоспалительная Т-хелперная субпопуляция Th17, участие которой в патогенезе РС подтверждено многочисленными исследованиями как *in vivo*, так и *in vitro*. Другим важнейшим звеном являются В-лимфоциты. Роль В-клеток в патогенезе РС связана не столько с их способностью продуцировать антитела, сколько с альтернативными функциями этих клеток. За счет антигенпрезентирующей способности, а также продукции цитокинов, В-лимфоциты могут изменять микроокружение и промотировать воспаление в ЦНС. Известно, что В-клетки формируют эктопические лимфоидные фолликулоподобные образования, которые выявляются в мозге пациентов с РС. Понимание роли В-клеток в биологии РС представляет большие возможности для разработки эффективных методов лечения. Целью настоящей работы было исследовать взаимосвязь двух ключевых лимфоцитарных популяций - Th17 и В-лимфоцитов, при РС.

В частности, мы проанализировали у пациентов с РС уровень факторов, ассоциированных с миграцией и активностью клеток Th17 и В-лимфоцитов, проанализировали их связь с клиническими проявлениями и между собой, и в экспериментах *in vitro* оценили вклад В-лимфоцитов в продукцию IL-17 при РС.

Мы показали, что уровень провоспалительного цитокина IL-17 в сыворотке пациентов с РС без терапии существенно повышен по сравнению с таковым у здоровых доноров (хотя отличие и не является статистически значимым), и имеет обратную корреляцию с длительностью заболевания, что согласуется с рядом исследований, показывающих снижение роли воспалительных механизмов поражения ЦНС на поздних этапах заболевания [69]. Причем терапия как интерфероном, так и натализумабом, была ассоциирована со статистически значимым снижением сывороточной концентрации IL-17 по сравнению с пациентами без терапии – фактически, до уровня данного цитокина у здоровых доноров. Данные по натализумабу расходятся с исследованиями, согласно которым количество CD4 + Т-клеток, продуцирующих гамма-интерферон, фактор некроза опухоли и интерлейкин (IL) -17, увеличивалось через 6 месяцев после начала лечения натализумабом и оставалось повышенным на протяжении всего периода наблюдения[97].. Содержание противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке пациентов с РС без терапии, напротив, было статистически значимо ниже такового у здоровых доноров, что вполне закономерно и согласуется с данными других авторов [94,166], а на фоне терапии препаратами как первого, так и второго ряда этот показатель был сопоставим с уровнем IL-10 в отсутствие патологии. Тем не менее, у пациентов с РС уровень IL-10 имел прямую корреляцию с клиническими проявлениями заболевания. Этот феномен может быть связан с тем, что IL-10 продуцируется не только классической противовоспалительной Т-хелперной субпопуляцией Th2, но и является ключевым цитокином для Treg, задача которых предупредить избыточную активацию иммунной системы, и повышенная продукция данного цитокина в нашем случае может быть ответом на интенсивное воспаление.

Уровни факторов, ассоциированных с активацией В-лимфоцитов, BAFF и IgG, у пациентов с РС без терапии статистически значимо не отличались от соответствующих показателей у здоровых доноров, хотя концентрация В-клеточного активатора BAFF и была вдвое выше. В исследованиях уровни

BAFF были значительно выше у пациентов с РС по сравнению со здоровыми, но в то же время у стабильных пациентов на фоне лечения уровень BAFF в плазме выше, чем у пациентов без лечения [91]. По влиянию терапии первой линии, через 9–12 ч после введения интерферона β повышается количество BAFF в крови, который остается на уровне выше исходного без увеличения активности заболевания [14], а глатирамера ацетат подавляет BAFF [31]. При этом корреляционный анализ не выявил связи сывороточных уровней BAFF и IgG с клиническим и функциональным особенностями пациентов. В то же время, концентрация ключевого В-клеточного хемокина CXCL-13 у пациентов с РС без терапии была статистически значимо ниже таковой у здоровых доноров, а на фоне терапии препаратами как первой, так и второй линии, содержание данного хемокина был статистически значимо более высоким, на уровне соответствующих показателей у здоровых доноров. Интересно отметить, что, несмотря на пониженный уровень CXCL-13 у пациентов с РС, он имел прямую связь с клиническими и функциональными показателями – с показателем инвалидизации по EDSS, с нарушениями в функциональных системах: мозжечковой, тазовых органов и корковой, с качеством жизни по MSIS-29 и утомляемостью по FSS. CXCL-13 рассматривается как биомаркер активности при РС и других демиелинизирующих заболеваниях [21]. Однако в основном проводятся исследования содержания данного хемокина в ЦСЖ, а не в плазме крови. Одни исследования показывают, что уровни CXCL-13 в сыворотке крови и ЦСЖ имеют прямую связь с клиническими показателями [207], другие исследования указывают на отсутствие достоверной корреляции между этими показателями [165]. Наше исследование показывает, что содержание CXCL-13 в сыворотке, как и в ЦСЖ, коррелирует со многими характеристиками заболевания. А его пониженное содержание в крови пациентов связано, возможно, с повышенной утилизацией данного хемокина и, как следствие, с усиленной миграцией В-лимфоцитов в ЦНС.

Корреляционный анализ не выявил прямой связи между уровнями IL-17 и факторов, ассоциированных с активацией В-лимфоцитов, в крови пациентов с РС. Однако концентрации IL-17 и BAFF у пациентов с РС без терапии была почти вдвое выше, чем у здоровых доноров. Оценка содержания BAFF в сыворотке пациентов с РС при разных уровнях IL-17 показала, что высокий уровень IL-17 в сыворотке пациентов ассоциирован с повышенной концентрацией BAFF по сравнению с таковой у пациентов с низким уровнем IL-17. И наоборот, высокий уровень BAFF в сыворотке пациентов с РС был ассоциирован с повышенной концентрацией IL-17 по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с низким уровнем BAFF.

Исследования *in vitro* показали, что существует как минимум два механизма связи Т-хелперной субпопуляции Th17 и В-лимфоцитов при РС. Во-первых, В-лимфоциты пациентов с РС, выступая в качестве антигенпрезентирующих клеток, могут стимулировать дифференцировку наивных CD4⁺Т-лимфоцитов преимущественно в провоспалительные Th17. Во-вторых, В-клетки больных РС способны сами продуцировать провоспалительный цитокин IL-17.

Проведенное исследование выявило влияние терапии РС на содержание IL-17 в сыворотке крови пациентов. Терапия первой линии одинаково влияла на продукцию IL-17, приближая его концентрацию в сыворотке крови к значению здоровых доноров. Это, вероятно, связано с тем, что применяемая при РС патогенетическая терапия опосредованно через регуляцию Т-хелперов снижает выработку IL-17. У пациентов, принимавших натализумаб, было отмечено более выраженное снижение IL-17, чем у пациентов, получающих глатирамера ацетат, его значение при лечении натализумабом было даже ниже, чем у здоровых доноров, что отражает эффективность данного препарата в подавлении аутоиммунитета. Однако полученные в отношении натализумаба данные расходятся с исследованиями, в которых показывался обратный результат в отношении провоспалительных цитокинов, где описывалось их повышение при приеме натализумаба [97].

Было выявлено, что содержание IL-10 имеет прямую связь с клиническими проявлениями заболевания. Учитывая, что IL-10 является противовоспалительным цитокином, его связь с выраженностью заболевания, имеющего в основе нейровоспаление, выглядит не вполне закономерной, логичнее было бы ожидать обратную корреляцию IL-10 с выраженностью симптомов РС – такая связь действительно показана в целом ряде исследований [85]. Тем не менее, важно учитывать, что IL-10 продуцируется не только противовоспалительной Т-хелперной субпопуляцией Th2, но и является ключевым цитокином для Treg, а Treg активируются не только в ответ на определенные стимулы, они активируются на заключительном этапе любого иммунного ответа и подавляют этот ответ, предупреждая избыточную активацию иммунной системы, потенциально опасную для окружающих тканей. И чем интенсивнее иммунная реакция организма на антиген, тем интенсивнее противодействие, то есть формирование и функционирование Treg. Поэтому IL-10 часто рассматривается как негативный прогностический маркер при различных воспалительных заболеваниях. Возможно, аналогичный механизм имеет место и в нашем случае.

Глатирамера ацетат и натализумаб не нормализуют уровень этого противовоспалительного цитокина в сыворотке крови. В исследованиях описывается положительное действие глатирамера ацетата на продукцию IL-10 клетками Treg [166] и, наоборот, небольшое снижение продукции IL-10 при приеме натализумаба [94]. Пациенты, принимавшие интерферон β , имели высокий уровень IL-10 в сыворотке крови, существенно превышающий таковой у пациентов без терапии и практически не отличающийся от уровня здоровых добровольцев. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об увеличении синтеза IL-10 под действием препарата, что соответствует данным ряда исследований [173].

В исследовании не было обнаружено связи между терапией РС и содержанием факторов, участвующих в миграции и активации В-клеток –

CXCL-13 и BAFF. В других работах также было выявлено, что терапия первой линии не влияет на уровень CXCL-13 [62], а терапия натализумабом влияет только на уровень CXCL-13 в СМЖ [178]. Данные относительно уровней BAFF в сыворотке крови у пациентов с РС противоречивы, и значительная разница концентрации этого цитокина в сыворотке крови между пациентами с РС и здоровыми донорами не всегда демонстрировалась [91]. Krumbholz с соавт. [103] сообщили о сравнимых концентрациях BAFF в сыворотке у нелеченных пациентов с РС и здоровых доноров, а лечение с помощью интерферона- β приводило к уменьшению уровня BAFF в крови. В других исследованиях сообщалось, что лечение интерфероном- β было связано с более высокими уровнями BAFF в сыворотке [200]. Было показано, что Глатирамера ацетат подавляет фактор выживания В-клеток BAFF и пролиферативно-индуцирующий лиганд (APRIL), потенциально приводя к апоптозу аутореактивных В-клеток [31]. О влиянии Натализумаба на содержание BAFF в сыворотке крови сведений в литературе нет, но показано, что в СМЖ уровень BAFF снижается [204].

Исследование общего IgG не выявило разницы между содержанием его в сыворотке пациентов с РС и здоровых доноров, хотя в литературе описывается повышение этого показателя при РС [6]. Различия по исследуемому показателю найдены только между группами, получавшими натализумаб и глатирамера ацетат. В первой группе концентрация IgG в сыворотке была ниже, чем во второй. Вероятно это связано с тем, что Натализумаб препятствует циркуляции В-клеток, что может привести к нарушению дифференцировки в плазматические клетки и, как следствие, нарушению синтеза иммуноглобулина [180].

CXCL-13 рассматривается как биомаркер активности воспаления при РС и других демиелинизирующих заболеваниях [21]. Однако в основном проводятся исследования содержания данного хемокина в ЦСЖ, а не в сыворотке крови. Одни исследования показывают, что уровни CXCL-13 в сыворотке крови и ЦСЖ имеют прямую зависимость [207], другие -

указывают на отсутствие достоверной корреляции между этими показателями [165].

Уровень CXCL-13 в крови был связан с клиническим состоянием пациентов, что соответствует подобным исследованиям, проведенным на СМЖ, указывающим на связь CXCL-13 и EDSS [21]. О связи CXCL-13 с функциональным состоянием пациентов, установленной данным исследованием, в литературе сведений нет. В то же время, можно предположить, что если снижение содержания В-клеток улучшает функциональное состояние, то и уровень CXCL-13 косвенно влияет на реализацию функциональных тестов [116].

Согласно некоторым литературным данным, презентация антигена В-клетками может вызывать анергию Т-лимфоцитов [50] или их дифференцировку в регуляторные Т-клетки [143]. Однако эти эффекты не объясняют неоднократно показанную отрицательную роль В-лимфоцитов в развитии РС [76,128], которая не связана с продукцией аутоантител и обеспечивается альтернативными функциями В-клеток, в первую очередь - антигенпрезентирующей [108]. Кроме того, недавние исследования развития ЕАЕ продемонстрировали способность инфильтрирующих ЦНС В-лимфоцитов индуцировать преимущественное развитие провоспалительных субпопуляций Т-хелперов - Th1 и Th17 [168]. В-клеточная дифференцировка Th17, представленная в нашем исследовании в ответ на ключевой аутоантиген, связанный с рассеянным склерозом, вписывается в эту концепцию.

Доказана, способность В-лимфоцитов продуцировать IL-17 в ответ на внеклеточный патоген *Trypanosoma cruzi* in vivo и на его транссиалидазу in vitro [33], а также в случае прямой активации Toll-подобных рецепторов на В-клеточной мембране [18]. Интересно, что ROR γ t не участвует в реализации этого эффекта в ответ на инфекцию, как в клетках Th17 [33]. Мы показали еще одну ситуацию, когда В-лимфоциты могут продуцировать IL-17 и, как следствие, аутоиммунную патологию.

В целом, исследования показали, что В-лимфоциты могут вносить вклад в выработку IL-17 при рассеянном склерозе двумя путями: индуцируя дифференцировку Т-лимфоцитов, высвобождающих этот цитокин, а также посредством собственного синтеза IL-17 (рис. 17). Учитывая, что IL-17 играет важную роль в патогенезе рассеянного склероза [45], выявленные эффекты могут стать новым механизмом развития заболевания.

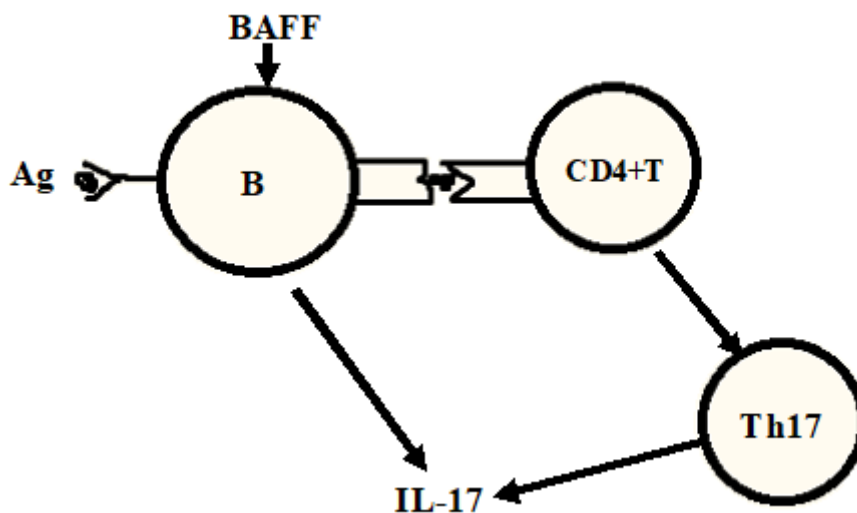


Рис. 17. Потенциальные механизмы участия В-лимфоцитов в продукции IL-17 при РС.

ВЫВОДЫ

1. Содержание провоспалительного цитокина IL-17 в крови пациентов с РС достоверно повышено на ранних этапах заболевания до достижения выраженности неврологического дефицита 2 баллов по EDSS, а затем последовательно снижается. Концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке пациентов с РС, значительно ниже такового у здоровых доноров, но при этом имеет прямую связь с клиническими проявлениями заболевания.

2. Уровни факторов, ассоциированных с активацией В-лимфоцитов, BAFF и IgG, у пациентов с РС, сопоставимы с соответствующими показателями у здоровых доноров, тогда как концентрация ключевого В-клеточного хемокина CXCL-13 у пациентов с РС, существенно ниже нормы и прямо коррелирует с клиническими и функциональными показателями.

3. Терапия препаратами как первого, так и второго ряда, сопровождается нормализацией уровня факторов, ассоциированных с активностью Th17/Treg и В-лимфоцитов, у пациентов с РС: снижением сывороточной концентрации провоспалительного цитокина IL-17 (интерферон-, натализумаб), повышением концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 (все препараты), увеличением содержания В-клеточного хемокина CXCL-13 (все препараты) – фактически, до уровня соответствующих показателей у здоровых доноров.

4. Высокие концентрации IL-17 и В-клеточного активатора BAFF у пациентов с РС сопряжены друг с другом.

5. Антигенпрезентирующие функции В-лимфоцитов пациентов с РС отличны от таковых у здоровых доноров. Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на экзоантиген, представленный В-клетками, эффективнее аналогичного ответа в контрольной группе. Т-хелперная дифференцировка также имеет особенности: В-зависимая презентация аутоантигена у пациентов с РС, в отличие от здоровых доноров, индуцирует преимущественное развитие наивных Т-лимфоцитов в Th17, но не влияет на

дифференцировку Treg, сдвигая баланс Th17/Treg в направлении Th17 и внося вклад в продукцию IL-17 при РС.

6. В-лимфоциты способны сами продуцировать IL-17, причем В-клетки пациентов с РС делают это значительно более эффективно, что также вносит вклад в общую продукцию данного цитокина при РС.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Цитокины IL-17 и CXCL-13 могут быть использованы в качестве биомаркеров, но не для установления диагноза. IL-17 возможно использовать для оценки эффективности лечения, а CXCL-13 для оценки тяжести заболевания.

2. Для лечения пациентов с РС более эффективны препараты второй линии, поэтому в терапии пациентов с активным течением предпочтительно использовать индукционные методы лечения, сутью которых является назначение в дебюте заболевания препаратов второй линии, а после стабилизации течения заболевания - переход на препараты первой линии как более безопасные.

3. Для разработки новых препаратов рекомендовано обратить внимание на такие точки приложения как В-клетки и Th17-лимфоциты. Расширение спектра препаратов, а особенно препаратов точечного действия, позволит подходить к лечению пациентов с РС более персонализированно

ЛИТЕРАТУРА

1. Акинцева Ю.В, Трушников Т.Н., Байдина Т.В. Влияние синдрома усталости на качество жизни больных рассеянным склерозом.// Неврологический вестник. Журнал им. В.М. Бехтерева. 2010. №. 17(1). С. 132
2. Байдина Т.В., Куклина Е.М., Трушников Т.Н. Патогенетические и клинические особенности рассеянного склероза// Пермский медицинский журнал. 2016. Т. 33. № 4. С. 17-22.
3. Беркович Р.Р., Тотолян Н.А., Соколов А.Ю. Лечение обострений рассеянного склероза (обзор).// Журнал Неврологии и Психиатрии. 2013. № 10(2). С. 73-75.
4. Бойко А.Н., Гусев Е.И. Современные алгоритмы диагностики и лечения рассеянного склероза, основанные на индивидуальной оценке состояния пациента.// Журнал Неврологии и Психиатрии им. С.С. Корсакова . 2017, Том: 117. (2-2). С. 92-106.
5. Иллариошкин С.Н. Жан-мартен Шарко - основоположник современной клинической неврологии // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2016. №4. С. 67-74.
6. Кильдюшевский А. В., Бородин А. В., Молочков А. В. Трансимунизация в лечении рассеянного склероза // Альманах клинической медицины. 2015. №39.С.121-127.
7. Кравченко П.Н. Олейник Е.К. Механизмы нарушения иммунологической толерантности. // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. 2015. №12.С. 3-22.
8. Кузьмичев Д.Е., Скребов Р.В., Вильцев И.М. Некоторые морфологические особенности постмортальной диагностики рассеянного склероза // Здоровоохранение Югры: опыт и инновации. 2018. №4. С. 27-29.
9. Куклина Е.М., Байдина Т.В., Данченко И.Ю. Семафорин Sema4D в иммунной системе при рассеянном склерозе.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. №. 157. (2). С. 198-201.

10. Лорина Л.В., Буршинов А.О. Актуальные вопросы этиопатогенеза, клиники, диагностики и лечения рассеянного склероза (обзор литературы и собственные данные) // Рос.мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2017. №2. С 316-327.
11. Пажигова З.Б., Карпов С.М., Шевченко П.П. Распространенность рассеянного склероза в мире (обзорная статья).// Международный журнал экспериментального образования. 2014. № 1(2). С. 78-82.
12. Прожерина Ю.Н. Рассеянный склероз: история, диагностика, лечение.// Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2016. №7-8. С. 21-25.
13. Смулевич А.Б. Депрессии в общей медицине. Руководство для врачей. // Медицинское информационное агентство. 2001 . С. 782
14. Фотеева А.В., Байдина Т.В., Мишланов В.Ю. Диагностическое значение цитокинов сыворотки крови у больных с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза.// Российский аллергологический журнал. 2008. № 1. С. 2
15. Шевченко П.П., Карпов С.М., Рзаева О.А. Рассеянный склероз: этиопатогенез с позиции современной науки. // Успехи современного естествознания. 2014. № 6 . С. 123-124.
16. Abraira V., Alvarez-Cermeño J.C., Arroyo R. Utility of oligoclonal IgG band detection for MS diagnosis in daily clinical practice.// J Immunol Methods. 2011. Vol. 371(1-2). P.170-173
17. Adjobimey T., Satoguina J., Oldenburg J. Co-activation through TLR4 and TLR9 but not TLR2 skews Treg-mediated modulation of Igs and induces IL-17 secretion in Treg: B cell co-cultures.// Innate immunity. 2013. Vol.20 (1).P. 12-23
18. Agrawal S., Gupta S. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors.// J. Clin. Immunol. 2011.Vol. 31. P.89-98.
19. Almuklass A.M., Price R.C., Gould J.R. Force steadiness as a predictor of

time to complete a pegboard test of dexterity in young men and women.// Journal of Applied Physiology.2016 . Vol. 120(12). P.1410-1417.

20. Alvarez J. I., Cayrol R., Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis //Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2011. Vol 1812 (2).P. 252-264.

21. Alvarez E., Piccio L., Mikesell R. J. CXCL13 is a biomarker of inflammation in multiple sclerosis, neuromyelitisoptica, and other neurological conditions. // MultipleSclerosisJournal. 2013. Vol.19(9), P.1204–1208.

22. Amrouche K., Pers J.O., Jamin C. Glatiramer Acetate Stimulates Regulatory B Cell Functions // The Journal of Immunology. 2019.Vol.202(7).P. 1970–1980

23. Annunziato F. ,Cosmi L. , Liotta F. Human T helpertype 1 dichotomy: origin, phenotypeandbiologicalactivities.// Immunology. 2015. Vol. 144. P. 343-351.

24. Arnon R., Aharoni R., Glatiramer Acetate: From Bench to Bed and Back.// Translational Neuroimmunology in Multiple Sclerosis. 2016. Ch. 15. P. 203-215.

25. Arnon K., Abraham M., Monsonogo A. Innate Immunity in Multiple Sclerosis: Myeloid Dendritic Cells in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Are Activated and Drive a Proinflammatory Immune Response.// The Journal of Immunology. 2006. Vol 177 (6). P. 4196-4202.

26. Ascherio A, Munger K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Non infectious factors.//Ann Neurol. 2007. Vol. 61(6). P. 504–513

27. Ascherio A., Munger K. L., White R. Vitamin D as an Early Predictor of Multiple Sclerosis Activity and Progression.// JAMA Neurol. 2014. Vol. 71(3). P. 306-314

28. Bando Y., Nomura T., Bochimoto H. Abnormal morphology of myelin and axon pathology in murine models of multiple sclerosis.// Neurochemistry International. 2015. Vol. 81, P. 16-27.

29. Barkhof F., Brück W., DeGroot C.J.A. Remyelinated Lesions in Multiple Sclerosis Magnetic Resonance Image Appearance. // ArchNeurol. 2003.

Vol.60(8). P.1073–1081.

30. Bar-Or A., Fawaz L., Fan B. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?// *Ann Neurol.* 2010. Vol. 67.P. 452-461.

31. Begum-Haque S., Sharma A., Christy M. Increased expression of B cell-associated regulatory cytokines by glatiramer acetate in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.// *J Neuroimmunol.* 2010. Vol. 219. P.47–53.

32. Beringer A., Noack M., Miossec P.IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting.// *Trends in Molecular Medicine.*2016.Vol.22(3). P. 230-241.

33. Bermejo S.W., Jackson M., Gorosito-Serran E.V. Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells.// *Nat. Immunol.* 2013. Vol. 14. P. 514-522.

34. Bjartmar C., Trapp B.D. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences.// *Current Opinion in Neurology.* 2001. Vol. 14 (3). P. 271-278.

35. Blauth K., Owens G. P., Bennett J.L.The Ins and Outs of B Cells in Multiple Sclerosis.// *Frontiers in Immunology.* 2015. Vol. 6. P. 565-570.

36. Bogie J. F., Piet S.J., Hendriks J.A. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. // *ActaNeuropathologica.* 2014. Vol. 128(2). P. 191-213.

37. Bohannon R. W. Comfortable and maximum walking speed of adults aged 20—79 years: reference values and determinants. // *Age and Ageing.* 1997. Vol. 26(1), P. 15–19.

38. Braley-Mullen H., Shiguang Y. Early Requirement for B Cells for Development of Spontaneous Autoimmune Thyroiditis in NOD.H-2h4 Mice.// *The Journal of Immunology .* 2000. Vol. 165 (12) . P. 7262-7269.

39. Buckner J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases.// *NatureReviewsImmunology.* 2010. Vol. 10. P. 849–859

40. Butterworth S.E., Ingram G.,Robertson N.P. Advances in biomarker

research in multiple sclerosis.// *Journal of Neurology*. 2016. Vol. 263(3). P. 621–623.

41. Calabresi P.A., Kieseier B.C., Arnold D.L. ADVANCE Study Investigators . Pegylated interferon β -1a for relapsing–remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study. // *Lancet Neurol*. 2014. Vol. 13(7). P. 657–665.

42. Cardona A.E., Li M., Liu L. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. // *J. Leukoc. Biol*. 2008. Vol.84(3). P.587-594.

43. Cayrol R., Wosik K., Berard J.L. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. // *Nat Immunol*. 2008. Vol. 9(2). P.137–145.

44. Chastainab E.M.L.,Duncanab A.S, Rodgersab J.M. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis.// *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2011.Vol. 1812(2). P. 265-274.

45. ChenM. S. Transcription factors and Th17 cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis.// *Crit. Rev. Immunol*. 2013. Vol. 33. P. 165-182.

46. Chen M., Lin X., Liu Y. The function of BAFF on T helper cells in autoimmunity.// *Cytokine & growth factor reviews*. 2014. Vol. 25(3). P. 301–305.

47. Costantino C. M., Baecher-Allan C., Hafler D. A. Multiple sclerosis and regulatory T cells.// *Journal of clinical immunology*. 2008. Vol. 28(6). P. 697–706.

48. Coyle P. K. Early treatment of multiple sclerosis to prevent neurologic damage.// *Neurology*. 2008. Vol. 71 (24 suppl 3). P. 3–7.

49. Cusick M. F., Libbey J. E., Fujinami R. S. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease.// *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2012. Vol. 42(1). P. 102

50. Dalai S.K., Mirshahidi S., Morrot A. Anergy in memory CD4+T cells is induced by B cells. // *J. Immunol*. 2008. Vol. 181. P. 3221-3231.

51. Darlington P. J., Touil T., Doucet J. S. Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation.// *Annals of neurology*. 2013. Vol. 73(3). P. 341–354.
52. Davis S., Huang J. Interleukin 4-induced protein 1 as a biomarker and treatment option in multiple sclerosis.// *Journal of Clinical and Translational Science*. 2017. Vol. 21091. P. 1-2.
53. De Laere M., Berneman Z. N., Cools N. To the Brain and Back: Migratory Paths of Dendritic Cells in Multiple Sclerosis.// *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2018.Vol.77(3). P.178-192.
54. De Lorenze G.N., Munger K.L., Lennette E.T. Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis Evidence of Association From a ProspectiveStudyWithLong-termFollow-up.// *ArchNeurol*. 2006. Vol. 63(6). P. 839–844.
55. Dendrou C. A., Fugger L. Friese M. A. Immunopathology of multiple sclerosis.// *Nature Reviews Immunology*. 2015. Vol. 15. P. 545–558.
56. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis.// *Neurology*. 2010. Vol. 74(1). P.17-24
57. Dinarello C. A. Proinflammatory Cytokines.// *Chest*. 2000. Vol. 118(2). P. 503-508..
58. Dobson R., Ramagopalan S., Davis A. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude.// *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2013. Vol. 84(8). P. 909–914.
59. Duncan G. J., Plemel J. R., Assinck P. Myelin regulatory factor drives remyelination in multiple sclerosis.// *Acta Neuropathologica*. 2017. Vol. 134(3). P. 403- 422
60. Dutta R., Trapp B.D. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis.// *Neurology*. 2007. Vol. 68 . P. 22-31
61. Ernstsson O., Gyllensten H., Alexanderson K. Cost of Illness of Multiple Sclerosis - A Systematic Review.// *PloS one*. 2016. Vol.11(7). P. 129-159.
62. Festa E. D., Hankiewicz K., Kim S. Serum levels of CXCL13 are elevated

in active multiple sclerosis.// Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England). 2009.Vol.15(11). P. 1271–1279.

63. Fletcher J. M., Lonergan R., Costelloe L. CD39+Foxp3+ Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis.// The Journal of Immunology. 2009. Vol 183(11). P. 7602-7610.

64. Franklin R. J. M. Why does remyelination fail in multiple sclerosis?// Nature Reviews Neuroscience. 2007. Vol. 3. P. 705–714.

65. Frischer J. M., Bramow S., Dal-Bianco A. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains.// Brain. 2009.Vol. 132(5). P. 1175–1189

66. Malgorzata G. A., Fish A., Celie P. Neefjes J. Peptide selection by MHC class I molecules.// Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. Vol. 112 (5). P. 1505-1510.

67. Gavalas E., Kountouras J., Boziki M. Relationship between Helicobacter pylori infection and multiple sclerosis.// Annals of gastroenterology. 2015. Vol. 28(3). P.353–356.

68. Ghorbani A., Salari M., Shaygannejad V. The Role of Melatonin in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: A Case-Control Study.// International Journal of Preventive Medicine. 2013. Vol.4(2). P.180-184

69. Giovannoni G., Miller D., Losseff N.M. Serum inflammatory markers and clinical/MRI markers of disease progression in multiple sclerosis.// J Neurol . 2001. Vol.248. P. 487-495.

70. Goldmann T., Wieghofer P., Jordão M. J. C. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces.// Nature Immunology. 2016. Vol. 17. P. 797–805

71. Goodnow C. C., Sprent J., Fazekas de StGroth B. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity.// Nature. 2005. Vol. 435. P. 590–597.

72. Grakoui A., Bromley S. K., Sumen C. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation.// Science.1999 .

Vol.285(5425). P.221-227

73. Harp C.T., Ireland S., Davis L. S. Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4+ T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein.// *Eur. J. Immunol.* 2010. Vol. 40(10). P. 2942–2956

74. Harpa C.T., Lovett-Rackeb A.E., Rackec M.K. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis.// *Clinical Immunology.* 2008. Vol. 128(3). P. 382-391.

75. Haugen M., Frederiksen J.L., Degn M. B cell follicle-like structures in multiple sclerosis—With focus on the role of B cell activating factor.// *Journal of Neuroimmunology.* 2014. Vol. 273 (1). P.1 – 7.

76. Hauser S.L., Waubant E., Arnold D.L. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis.// *N. Engl. J. Med.* 2008. Vol. 358. P.676–688.

77. Havrdová E.A., Belova A., Goloborodko A. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study.// *J. Neurol.* 2016. Vol.263. P. 1287-1295.

78. Hedegaard C.J., Sellebjerg F., Krakauer M. Interferon-beta increases systemic BAFF levels in multiple sclerosis without increasing autoantibody production.// *Mult Scler.* 2011.Vol. 17. P. 567–577.

79. Hobart J., Lamping D., Fitzpatrick R. The Multiple Sclerosis Impact Scale (MSIS-29): a newpatient-based outcome measure.// *Brain.* 2001 .Vol.124(5). P.962-973.

80. Hogeboom C. Peptide motif analysis predicts lymphocytic choriomeningitis virus as trigger for multiple sclerosis.// *Molecular Immunology.* 2015. Vol. 67(2B). P. 625-635.

81. Housley W. J., Pitt D., Hafler D. A. Biomarkers in multiple sclerosis.// *Clinical Immunology.* 2015. Vol.161(1). P. 51-58.

82. Huan J., Culbertson N., Spencer L. Decreased FOXP3 levels in multiple

sclerosis patients. // *J. Neurosci. Res.* 2005. Vol.81. P. 45-52.

83. Huntington N. D., Tomioka R., Clavarino C. A BAFF antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting cell-mediated and humoral immune responses. // *International immunology.* 2006. Vol.18(10). P. 1473–1485.

84. Hyun Y.M., Lefort C.T., Kim M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. // *Immunol Res.* 2009. Vol. 45. P.195–208.

85. Ireland S. J., Guzman A. A., O'Brien D. E. The effect of glatiramer acetate therapy on functional properties of B cells from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis.// *JAMA neurology.* 2014. Vol.71(11). P.1421–1428.

86. Ivanov I.I., McKenzie B.S., Zhou L. The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.// *Cell.* 2006. Vol.126(6). P.1121-1233.

87. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 Cell, the New Player of Neuroinflammatory Process in Multiple Sclerosis. // *Scandinavian Journal of Immunology.* 2011. Vol. 74. P. 1-13.

88. Jamshidian A., Shaygannejad V., Pourazar A. Biased Treg/Th17 balance away from regulatory toward inflammatory phenotype in relapsed multiple sclerosis and its correlation with severity of symptoms.// *Journal of Neuroimmunology.* 2013. Vol. 262(1–2). P. 106-112.

89. Janson P.C.J., Winerdal M.E., Marits P. FOXP3 Promoter Demethylation Reveals the Committed Treg Population in Humans.// *PLoS ONE.* 2008. Vol.3(2) . P.12-16.

90. Janssens K., Slaets H., Hellings N. Immunomodulatory properties of the IL-6 cytokine family in multiple sclerosis.// *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2015. Vol.1351. P. 52-60.

91. Kannel K., Alnek K., Vahter L. Changes in Blood B Cell-Activating Factor (BAFF) Levels in Multiple Sclerosis: A Sign of Treatment Outcome. // *PLoS ONE.* 2015. Vol.10(11): P.143-193.

92. Kaskow B. J., Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis.//

Cold Spring Harb Perspect Med. 2018. Vol.8(4), P.25-29.

93. Kenneth L. R., Reits E., Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules.// *Trends in Immunology*. 2016. Vol. 37(11). P. 724-737.

94. Kimura K., Nakamura M., Sato W. Disrupted balance of T cells under natalizumab treatment in multiple sclerosis.// *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* . 2016. Vol. 3 (2) P.2-10.

95. Kingwell, E., van der Kop M., Zhao Y. Relative mortality and survival in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada.// *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2012. Vol.83(1).P. 61–66.

96. Kivisäkk P., Mahad D. J., Callahan M. K. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin.// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. Vol.100(14). P. 8389–8394.

97. Kivisäkk B. C., Healy V. Viglietta F. J. Natalizumab treatment is associated with peripheral sequestration of proinflammatory T cells. // *Neurology*. 2009. Vol. 72 (22). P.1922-1930.

98. Kleinewietfeld M., Hafler D. A. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity.// *Seminars in Immunology*. 2013. Vol. 25(4). P. 305-312.

99. Klimatcheva E., Pandina T., Reilly C. CXCL13 antibody for the treatment of autoimmune disorders.// *BMC Immunology*. 2015. Vol.16(1). P.1-6

100. Komiyama Y., Nakae S., Matsuki T. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.// *J. Immunol*. 2006. Vol. 177. P. 566- 573

101. Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis.// *Journal of Neurology*. 2008. Vol. 255(6). P. 2.

102. Kroemer G., Martínez-A C. The fail-safe paradigm of immunological self-tolerance.// *The Lancet*. 1991. Vol. 338(8777). P. 1246-1249.

103. Krumbholz M., Faber H., Steinmeyer F. Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity.// *Brain* :

a journal of neurology. 2008. Vol.131(6). P. 1455–1463.

104. Krumbholz M., Theil D., Cepok S. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain : a journal of neurology*. 2006. P.129(1). P. 200–211.

105. Krumbholz M., Theil D., Derfuss T. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma.// *J Exp Med*. 2005. Vol. 201. P. 195–200.

106. Krupp L. B., LaRocca N. G., Muir-Nash J. The fatigue severity scale: application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus.// *Archives of Neurology*. 1989. Vol. 46 . P. 1121–1123.

107. Kuerten S., Jackson L. J., Kaye J. Impact of Glatiramer Acetate on B Cell-Mediated Pathogenesis of Multiple Sclerosis.// *CNS drugs*. 2018. Vol. 32(11). P. 1039–1051.

108. Kuhle J., Pohl C., Mehling M.. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis.// *N. Engl. J. Med*. 2007. Vol.356. P. 371–378.

109. Kurtzke J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis.// *Neurology*. 1983. Vol. 33 (11) P. 1444-1452.

110. Kuwabara T., Ishikawa F., Kondo M. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases.// *Mediators of Inflammation* 2017. Vol. 2017. P.1-11 .

111. Lalmohamed A., Bazelier M. T., Van Staa T. P. Causes of death in patients with multiple sclerosis and matched referent subjects: a population-based cohort study.// *European journal of neurology*. 2012. Vol.19(7). P. 1007–1014.

112. Laroche C., Uphaus T., Prat A. Secondary Progression in Multiple Sclerosis. Neuronal Exhaustion or Distinct Pathology?// *Trends in Neurosciences*. 2016. Vol. 39(5). P. 325-339.

113. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts.// *Brain Pathol*. 2005. Vol. 15. P. 217

114. Lassmann H. Multiplesclerosis: Is there neurodegeneration

independent from inflammation?// Journal of the Neurological Sciences. 2007. Vol. 259(1-2). P. 3–6

115. Lee P.W., Severin M. E., Lovett-Racke A. E. TGF- β regulation of encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis.// Eur. J. Immunol. 2017. Vol. 47. P. 446-453.

116. Lehmann-Horn, K., Kronsbein, H. C., Weber, M. S. Targeting B cells in the treatment of multiple sclerosis: recent advances and remaining challenges.// Therapeutic advances in neurological disorders. 2013. Vol. 6(3). P. 161–173.

117. Lei H., Yang J., Wang X. Th17 Cells in autoimmune diseases. //Front. Med. 2015. Vol. 9(1). P. 10–19

118. Leray E., Vukusic S., Debouverie M. Excess Mortality in Patients with Multiple Sclerosis Starts at 20 Years from Clinical Onset: Data from a Large-Scale French Observational Study.// PloS one. 2015. Vol. 10(7). P. 1-13.

119. Leray E., Moreau T., Fromont A. Epidemiology of multiple sclerosis.//Revue Neurologique. 2016. Vol. 172 (1). P. 3-13.

120. Levin L. I., Munger K. L., O'Reilly E. J. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. 2010. Vol. 67(6). P. 824–830.

121. Londoño A. C., Mora C. A. Role of CXCL13 in the formation of the meningeal tertiary lymphoid organ in multiple sclerosis. // F1000Research. 2018. Vol. 7. P. 514.

122. Lovett-Racke A. E., Michael K. R. Chapter 5 - Role of IL-12/IL-23 in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. //Neuroinflammation (Second Edition), Academic Press. 2018. P. 115-139.

123. Louveau A., Smirnov I., Keyes T. J. Structural and functional features of central nervous system lymphatics.// Nature. 2015. Vol. 523(7560). P. 337-341

124. Lublin F.D., Baier M., Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis.// Neurology. 2003. Vol. 61. P. 1528-1532.

125. Mackay F., Gommerman J. L. Chapter 15 - The Role of the BAFF

and Lymphotoxin Pathways in B Cell Biology. //Molecular Biology of B Cells (Second Edition). Academic Press. 2015. P. 251-276.

126. Maddur M. S., Miossec P., Kaveri S. V. Th17 Cells: Biology, Pathogenesis of Autoimmune and Inflammatory Diseases, and Therapeutic Strategies. // The American Journal of Pathology. 2012. Vol.181(1). P. 8-18.

127. Magliozzi R., Howell O. W., Nicholas R. Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis.// AnnNeurol. 2018. Vol. 83(4). P. 739-755.

128. Magliozzi R, Howell O., Vora A. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology.// Brain. 2007. Vol. 130. P.1089–1104

129. Magliozzi R., Columba-Cabezas S., Serafini B. Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis.// Journal of neuroimmunology. 2004. Vol. 148(1-2). P. 11–23.

130. Man S., Ubogu E.E., Ransohoff R.M. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale.// Brain Pathol. 2007. Vol. 17. P. 243

131. Matuszevicius D., Kivisäkk P., He B. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis.// Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England). 1999. Vol.5(2). P. 101–104.

132. McGeachy M.J., Bak-Jensen K.S., Chen Y. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology.// Nat. Immunol. 2007. Vol.8. P. 1390–1397.

133. McGinley M. P., Moss B. P. , Cohen J. A. Safety of monoclonal antibodies for the treatment of multiple sclerosis.// Expert Opinion on Drug Safety. 2017. Vol. 16(1). P. 89-100.

134. McQuaid S., Cunnea P., McMahon J. The effects of blood–brain

barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis.// *Biochem. Soc. Trans.* 2009. Vol.37. P. 329

135. Mellergård J., Edström M., Vrethem M. Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid.// *MultipleSclerosisJournal* . 2010. Vol 16(2). P. 208 – 217.

136. Meyer-Moock S., ShanFeng Y., Maeurer M. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis .// *BMC Neurology*. 2014. Vol. 14(1). P. 1.

137. Mikol D., Barkhof F., Chang P. Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial.// *TheLancetNeurology*. 2008. Vol. 7 (10). P. 903-914

138. Miller D., Barkhof F., Montalban X. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis.// *The Lancet Neurology*. 2005. Vol. 4(5), P. 281-288.

139. Mitsdoerffer M., Lee Y., Jäger A. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers.// *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. Vol. 107(32). P. 14292-14297.

140. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U., Weber M.S. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies.// *JExpMed*. 2013. Vol. 210(13). P. 2921-2937.

141. Montalban M., Tintoré M., Swanton J. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes X.// *Neurology* . 2010. Vol.74 (5) . P. 427-434.

142. Montalban M., Xavier R.A. Disease-modifying therapy in multiple sclerosis: Two guidelines (almost) passing in the night.// *Multiple Sclerosis Journal*. 2018. Vol. 24(5). P. 558 – 562

143. Morlacchi S., Soldani C., Viola A. Self-antigen presentation by mouse B cells results in regulatory T-cell induction rather than anergy or clonal deletion.// *Blood*. 2011. Vol. 118 . P. 984-991.
144. Muratori L., Martin E., Fafard L. Multiple Sclerosis, EDSS and Gait: Putting Legs That Work on a Walking Scale.// *Neurology*. 2016. Vol. 86 (16). P2-126.
145. Murphy K.M., Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in face of changing circumstances.// *Nat Immunol*. 2010. Vol. 11. P. 674–680.
146. Murray P.J. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response.// *Curr Opin Pharmacol*. 2006. Vol.6. P.379–386.
147. Neuhaus O., Farina C., Wekerle H. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis.// *Neurology* . 2001. Vol. 56 (6). P. 702-708.
148. Obermeier B., Lovato L., Mentele R. Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. // *Journal of neuroimmunology*. 2011. Vol. 233(1-2). P. 245-248.
149. Obermeier B., Mentele R., Malotka J. Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis.// *Nature Medicine*. 2008.Vol. 14. P.688–693.
150. Ontaneda D., Thompson A. J., Fox R. J. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. // *The Lancet*. 2017. Vol. 389(10076). P. 1357-1366.
151. Orthmann-Murphy J., Calabresi P. Therapeutic Application of Monoclonal Antibodies in Multiple Sclerosis.// *Clin. Pharmacol. Ther.* 2017. Vol.101. P. 52-64.
152. Ortiz G. G., Pacheco-Moisés F. P., Macías-Islas M. Á. Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. // *Archives of medical research*. 2014. P.45(8). P. 687–697.

153. Ozakbas S., Cagiran I., Ormeci B. Correlations between multiple sclerosis functional composite, expanded disability status scale and health-related quality of life during and after treatment of relapses in patients with multiple sclerosis.// *Journal of the neurological sciences*. 2004. Vol.218(1-2). P. 3–7.
154. Palmer E. Negative selection — clearing out the bad apples from the T-cell repertoire.// *Nature Reviews Immunology*. 2003. Vol. 3, P. 383–391.
155. Patakas A., Benson R. A., Withers D. R. Th17 effector cells support B cell responses outside of germinal centres.// *PloS one*. 2012. Vol.7(11). P.1-14.
156. Peters A., Pitcher L. A., Sullivan J. M. Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation.// *Immunity*. 2011. Vol. 35(6). P. 986–996.
157. Peterson L.K., Fujinami R. S. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis.// *Journal of Neuroimmunology*. 2007. Vol. 184(1-2), P. 37–44
158. Pierson E.R., Stromnes I.M., Goverman J.M. B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system// *J. Immunol*. 2014. Vol. 192 . P.929–939.
159. Pohl D., Krone B., Rostasy K. High seroprevalence of Epstein–Barr virus in children with multiple sclerosis.// *Neurology*. 2006. Vol. 67 (11). P. 2063-2065.
160. Polman, C. H., Reingold S. C., Banwell B. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria.// *Ann Neurol*. 2011. Vol. 69. P. 292-302.
161. Polman C.H., Rudick R.A. The multiple sclerosis functional composite: a clinically meaningful measure of disability. *Neurology*. 2010. Vol.74(3). P.8-15.
162. Pope B. J., Sharma V., Boland M. IL-2 enhances IFN γ signals in subpopulations of T and B lymphocytes from treatment naive relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) patients.// *J Immunol*. 2018. Vol. 200 (1). P.16-43.

163. Pröbstel A.-K. , Sanderson N. S., Derfuss T. B Cells and Autoantibodies in Multiple Sclerosis.// *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16(7). P. 16576-16592
164. Prod'homme T., Zamvil S. S. The Evolving Mechanisms of Action of Glatiramer Acetate.// *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019. Vol. 9(2). P. 29-49.
165. Puthenparampil M., Federle L., Mian S. BAFF Index and CXCL13 levels in the cerebrospinal fluid associate respectively with intrathecal IgG synthesis and cortical atrophy in multiple sclerosis at clinical onset.// *Journal of neuroinflammation.* 2017. Vol.14(1). P.1- 11.
166. Putheti P., Soderstrom M., Link H. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25high T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis.//*Journal of Neuroimmunology.* 2003.Vol. 144(1–2). P. 125-131.
167. Ragheb S., Li Y., Simon K. Multiplesclerosis: BAFF and CXCL13 in cerebrospinal fluid.// *MultipleSclerosisJournal.* 2011. Vol. 17(7). P. 819-829.
168. Regev K., Paul A., Healy B. Comprehensive evaluation of serum microRNAs as biomarkers in multiple sclerosis.// *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016.Vol. 3 (5). P.2-35.
169. Rezaei N., Amirghofran Z., Nikseresht A. In Vitro Effects of Sodium Benzoate on Th1/Th2 Deviation in Patients with Multiple Sclerosis// *Immunological Investigations.* 2016. Vol.45(7) P. 679-691.
170. Rizzo F. ,Giacomini E. , Mechelli R. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis.// *ImmunolCellBiol.* Vol.94. P. 886-894.
171. Rosser E.B. C., Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, andFunction.// *Immunity.* 2015. Vol. 42(4). P. 607-612.
172. Rothstein D.M, Camirand G. New insights into the mechanisms of Treg function.// *Curr Opin Organ Transplant.* 2015. Vol.20(4). P.376-384.
173. Rudick R. A., Ransohoff R. M., Pepler R. Interferon beta induces interleukin-10 expression: Relevance to multiple sclerosis. // *AnnNeurol.* 1996.

Vol. 40. P. 618-627.

174. Salou M. , Garcia A. , Michel L. Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis.// *Ann Clin Transl Neurol.* 2015. Vol. 2. P. 609-622.

175. Saulep-Easton D., Vincent F. B., Quah P. S. The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells.// *Leukemia.* 2016. Vol. 30. P. 163–172.

176. Schlegel P. M., Steiert I., Kötter I. B cells contribute to heterogeneity of IL-17 producing cells in rheumatoid arthritis and healthy controls.// *PloS one.* 2013. Vol.8(12). P.25-28.

177. Schubert R. D., Hu Y., Kumar G. IFN- β Treatment Requires B Cells for Efficacy in Neuroautoimmunity.// *The Journal of Immunology .* 2015. Vol. 194 (5) . P. 2110-2116.

178. Sellebjerg F., Cadavid D., Steiner D. Exploring potential mechanisms of action of natalizumab in secondary progressive multiple sclerosis .//*Ther Adv Neurol Disord.* 2016. Vol. 9(1). P. 31–43.

179. Sellner J. , Koczi W. , Harrer A. Effect of GA on adhesion molecules in MS.// *Clin Exp Immunol.* 2013. Vol.173. P.381-389.

180. Selter R. C., Biberacher V., Grummel V. Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients. // *MultipleSclerosisJournal.* 2013. Vol.19(11). P.1454–1461.

181. Serafini B., Rosicarelli B., Magliozzi R. Dendritic Cells in Multiple Sclerosis Lesions: Maturation Stage, Myelin Uptake, and Interaction With Proliferating T Cells.// *Journal of Neuropathology&ExperimentalNeurology.* 2006.Vol. 65 (2). P. 124–141.

182. Serafini B., Severa M., Columba-Cabezas S. Epstein-Barr Virus Latent Infection and BAFF Expression in B Cells in the Multiple Sclerosis Brain: Implications for Viral Persistence and Intrathecal B-Cell Activation.// *Journal of Neuropathology&ExperimentalNeurology.* 2010. Vol. 69(7). P. 677–693.

183. Sharrack B., Hughes R. A., Soudain S. The psychometric properties

- of clinical rating scales used in multiple sclerosis.// *Brain*. 1999. Vol. 122(1). P. 141–159.
184. Simpson S. Jr., Taylor B.V. van der Mei I. The role of epidemiology in MS research: past successes, current challenges and future potential.// *Mult Scler*. 2015. Vol.21 (8) . P. 969-977.
185. Sinha A.A., Lopez M.T., McDevitt H.O. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance.//*Science*. 1990. Vol. 248(4961). P. 1380-1388
186. Sospedra M., Muraro P. A., Stefanová I. Redundancy in Antigen-Presenting Function of the HLA-DR and -DQ Molecules in the Multiple Sclerosis-Associated HLA-DR2 Haplotype.// *J Immunol*. 2006. Vol.176 (3). P.1951-1961.
187. Spelman T., Kalincik T., Zhang A. Comparative efficacy of switching to natalizumab in active multiple sclerosis.// *Ann Clin Transl Neurol*. 2015. Vol.2. P. 373-387.
188. Staun-Ram E., Miller A. Effector and regulatory B cells in multiple sclerosis.// *Clin Immunol*. 2017. Vol.184. P.11–25.
189. Stern L. J., Santambrogio L. The melting pot of the MHC II peptidome.// *Current Opinion in Immunology*. 2016. Vol. 40. P. 70-77.
190. Steven A. J. Multiple sclerosis and cerebral endothelial dysfunction: Mechanisms. // *Pathophysiology*. 2011. Vol. 18 (1). P. 3 – 12.
191. Sun D. , Newman T. A., Perry V. H. Cytokine-induced enhancement of autoimmune inflammation in the brain and spinal cord: implications for multiple sclerosis.// *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2004. Vol. 30. P. 374-384.
192. Swiecki M., Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells.// *Nature Reviews Immunology*. 2015. Vol. 15. P. 471–485.
193. Takeshita Y., Ransohoff R.M. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. // *Immunol Rev*. 2012. Vol. 248(1). P.228–239.
194. Tan H., Cai Q., Agarwal S., Stephenson J. J. Impact of adherence to disease-modifying therapies on clinical and economic outcomes among patients

with multiple sclerosis. //Adv Therapy. 2011. Vol.28. P.51-61.

195. Tejera-Alhambra M., Casrouge A., de Andrés C. Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis.// PloS one. 2015. Vol.10(6). P. 1-12.

196. Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria.// LancetNeurol. 2018. Vol.17. P. 162-173

197. Torkildsen Ø., Myhr K., Bø L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis – a review of approved medications.// Eur J Neurol. 2016. Vol. 23. P. 18-27.

198. Trinschek B., Luessi F., Gross C.C. Interferon-Beta Therapy of Multiple Sclerosis Patients Improves the Responsiveness of T Cells for Immune Suppression by Regulatory T Cells.// Int J Mol Sci. 2015. Vol.16(7). P.16330-16346.

199. Tzartos J. S., Friese M. A., Craner M. J. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis.// The American Journal of Pathology. 2008. Vol. 172 (1). P. 146 – 155.

200. Vaknin-Dembinsky A., Brill L., Orpaz N. Preferential increase of B-cell activating factor in the cerebrospinal fluid of neuromyelitis optica in a white population.// Mult Scler. 2010. Vol. 16(12). P.1453-1457.

201. Vanheusden M., Stinissen P., Hart B.A. Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis? //Trends in Molecular Medicine. 2015. Vol. 21(1). P. 16-23.

202. Vasanthakumar A., Kallies A. The Regulatory T Cell: Jack-Of-All-Trades. //Trends in Immunology. Vol. 36(12).2015. P. 756-758.

203. Villar L. M., García-Sánchez M. I., Costa-Frossard L. Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis.// Archives of neurology. 2012. Vol. 69(2). P. 191–197.

204. Warnke C., Stettner M., Lehmsiek V. Natalizumab exerts a

- suppressive effect on surrogates of B cell function in blood and CSF.// *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2015. Vol.21(8). P. 1036–1044.
205. Weber M. S., Prod'homme T., Patarroyo J. C. B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity.// *Annals of neurology*.2010. Vol. 68(3). P. 369–383.
206. Wingerchuk D.M., Carter J.L. *Multiple Sclerosis: Current and Emerging Disease-Modifying Therapies and Treatment Strategies*.// *MayoClinicProceedings*. 2014.Vol. 89(2). P. 225-240.
207. Zajkowska J., Moniuszko-Malinowska A., Pancewicz S. A. Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE).// *Advances in medical sciences*, 2011. Vol.56(2). P. 311–317.
208. Zamvil S.S., Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis.// *AnnuRevImmunol*. 1990. Vol.8. P.579–621.
209. Zenobia C., Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. // *Periodontol*. 2015. Vol. 69: P.142-159.
210. Zhen J., Yuan J., Fu Y. IL-22 promotes Fas expression in oligodendrocytes and inhibits FOXP3 expression in T cells by activating the NF- κ B pathway in multiple sclerosis.// *Molecular Immunology*. 2017. Vol. 82. P. 84-93.
211. Zielinski C.E., Mele F., Aschenbrenner D. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1 beta.// *Nature*. 2012. Vol.484. P. 514–518.
212. Zimmermann J., Emrich M., Krauthausen M. IL-17A Promotes Granulocyte Infiltration, Myelin Loss, Microglia Activation, and Behavioral Deficits During Cuprizone-Induced Demyelination.// *Molecularneurobiology*. 2018. Vol.55(2). P. 946–957.