

**ДАНЧЕНКО ИРИНА ЮРЬЕВНА**

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

**14.01.11** – нервные болезни

**14.03.09** – клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Пермь-2015

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор – д.м.н., профессор И.П. Корюкина).

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор  
ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера»  
Минздрава России  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник  
ИЭГМ УрО РАН

**Байдина Татьяна Витальевна**

**Куклина Елена Михайловна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор кафедры неврологии  
с курсами нейрохирургии и медицинской генетики  
ГБОУ ВПО "Башкирский государственный  
медицинский университет" Минздрава России, г. Уфа

**Бахтиярова Клара Закиевна**

доктор медицинских наук,  
профессор, заведующий отделом  
иммунобиологических методов диагностики  
ФБУН «Федеральный научный центр  
медико-профилактических технологий  
управления рисками здоровья населения», г. Пермь

**Долгих Олег Владимирович**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.067.01 при ГБОУ ВПО «ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России (г. Пермь, ул. Петропавловская, 26) и на сайте [www.psma.ru](http://www.psma.ru), с авторефератом можно ознакомиться на сайтах [www.vak.ed.gov.ru](http://www.vak.ed.gov.ru), [www.psma.ru](http://www.psma.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

**Мудрова Ольга Александровна**

**Актуальность исследования.** Ускоряющиеся темпы развития неврологии и иммунологии приводят к открытию новых компонентов иммунной системы, участвующих в патогенезе рассеянного склероза (РС) – частой причины инвалидизации лиц молодого трудоспособного возраста [Бойко А.Н. [и др.], 2009; Столяров И.Д., 2010; Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н., 2010]. Учитывая, что начало патогенеза РС происходит, как правило, на периферии, а не в центральной нервной системе (ЦНС), воздействие именно на этот первичный процесс может приостановить последующее развитие заболевания и улучшить качество жизни пациентов, способствуя разработке препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС). Ремиттирующий РС представляет наибольший интерес для поиска новых терапевтических подходов.

В качестве одного из возможных звеньев иммунопатологии РС можно рассматривать белковые молекулы семейства семафоринов и их рецепторы [Kumanogoh A., Marukawa S., Suzuki K. et al., 2002; Koda T., Okuno T., Takata K. et al., 2014]. В первую очередь это относится к семафору IV класса Sema4D, известному также как CD100 (CD – the Cluster of Differentiation, молекулы дифференцировки лимфоидных клеток).

Имеется ряд данных, указывающих на участие Sema4D в развитии РС. Так, Sema4D-дефицитные мыши устойчивы к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, модели РС у животных [Kumanogoh A., Suzuki K., Ch'ng E. et al., 2002]. Повышенные уровни Sema4D определяются на поверхности Т-лимфоцитов и в сыворотке крови человека при другом демиелинизирующем заболевании – HTLV1-ассоциированной миелопатии [Giraudon P., Vincent P., Vuaillet C. et al., 2004]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* показана способность Sema4D вызывать апоптоз незрелых олигодендроцитов – клеток, играющих ключевую роль в миелинизации нервных волокон [Giraudon P., Vincent P., Vuaillet C. et al., 2004].

Интерес к данному семафору обусловлен его иммунным происхождением: Sema4D широко представлен на клетках иммунной системы, преимущественно – на Т-лимфоцитах, и способен за счет протеолитического отщепления переходить из мембранной формы в растворимую, не теряя при этом биологической активности [Wang X., Kumanogoh A., Watanabe C. et al. et al., 2001]. Синтезируясь иммунными клетками, Sema4D реализует свои эффекты как в иммунной системе, так и в ЦНС, используя для этого разные типы рецепторов: в нервной системе преимущественно Plexin-B1 [Tamagnone L., Artigiani S., Chen H., 1999], а в иммунной – CD72 [Kumanogoh A., Kikutani H., 2001].

Участие молекулы CD72 в реализации эффектов семафорина заслуживает особого внимания в связи с исследуемой патологией. Данная молекула представлена преимущественно на В-лимфоцитах и в свободном состоянии служит негативным

регулятором В-клеточной активации, а связывание Sema4D отменяет негативную регуляцию, что, теоретически, должно вести к гиперактивации клеток [Kumanogoh A., Watanabe C., Lee I. et al., 2000]. Между тем, В-лимфоциты, согласно современным представлениям, непосредственно участвуют в патогенезе РС, более того – истощение их популяции рассматривается как перспективная стратегия лечения данного заболевания [Евдошенко Е.П., 2013; Braley T.J., Segal B.M., 2013].

Изложенные выше факты указывают на высокую актуальность изучения вовлеченности семафорина Sema4D в иммунные реакции пациентов с ремиттирующим РС.

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

**Задачи исследования:**

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

**Научная новизна исследования**

Методом клиничко-иммунологического сопоставления доказано участие новых иммунных механизмов в каскаде повреждающих реакций при рассеянном склерозе. Впервые показано, что ремиттирующий РС ассоциирован с повышенной экспрессией семафорина Sema4D/CD100 в иммунной системе. Впервые установлено повышение уровня экспрессии мембранного Sema4D/CD100 интактными Т-лимфоцитами *ex vivo* у пациентов с РС, а также показано ее изменение в ответ на поликлональную активацию Т-лимфоцитов:

повышение на начальных стадиях культивирования и снижение при длительном культивировании. Впервые обнаружено повышение экспрессии растворимой формы семафорина в плазме крови пациентов с РС, а также в супернатантах Т-клеточных культур. Новыми являются данные по экспрессии рецептора для Sema4D/CD100, CD72, В-лимфоцитами пациентов с РС и участию Sema4D-CD72-зависимого сигнала в регуляции функции этих клеток, в частности, продукции В-лимфоцитами основных про- и противовоспалительных цитокинов.

Обнаружено, что повышение уровня экспрессии семафорина Sema4D/CD100 характерно для пациентов с РС и не зависит от стадии заболевания, его продолжительности и уровня инвалидизации, и не связано с нейропсихологическими особенностями пациентов и результатами когнитивного тестирования.

Доказано, что мембранная и растворимая форма семафорина Sema4D участвуют в повреждающих процессах при РС, так как их показатели коррелируют с клиническими характеристиками заболевания: с компонентами EDSS и показателями, отражающими воспалительный компонент заболевания (меньшей длительностью заболевания и активностью демиелинизирующего процесса по данным нейровизуализации).

### **Практическая значимость работы**

Проведенное комплексное исследование вовлеченности семафорина Sema4D/CD100 в патогенез РС позволяет подтвердить целесообразность использования данной молекулы в качестве возможной мишени при терапии данного заболевания, что требует дальнейших масштабных исследований с применением соответствующих моноклональных антител.

Результаты исследования показывают участие Sema4D-CD72–зависимого сигнала в контроле В-клеточной активности у наивных пациентов с ремиттирующим РС и свидетельствуют о вкладе семафорина в гиперактивацию В-клеточного звена иммунитета, также играющего негативную роль в патогенезе РС, у таких пациентов.

Выявление повышенного уровня растворимой формы семафорина Sema4D/CD100 у пациентов с РС указывает на его возможное участие в демиелинизирующем процессе, учитывая данные литературы о патологическом действии растворимого семафорина на выживаемость олигодендроцитов *in vitro* [Giraudon P., Vincent P., Vuailat C. et al., 2004].

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Клинические и нейровизуализационные особенности наивных пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом ассоциированы с повышенной экспрессией семафорина Sema4D/CD100 (мембранной и растворимой формы) в иммунной системе.
2. У пациентов с рассеянным склерозом в ремиссию Т-лимфоциты в культуре демонстрируют повышенный уровень экспрессии Sema4D/CD100 на мембране, но в то же

время более интенсивное отщепление от мембраны в ответ на активацию клетки, что может отражать процессы, имеющие место на периферии и в центральной нервной системе.

3. При рассеянном склерозе снижена экспрессия рецептора для Sema4D/CD100, CD72, на В-лимфоцитах периферической крови, а связывание его с семафоринем регулирует функции В-клеток, изменяя профиль синтезируемых цитокинов в направлении провоспалительных факторов, что может быть одним из механизмов гиперактивации В-клеточного звена и развития нейровоспаления, характерных для данной патологии.

**Личный вклад диссертанта в исследование.** Этапы исследования, включая формирование групп пациентов, клиническое и нейропсихологическое обследование лиц с подтвержденным диагнозом «Рассеянный склероз» выполнены лично автором. Диссертантом сформирована база данных и выполнена статистическая обработка результатов исследования. Иммунологические исследования выполнены в Лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (г. Пермь). Автор выражает благодарность научному сотруднику Лаборатории иммунорегуляции, к.б.н. И.В. Некрасовой за помощь в работе.

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

**Апробация работы.** Основные положения диссертации отражены в докладах на VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции "Рассеянный склероз и другие аутоиммунные заболевания нервной системы" (2013г., г. Новосибирск), XIX Всероссийской конференции "Нейроиммунология. Рассеянный склероз" (2013г., г. Санкт-Петербург), городской научной конференции "Аутоиммунитет в норме и патологии" (2013г., г. Пермь). Материалы диссертации изложены на Научной сессии ПГМА, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Я.С. Циммермана (2013г., г. Пермь), Объединенном Иммунологическом Форуме (2013г., Нижний Новгород), Российском научном форуме на Урале с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной медицины» (2014г., г. Екатеринбург).

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

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

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

### **Материалы и методы исследования**

Исследование было открытым, одномоментным, контролируемым. Общая совокупность обследуемых составила 76 человек, из которых 52 человека являлись наивными (не получавшими ПИТРС) пациентами с ремиттирующим типом течения РС (41 чел. – в стадии ремиссии и 11 чел. – в стадии обострения) и 24 – здоровыми донорами (ЗД). Среди пациентов с РС было 35 женщин (67,3%) и 17 мужчин (32,7%), в соотношении 2,1:1, в возрасте от 18 до 55 лет.

Достоверный диагноз РС основывался на критериях McDonald [Polman С.Н., Reingold S.C., Edan G., 2005]. Диагноз РС был подтвержден магнитно-резонансной томографией (МРТ) головного мозга на томографе мощностью 1,5 Тесла. Последняя МРТ головного мозга проводилась в диапазоне от 1 до 1061 дней, медиана 95 (65;149) дней, перед клинико-лабораторным обследованием пациентов, при этом в стадии ремиссии – в диапазоне от 14 до 1061 дней, медиана 104 (81;152) дня, в стадии обострения – от 1 до 146 дней, медиана 5 (4;21) дней,  $p=0,000$ . Определение рецидивирующе-ремиттирующего типа течения РС проводилось по принятым критериям [Lublin F.D., Reingold S.C., 1996].

Пациентам с РС была проведена оценка уровня инвалидизации по шкале EDSS (Expanded Disability Status Scale) [Kurtzke J.F., 1983]. Превалирующими вариантами дебюта у пациентов являлись сенсорные нарушения (25%) и ретробульбарный неврит (17%). Клиническая характеристика пациентов с ремиттирующим РС представлена в табл. 1.

Таблица 1

**Клиническая характеристика пациентов с рассеянным склерозом; Me (LQ;UQ)**

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

У пациентов, обследованных вне обострения, длительность ремиссии составила 117 (78;243) дней до момента забора крови. У пациентов, обследованных в стадию обострения, продолжительность периода от проявления симптомов обострения РС до забора образцов крови варьировала в промежутке от 5 до 74 дней, медиана 30 (15;30). Пациенты в стадии обострения отличались от пациентов в стадии ремиссии меньшей длительностью первой ремиссии, меньшей продолжительностью заболевания, большим баллом EDSS (табл. 2).

Таблица 2

**Клиническая характеристика пациентов в стадии ремиссии и обострения рассеянного склероза; Me (LQ;UQ)**

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

Здесь и далее: \* – значимые различия между группами

Принципиальный вклад в различие в степени инвалидизации данных подгрупп пациентов (табл. 2) внесли выраженность сенсорных расстройств ( $p=0,014$ ) и ограничений в ходьбе (показатель FS8, «Передвижение», Ambulation score) ( $p=0,028$ ).

Для дальнейшего сопоставления клинических и иммунологических данных нами были выделены следующие группы из обследованных 52-х пациентов (табл. 3).

Таблица 3

**Распределение пациентов с рассеянным склерозом по группам**

Выделенные группы градации показателей			Пациенты с рассеянным склерозом, n
Возраст (лет)	1	18-30	28
	2	31-40	17
	3	41-55	7
Дебют РС (лет)	1	16-29	39
	2	$\geq 30$	13
Длительность первой ремиссии (лет)	1	$\leq 1$	29
	2	1-5	12
	3	$\geq 5$	11
Длительность заболевания (лет)	1	$\leq 2$	26
	2	2-5	11
	3	$\geq 5$	15
EDSS (балл)	1	1,5-2,0	24
	2	2,5-3,5	13
	3	4,0-5,5	15
Скорость прогрессирования (для 33-х пациентов)	1	$\leq 0,25$	6
	2	0,25-0,75	16
	3	$\geq 0,75$	11
Пол	Женский		37
	Мужской		17
Стадия заболевания	Ремиссия		41
	Обострение		11

При оценке скорости прогрессирования в подсчет не были включены пациенты в стадии ремиссии с длительностью заболевания год и менее ( $n=8$ ) и пациенты в периоде экзacerbации болезни ( $n=11$ ) ввиду получения в противном случае необоснованно высоких показателей [Rist J.M., Franklin R.J.M., 2010].

**Психометрическое тестирование включало следующие шкалы:** госпитальная шкала тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale) для оценки аффективных расстройств, шкала MFI-20 (Multidimensional Fatigue Inventory) для определения усталости, шкала MSIS-29 (Multiple Sclerosis Impact Scale) для оценки влияния заболевания на физическое и психическое состояние (для пациентов с РС), опросник FAMS (Functional Assessment of Multiple Sclerosis, Функциональная оценка РС) для оценки качества жизни

(для пациентов с РС). **Тестирование когнитивных функций** подразумевало слуховой тест на сложение в заданном темпе PASAT-3 (Paced Auditory Serial Addition Test).

В иммунологическом исследовании использовали гепаринизированную венозную кровь, из которой выделяли плазму и мононуклеарные клетки периферической крови.

Алгоритм лабораторных исследований представлен на рис. 1.

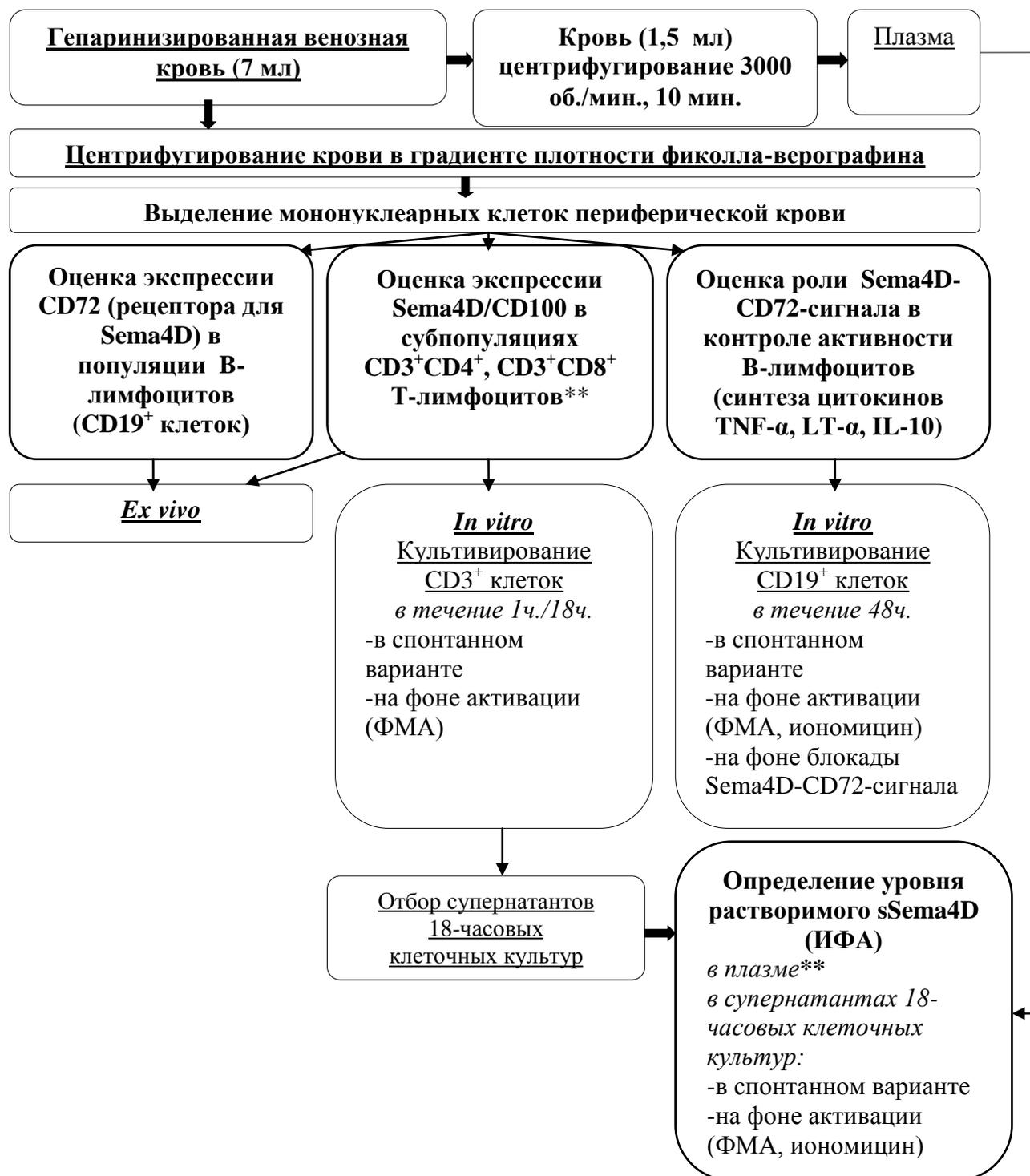


Рис. 1. Алгоритм лабораторных исследований.

Примечание: \*\* – исследования, проведенные у пациентов в стадии обострения рассеянного склероза

Важным критерием исключения явилось наличие в анамнезе системного воздействия кортикостероидов в течение как минимум 30 дней до взятия образцов периферической крови, учитывая их возможное иммунодепрессивное воздействие на клеточное звено иммунной системы [Sellebjerg F., Christiansen M., Jensen J., Frederiksen J.L., 2000].

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

Выделенные мононуклеарные клетки периферической крови использовали для оценки экспрессии (присутствия молекулы на мембране) Sema4D *ex vivo* – Т-лимфоцитами, для чего применяли субпопуляционные маркеры CD3, а также CD4/CD8, которые определяют основные функциональные субпопуляции лимфоцитов. Также выделяли неТ-клеточную субпопуляцию CD3<sup>-</sup> лимфоцитов, включавшую В-клетки, естественные киллеры и моноциты. Для анализа использовали моноклональные антитела к каждой из мембранных молекул (CD3, CD4 или CD8, CD100), меченые разными флуорохромными метками. Анализ проводили на проточном цитометре. Оценивали процент CD100-позитивных клеток в клеточной субпопуляции и среднюю интенсивность их свечения (Mean Fluorescence Intensity, MFI, условные единицы – у.е.), отражающую численность (плотность) молекул на мембране клетки.

Для оценки возможных изменений в экспрессии Sema4D Т-лимфоцитами в условиях иммунного ответа мы определяли ее в культуре – в спонтанном варианте (в полной питательной среде) и в условиях активации. Клетки культивировали в течение 1 часа и 18 часов с использованием форболмиристатацетата (ФМА), исходя из данных установочных экспериментов. По окончании культивирования определяли экспрессию Sema4D на мембране в общей популяции Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup> клеток). Оценивали процент CD100-позитивных клеток в клеточной субпопуляции и среднюю интенсивность их свечения.

Уровень растворимого Sema4D (sSema4D) оценивали в плазме крови и супернатантах клеточных культур (спонтанный вариант и вариант с активатором), полученных по окончании 18-часового культивирования Т-лимфоцитов, иммуноферментным методом.

Экспрессию рецептора для Sema4D – CD72 – В-лимфоцитами определяли *ex vivo* в суспензии мононуклеарных клеток периферической крови. Для этого использовали клеточный маркер CD19<sup>+</sup>. Оценивали процент CD72-позитивных клеток в популяции CD19<sup>+</sup> клеток и среднюю интенсивность их свечения.

Для оценки влияния Sema4D на В-лимфоциты их культивировали в течение 48 часов в присутствии Т-клеток в спонтанном варианте, на фоне активации (с использованием форболмиристатацетата и иономицина), а также на фоне блокады Sema4D-CD72-сигнала (отдельно проводили блокаду Sema4D и отдельно блокаду его рецептора CD72). Изучали экспрессию 2-х провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли-альфа и LT- $\alpha$  – лимфотоксин-альфа) и одного противовоспалительного (IL-10 – интерлейкин-10) в CD19<sup>+</sup> клетках. Оценивали процент клеток, несущих цитокин.

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

Статистическая обработка данных исследования проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoftInc., USA). Описательные характеристики количественных признаков представлены в виде медианы с верхней и нижней квартилью – Me (LQ;UQ) или (Me; LQ-UQ). Сравнительный анализ данных в 2-х независимых группах выполнен с использованием U критерия Манна-Уитни. При сравнении частот бинарных качественных признаков в двух независимых группах использованы критерий  $\chi^2$  и точный критерий Фишера. При сравнении 2-х зависимых групп использован критерий Вилкоксона. При сравнении количественных показателей в трех независимых группах проведен дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису. Корреляционный анализ произведен с использованием рангового коэффициента Спирмена (R). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. При значении p меньше 0,001 производили указание в формате p=0,000.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **Клиническая характеристика пациентов с РС**

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

Активность РС по данным МРТ головного мозга была выявлена у 20 чел. Медиана контрастируемых очагов составила 1 (0;4), при этом она отличалась в группах ремиссии 0,5 (0;2,0) и обострения 4,0 (2,0;10,0), p=0,026, с преобладанием у последней. Преимущественный тип накопления контрастного препарата – изолированный диффузный.

##### ***Результаты тестирования когнитивных функций***

Количество правильных ответов в трехсекундном слуховом тесте на сложение в заданном темпе PASAT-3 в группе пациентов с РС (n=39) составило 44,0 (37,0;53,0), в то время как в группе контроля (n=12) – 49,0 (45,5;52,0), без значимых отличий (p=0,209). Не выявлены отличия в выполнении этого теста пациентами с РС в зависимости от пола (p=0,522), занятости (p=0,223) и выделенных клинических характеристик пациентов, а также стадии заболевания.

### **Результаты психометрического тестирования**

У пациентов с РС (n=40) отмечен уровень тревоги на уровне субклинической, что превышает таковой у ЗД (n=12) (p=0,004) (табл. 4).

Таблица 4

#### **Результаты психометрического тестирования пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров; Me (LQ;UQ)**

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

Тревога преобладала у пациентов с большей выраженностью степени инвалидизации. Показатели депрессии не различались в группах, выделенных по возрасту (p=0,835) и продолжительности заболевания (0,226) при критерию Краскел-Уоллиса. Были выражены отличия в уровне депрессии между пациентами со степенью инвалидизации  $\leq 2$  баллов (3,0;1,0-6,0) и  $\geq 4$  баллов (7,5;4,0-9,0), p=0,014.

Как и в случае с показателем депрессии, не отмечено различий по шкалам теста MFI-20 в группах пациентов с РС и ЗД (табл.4). Выявлены положительные корреляции показателя «Физическая астения» шкалы MFI-20 с возрастом пациентов (R=0,357, p=0,023), количеством обострений (R=0,408, p=0,008).

Пациенты имели большие показатели по шкале влияния РС MSIS-29 в старших возрастных группах и при возрастании продолжительности заболевания и балла EDSS. Как физическая (R=0,556, p=0,000), так и психическая (R=0,500, p=0,001) составляющая теста MSIS-29, а также общий балл по данной шкале (R=0,555, p=0,000) имели положительную корреляционную связь с количеством обострений.

Медиана значения общего показателя качества жизни по селективной для пациентов с РС шкале FAMS составила 131 (110;151) балл при максимально возможном значении 176 баллов, без отличий между группами ремиссии (n=31) и обострения (n=8) (p=0,573).

Пациенты, находившиеся на момент выполнения психометрического тестирования в стадии клинической ремиссии или эксацербации РС, не имели отличий в баллах по всем четырем нейропсихологическим опросникам и тесту PASAT-3.

### Оценка роли Sema4D/CD100 в контроле функции иммунокомпетентных клеток при рассеянном склерозе

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

Т-лимфоциты конститутивно экспрессируют маркер CD100 как в группе пациентов с РС, так и в группе ЗД. Однако уровень экспрессии Sema4D на Т-лимфоцитах – средняя интенсивность свечения (Mean Fluorescence Intensity, MFI) – значительно превалировал в субпопуляциях клеток у пациентов с РС (n=37) в сравнении со ЗД (n=20): CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup> (p=0,000), CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup> (p=0,000), CD3<sup>-</sup> (p=0,003) (рис. 2).

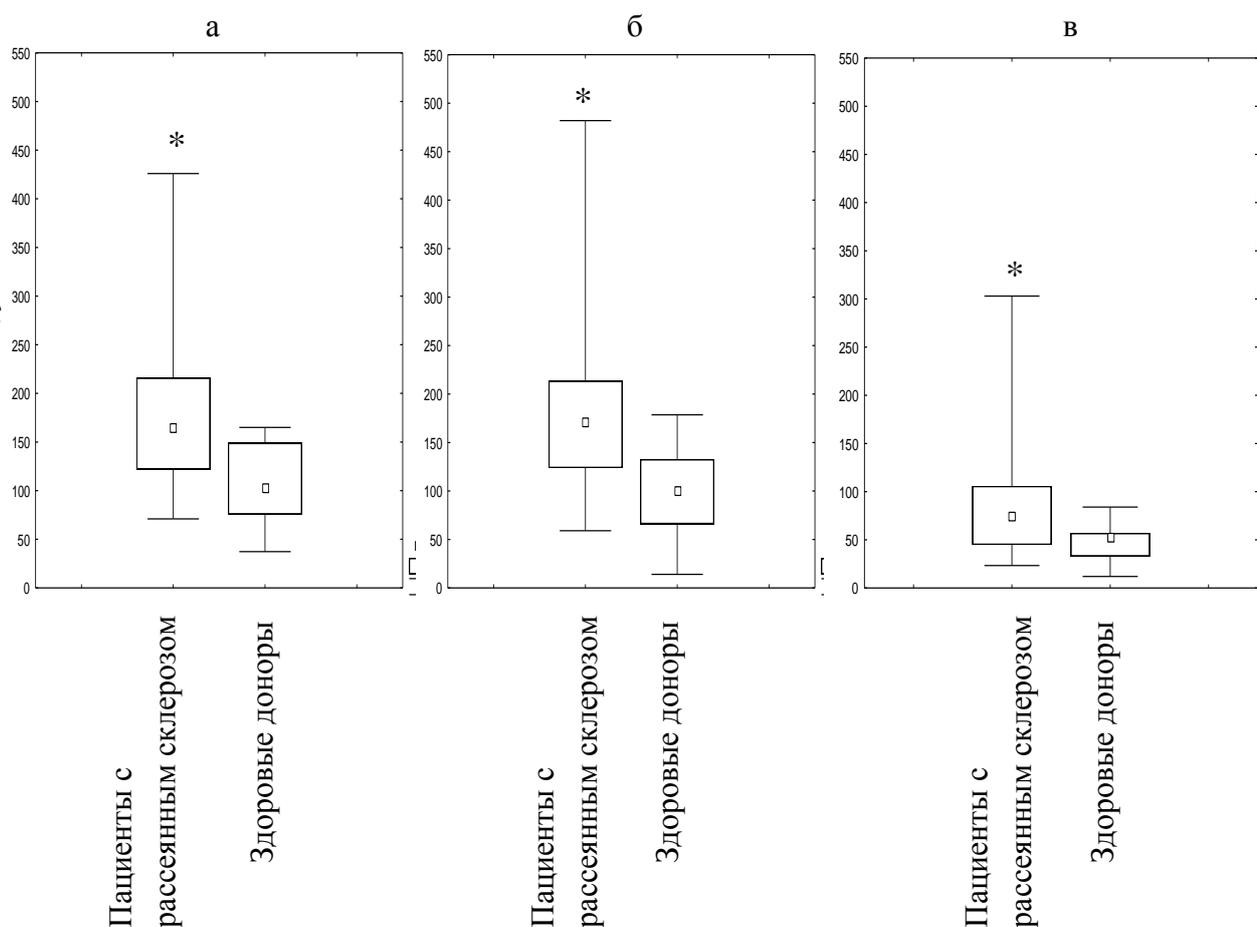


Рис. 2. Уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 (Mean Fluorence Intencity, MFI) в субпопуляциях мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с рассеянным склерозом и здоровых доноров: а) CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>, б) CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, в) CD3<sup>-</sup>; Me (LQ;UQ).

Не было обнаружено отличий в уровне экспрессии Sema4D в группах пациентов с РС, разделенных нами по возрасту, возрасту дебюта, длительности заболевания, величине уровня инвалидизации по шкале EDSS и скорости прогрессирования, а также полу и стадии заболевания. Значимых отличий по уровню экспрессии Sema4D в субпопуляциях мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с РС в стадии ремиссии (n=27) и эксациации (n=10) нами также не было установлено, что предполагает отсутствие зависимости экспрессии Sema4D от стадии демиелинизирующего процесса. Не установлено и гендерных отличий по уровню экспрессии Sema4D на мембране лимфоцитов.

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

**Экспрессия семафорина Sema4D/CD100 интактными и активированными Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup> клетками) в обследуемых группах *in vitro***

В группах ЗД (n=9) и пациентов с РС (n=10) было отмечено повышение уровня экспрессии Sema4D при культивировании CD3<sup>+</sup> клеток в течение 1 часа (график 1-2-3 на рис. 3 и рис. 4) и его снижение (более интенсивное при РС) при культивировании на протяжении 18 часов (график 1-4-5 на рис. 3 и рис. 4).

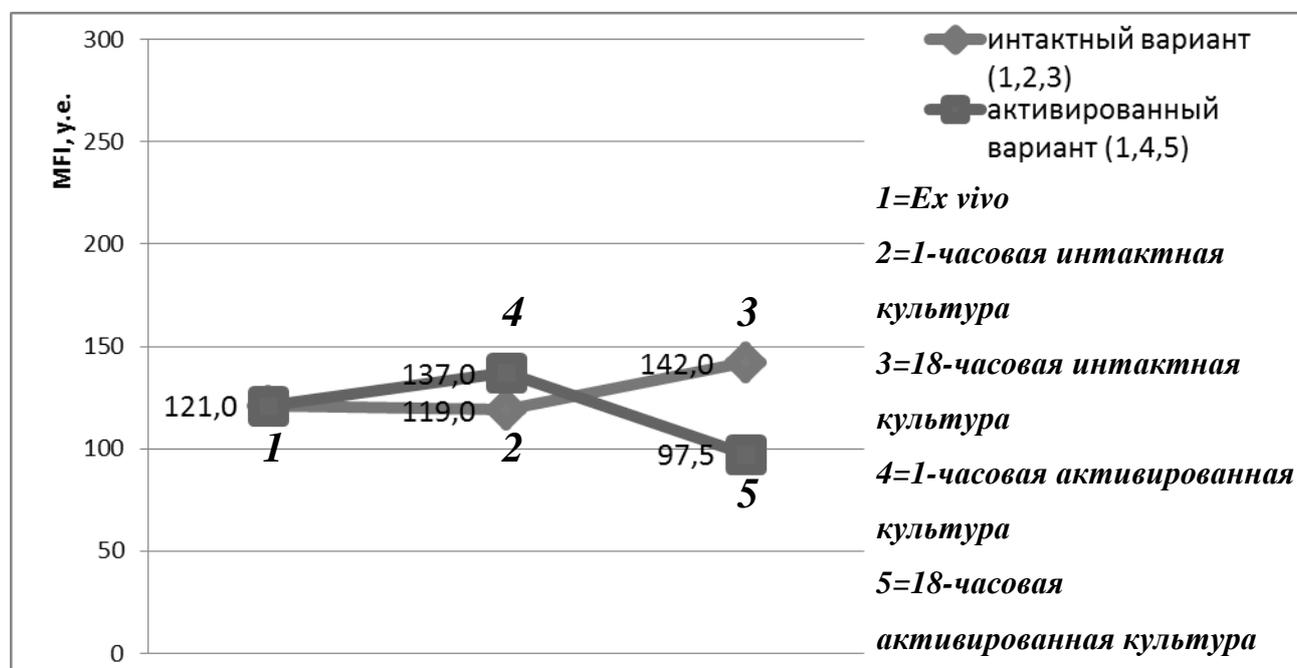


Рис. 3. Уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 для интактных и активированных Т-лимфоцитов здоровых доноров (n=9) в культуре в зависимости от длительности культивирования; (Me).

$p_{1-2}=0,893$ ,  $p_{1-3}=0,008^*$ ,  $p_{2-3}=0,225$ ,  $p_{1-4}=0,043^*$ ,  $p_{1-5}=0,028^*$ ,  $p_{4-5}=0,068$ ,  $p_{2-4}=0,043^*$ ,  $p_{3-5}=0,012^*$

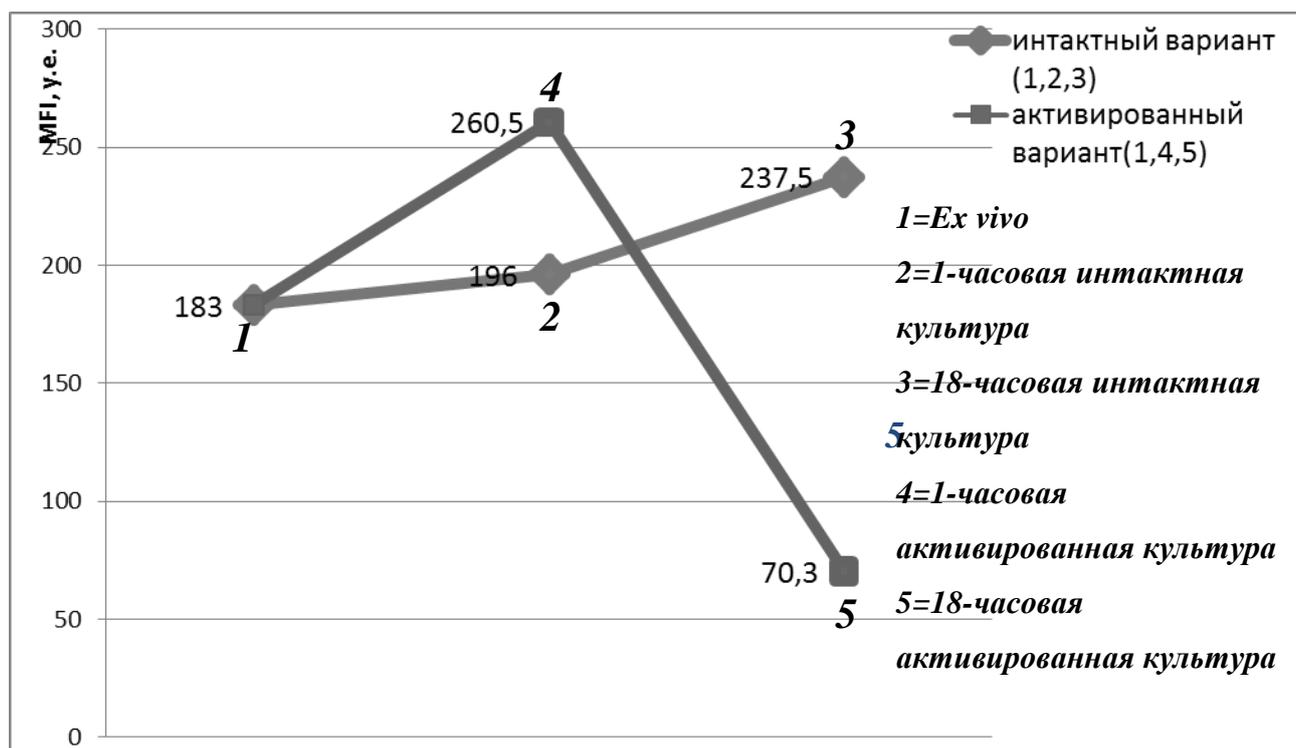


Рис. 4. Уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 для интактных и активированных Т-лимфоцитов пациентов с рассеянным склерозом (n=10) в культуре в зависимости от длительности культивирования; (Me).

$p_{1-2}=0,169$ ,  $p_{1-3}=0,009^*$ ,  $p_{2-3}=0,022^*$ ,  $p_{1-4}=0,013^*$ ,  $p_{1-5}=0,005^*$ ,  $p_{4-5}=0,005^*$ ,  $p_{2-4}=0,017^*$ ,  $p_{3-5}=0,005^*$

При РС в отличие от ЗД отмечен более значимый интервал снижения уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране CD3<sup>+</sup> клеток в условиях активации 18-часовых клеточных культур в сравнении с показателем 1-часовых клеточных культур (рис. 3 и рис. 4, график 4-5,  $p=0,007$ ) и для 18-часовых клеточных культур в сравнении с показателем ex vivo (рис. 3 и рис. 4, график 1-5,  $p=0,000$ ). При этом у пациентов с РС показатели уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране CD3<sup>+</sup> клеток были статистически значимо выше в сравнении с таковыми в группе ЗД на большинстве этапов культивирования (Табл. 5).

Таблица 5

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

Этапы культивирования		Пациенты с рассеянным склерозом в стадии ремиссии (n=10)	Здоровые доноры (n=9)	p
Ex vivo	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	183,0 (114,0;235,0)	121,0 (93,7;139,0)	0,015*

Культивирование интактных Т-лимфоцитов (1ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	196,0 (168,0;227,0)	119,0 (95,2;123,0)	0,010*
Культивирование интактных Т-лимфоцитов (18ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	237,5 (181,0;276,0)	142,0 (111,0;152,0)	0,002*
Культивирование Т-лимфоцитов, активированных ФМА (1ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	260,5 (162,0;283,0)	137,0 (135,0;141,0)	0,020*
Культивирование Т-лимфоцитов, активированных ФМА (18ч.)	CD100 <sup>+</sup> в CD3 <sup>+</sup> (MFI), у.е.	70,3 (41,0;79,4)	97,5 (91,5;109,5)	0,055

**Уровень растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови и культуре фракционированных Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup> клеток)**

Уровень растворимого Sema4D (sSema4D) в плазме крови был повышен как у пациентов с РС (n=21) (p=0,012), так и отдельно у пациентов в стадии ремиссии (n=14) (p=0,031) и обострения (n=7) (p=0,018), в сравнении с группой ЗД (n=7) (рис. 5).

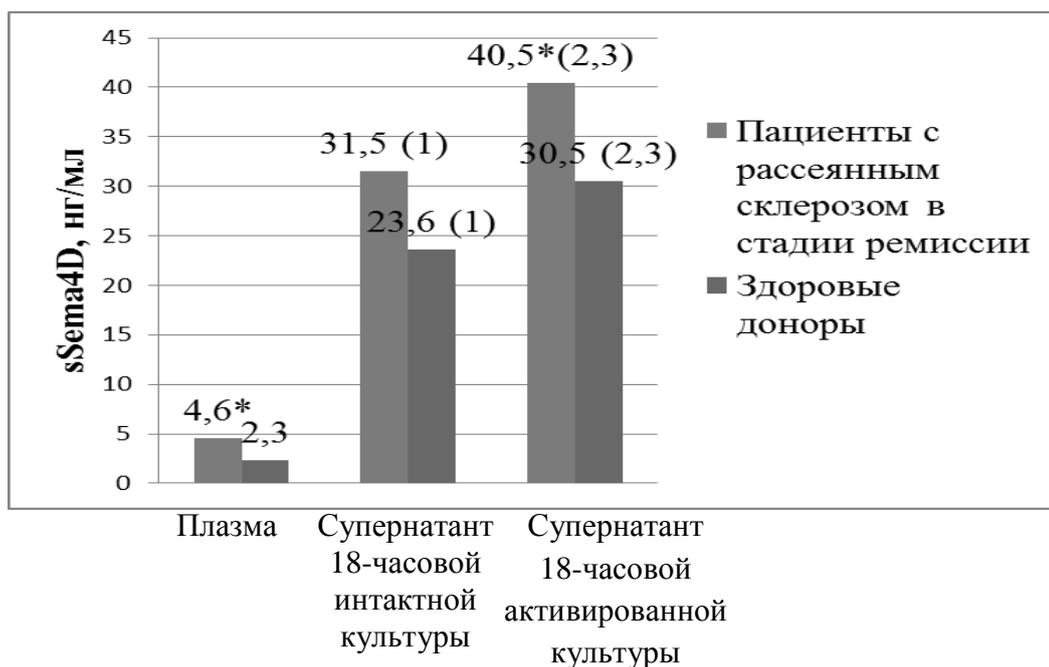


Рис. 5. Уровень растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови и супернатантах клеточных культур у пациентов в стадии ремиссии РС и здоровых доноров; (Me, нг/мл)  
 (1)- p<0,05 при сравнении уровня sSema4D в супернатантах 18-часовой культуры интактных Т-лимфоцитов с его уровнем в плазме, критерий Вилкоксона  
 (2)- p<0,05 при сравнении уровня sSema4D в активированном и спонтанном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры, критерий Вилкоксона  
 (3)-p<0,05 при сравнении уровня sSema4D в активированном варианте супернатанта 18-часовой клеточной культуры с его уровнем в плазме, критерий Вилкоксона  
 \*- p<0,05 в сравнении со здоровыми донорами, критерий Манна-Уитни

Однако отличий по уровню sSema4D в плазме между группами пациентов, находящихся в стадии ремиссии (4,62 (2,92-5,88), n=14) и обострения (7,08 (3,37-9,63), n=7), выявлено не было ( $p=0,371$ ). Не выявлено зависимости уровня sSema4D в плазме от клинических характеристик пациентов.

Уровень sSema4D в супернатантах клеточных культур был оценен нами для пациентов в стадии ремиссии РС. У пациентов с РС (n=15) и ЗД (n=14) уровень sSema4D в супернатантах 18-часовых клеточных культур (и активированного, и спонтанного вариантов) значимо возрастал в сравнении с его уровнем в плазме (рис. 5), преобладая при РС в активированном варианте супернатанта 18-часовых клеточных культур в сравнении со ЗД (рис. 5).

Наращение уровня sSema4D в условиях культивирования у пациентов с РС согласуется с обнаруженным нами ранее повышенным уровнем экспрессии мембранного Sema4D (рис. 2): большие уровни мембранного семафорина должны, теоретически, приводить к более выраженному повышению sSema4D в условиях клеточной активации. Точно также это согласуется с выявленным снижением у пациентов с РС уровня экспрессии Sema4D на мембране в ходе 18-часового культивирования лимфоцитов (рис. 4), учитывая данные о слушивании Sema4D с мембраны с переходом в растворимую форму [Wang X., Kumanogoh A., Watanabe C. et al., 2001].

Для пациентов в стадии ремиссии РС (n=14) отмечена обратная корреляция между уровнем sSema4D в плазме и продолжительностью болезни ( $R=-0,567$ ,  $p=0,035$ ), что согласуется с преобладанием воспалительного компонента (демиелинизации) на ранних этапах заболевания [Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н., 2011].

Для группы пациентов с обострением РС (n=7) прослежена прямая корреляция уровня sSema4D в плазме и количеством контрастируемых очагов в головном мозге ( $R=0,900$ ,  $p=0,037$ ), что также представляется логичным с учетом усиления воспаления и демиелинизации в ЦНС в стадии обострения РС [Шмидт Т.Е., 2006].

***Оценка экспрессии рецептора для Sema4D/CD100 – CD72 – В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup> клетками) пациентов с рассеянным склерозом в стадии ремиссии***

Нами обнаружено значимое снижение процента CD72-позитивных CD19<sup>+</sup> клеток у пациентов с РС в сравнении со ЗД (табл. 6).

**Доля В-лимфоцитов, несущих рецептор CD72, и показатели уровня экспрессии CD72 в сравняваемых группах; Me (LQ;UQ)**

Показатели		Пациенты с рассеянным склерозом в стадии ремиссии	Здоровые доноры	p
Доля В-лимфоцитов (CD19 <sup>+</sup> клеток) в суспензии МПК (%)		17,3 (14,1;23,5) n=24	9,4 (7,9;10,9) n=15	0,000*
Экспрессия CD72 в популяции CD19 <sup>+</sup> клеток	Доля CD19 <sup>+</sup> клеток, несущих рецептор CD72 (%)	43,7 (36,4;47,8) n=24	82,0 (72,0;83,0) n=13	0,000*
	Уровень экспрессии CD72 в популяции CD19 <sup>+</sup> клеткок (y.e.)	49,7 (40,7;77,2) n=20	68,9 (57,4;92,0) n=15	0,121

Также у пациентов с РС значительно повышено процентное содержание В-лимфоцитов (% CD19<sup>+</sup> клеток) в периферической крови по сравнению с ЗД (табл. 6). Известно, что CD72 является негативным регулятором функции В-клеток [Adachi T., Flaswinkel H., Yakura H. et al., 1998], а связывание Sema4D с рецептором CD72 отменяет негативное действие CD72 на В-клеточную активацию [Kumanogoh A., Kikutani H., 2004]. Таким образом, установленное ранее в нашем исследовании повышение уровня экспрессии семафорина Sema4D интактными Т-лимфоцитами в периферической крови пациентов с РС в сравнении со ЗД (рис. 2) также указывает на возможное участие семафорина в гиперактивации В-лимфоцитов у наших пациентов.

***Синтез ключевых про- и противовоспалительных цитокинов В-лимфоцитами у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза***

Нами исследован профиль цитокинов, синтезируемых В-лимфоцитами при их культивировании (48ч.) в присутствии Т-клеток. В спонтанном варианте (в эксперименте без использования активатора клеток) В-клетки ЗД синтезируют значительно меньшие количества провоспалительных цитокинов, TNF- $\alpha$  и LT- $\alpha$ , в сравнении с группой пациентов с РС (p=0,003 и p=0,001` соответственно) и большее количество противовоспалительного цитокина IL-10 (p=0,001) (табл. 7).

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

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

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

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

Нами установлено изменение профиля всех исследуемых цитокинов, синтезируемых В-лимфоцитами, в условиях активирования клеток у пациентов с РС (табл. 7): увеличение процента В-клеток, содержащих исследуемые цитокины TNF- $\alpha$  ( $p=0,003$ ), LT- $\alpha$  ( $p=0,003$ ), IL-10 ( $p=0,040$ ). Причем в активированном варианте процент клеток, несущих цитокин, преобладал у пациентов с РС только для одного провоспалительного цитокина - фактора некроза опухоли-альфа ( $p=0,015$ ).

В условиях блокады Sema4D-CD72-сигнала также происходили изменения профиля цитокинов в сравнении со спонтанным вариантом без ингибитора у пациентов с РС: снижение процента В-клеток, продуцирующих TNF- $\alpha$  ( $p=0,004$  при блокаде Sema4D и  $p=0,006$  при блокаде CD72) и LT- $\alpha$  ( $p=0,017$  при блокаде Sema4D и  $p=0,004$  при блокаде CD72) (рис. 6).

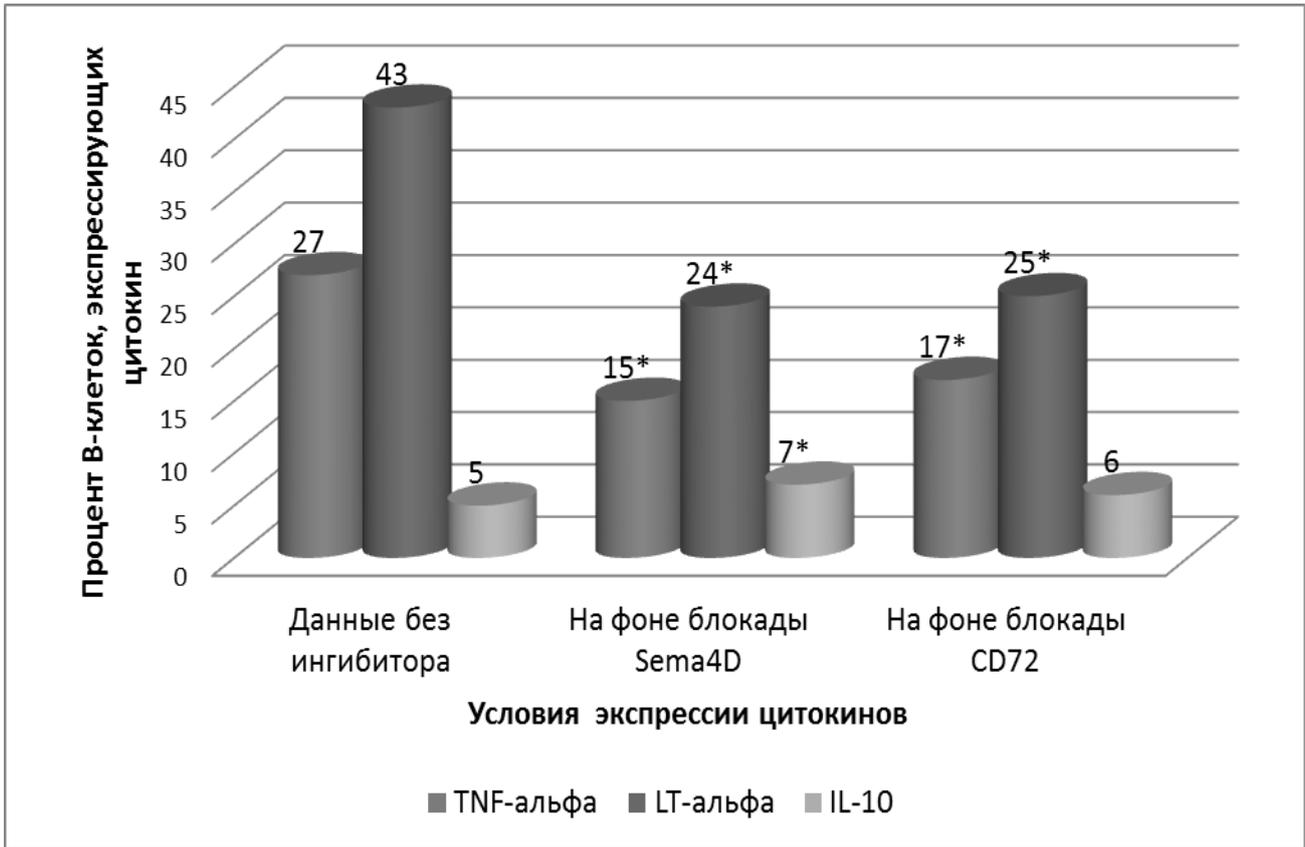


Рис. 6. Изменение профиля цитокинов, продуцируемых  $CD19^+$  клетками, на фоне блокады Sema4D-CD72 сигнала у пациентов с рассеянным склерозом в стадии ремиссии  
Здесь: \* -  $p < 0,05$  в сравнении с вариантом без применения ингибитора для соответствующего цитокина.

Это предполагает участие семафорина Sema4D в активации В-клеточного звена при РС при взаимодействии с рецептором CD72, в индукции синтеза провоспалительных цитокинов. Что касается противовоспалительного цитокина IL-10, то увеличение доли В-клеток, продуцирующих данный цитокин, происходило на фоне блокады Sema4D ( $p=0,008$ ).

В целом, показанное в работе повышение экспрессии Sema4D в иммунной системе при РС позволяет предложить как минимум два механизма участия семафорина в патогенезе данного заболевания. С одной стороны, учитывая, что Sema4D способен вызывать апоптоз незрелых нейронов и олигодендроцитов [Giraudon P., Vincent P., Vuaillet C. et al., 2004], у пациентов с РС он, по-видимому, оказывает непосредственное поражающее действие на нервные ткани, причем эффекты эти обеспечиваются как растворимым семафоринем, проникающим через нарушенный при РС гемато-энцефалический барьер, так и мембранным, за счет инфильтрации ЦНС Т-лимфоцитами и их активации в ответ на аутоантигены. С другой стороны, поскольку мембранный Sema4D может выступать не только в качестве лиганда, но и как рецептор, проводя сигнал в саму Т-клетку, причем сигнал костимулирующий [Kumanogoh A., Suzuki K., Ch'ng E. et al., 2002], усиление его экспрессии

при РС способствует, очевидно, повышенной активации Т-лимфоцитов, в том числе аутоспецифичных Т-клеток – как во вторичных лимфоидных органах, так и в ЦНС. На основании полученных в нашем исследовании данных можно представить роль семафорина Sema4D в иммунной системе в виде схемы (рис. 7).

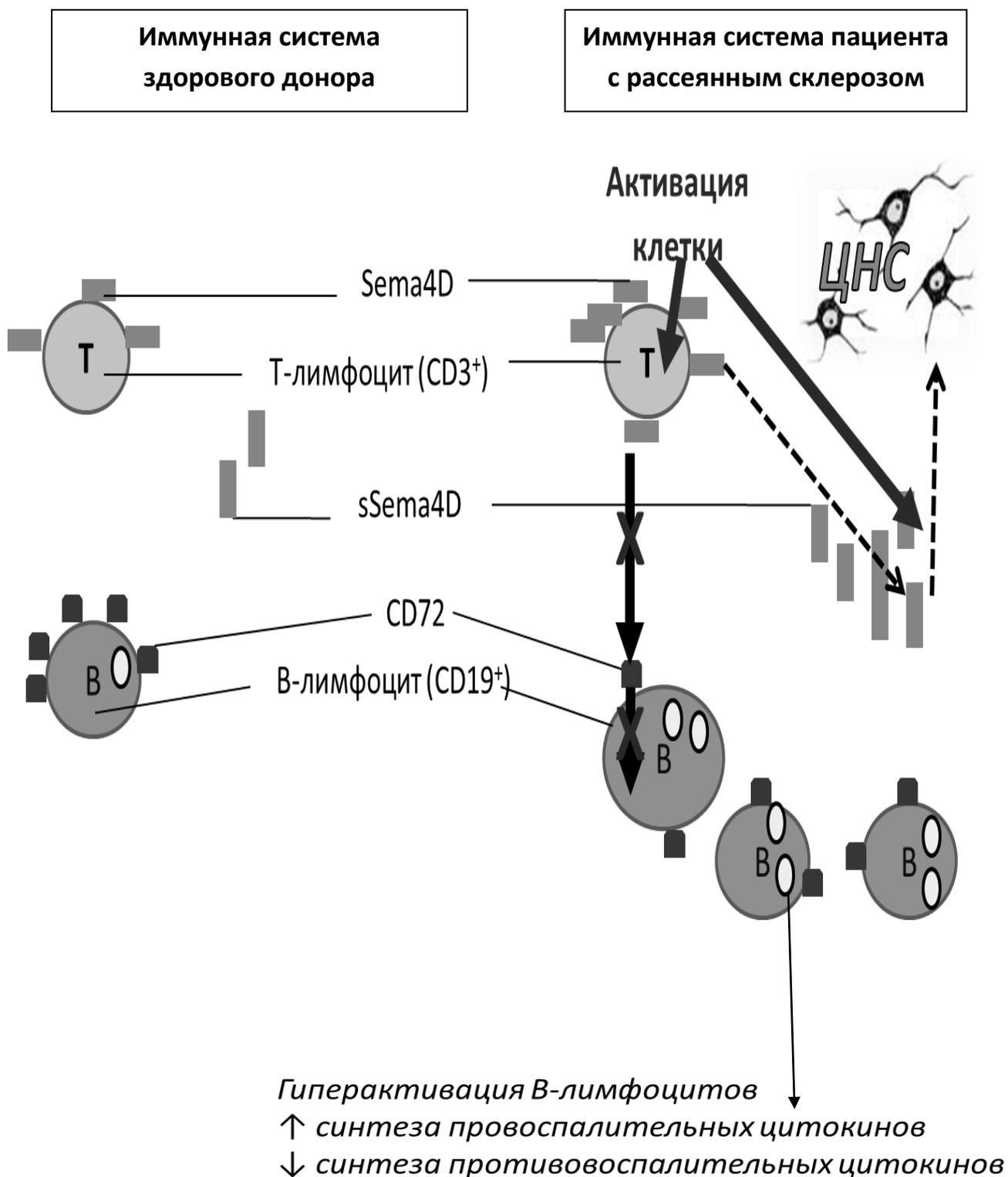


Рис. 7. Гипотетическая схема воздействия семафорина Sema4D/CD100 на клетки иммунной системы здоровых доноров и пациентов с рассеянным склерозом.

## ВЫВОДЫ

1. Наивные пациенты с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза характеризуются легкой степенью инвалидизации по шкале EDSS и умеренной скоростью прогрессирования заболевания, повышенным уровнем тревожности на уровне субклинической в сравнении со здоровыми донорами и не имеют отличий с данной группой по результатам когнитивного тестирования, при этом результаты нейропсихологического и когнитивного тестирования не различаются в стадии ремиссии и обострения, а нейровизуализационная активность заболевания преобладает при эксацербации рассеянного склероза.
2. Пациенты с ремиттирующим рассеянным склерозом как в стадию ремиссии, так и в стадию обострения имеют повышенный уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 на мембране Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$  клеток) при оценке *ex vivo*, а также демонстрируют более интенсивное отщепление этой молекулы от мембраны в случае активации клеток в культуре (показано на примере пациентов в стадии ремиссии заболевания), что может иметь место *in vivo* при ответе Т-лимфоцитов на антиген как в иммунной системе, так и в центральной нервной системе при данной патологии.
3. Уровень растворимого семафорина (sSema4D) повышен в плазме крови у пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом как в стадии ремиссии, так и в стадии обострения, и более интенсивно возрастает в условиях активации клеток в культуре (показано на примере пациентов в стадии ремиссии заболевания).
4. У пациентов с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза снижена экспрессия рецептора для Sema4D/CD100, CD72, на мембране В-лимфоцитов ( $CD19^+$  клеток) в стадии ремиссии, что, учитывая негативную роль молекулы CD72 в активации В-клеток, может быть одним из механизмов их гиперактивации при данной патологии.
5. Sema4D-CD72-зависимый сигнал задействован в контроле продукции цитокинов В-лимфоцитами, индуцируя у пациентов в стадии ремиссии рассеянного склероза синтез провоспалительных цитокинов и препятствуя синтезу противовоспалительных цитокинов, что, учитывая интенсивную инфильтрацию В-клетками центральной нервной системы при данной патологии, по-видимому, вносит вклад в развитие нейровоспаления и демиелинизацию нервных волокон.
6. Уровень экспрессии мембранной формы семафорина Sema4D/CD100 и процент  $CD100^+$  клеток в субпопуляции  $CD3^+CD4^+$  лимфоцитов ассоциирован со значением FS2 стволовых функций, а концентрация растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови имеет обратную корреляционную связь с продолжительностью заболевания у пациентов с

рассеянным склерозом в стадии ремиссии и прямую – с количеством контрастируемых очагов в головном мозге у пациентов с рассеянным склерозом в стадии обострения, что доказывает участие семафорина Sema4D/CD100 в патогенезе заболевания.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности экспрессии Т-лимфоцитами CD100 при ремиттирующем рассеянном склерозе / Е.М. Куклина, Т.В. Байдина, *И.Ю. Данченко*, И.В. Некрасова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 5 (42). – С. 50-52 (из перечня ВАК).
2. Экспрессия CD100/CD72 лимфоцитами периферической крови пациентов с рассеянным склерозом / Е.М. Куклина, Т.В. Байдина, *И.Ю. Данченко* и др. // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Том 7 (16), Номер 2-3, Апрель-Сентябрь. – С. 233 (из перечня ВАК).
3. Экспрессия семафорина CD100 на лимфоцитах периферической крови пациентов с ремиттирующим течением рассеянного склероза / Т.Н. Трушникова, Т.В. Байдина, *И.Ю. Данченко* и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, Рассеянный склероз, выпуск 2. – 2013. – Том 113, № 10. – С. 47-51 (из перечня ВАК).
4. Семафорин Sema4D в иммунной системе при рассеянном склерозе / Е.М. Куклина, Т.В. Байдина, *И.Ю. Данченко*, И.В. Некрасова // Бюллетень

экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Том 157, № 2. – С. 198-201 (из перечня ВАК).

5. Куклина, Е.М. Исследование функций В-лимфоцитов, несвязанных с продукцией антител, при рассеянном склерозе / Е.М. Куклина, Т.В. Байдина, *И.Ю. Данченко* // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Том 8 (17), № 3. – С. 545-547 (из перечня ВАК).

6. Уровень растворимого Sema4D у пациентов с рассеянным склерозом / Е.М. Куклина, И.В. Некрасова, *И.Ю. Данченко* и др. // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Том 8 (17), № 3. – С. 547-550 (из перечня ВАК).

7. Роль Sema4D/CD72-зависимого сигнала в регуляции активности В-лимфоцитов при рассеянном склерозе / Е.М. Куклина, И.В. Некрасова, Т.В. Байдина, *И.Ю. Данченко* // Доклады академии наук. – 2014. – Т. 458, № 3. – С. 359-362 (из перечня ВАК).

8. Оценка значения экспрессии семафорина CD100 лимфоцитами периферической крови и функции рецептора CD 72 в популяции CD19+-клеток в стадию ремиссии при рассеянном склерозе / Т.В. Байдина, *И.Ю. Данченко*, Т.Н. Трушникова и др. // «Рассеянный склероз и другие аутоиммунные заболевания нервной системы», Материалы VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции. ГБОУ ВПО Новосибирский Государственный Медицинский Университет. РФ. – 2013. – С. 12-20.

9. Изучение экспрессии семафорина CD100 на лимфоцитах периферической крови пациентов с рассеянным склерозом / *И.Ю. Данченко*, Т.Н. Трушникова, Е.М. Куклина, И.В. Некрасова // Научная сессия Пермской государственной медицинской академии имени академика Е.А. Вагнера, посвященная 90-летию со дня рождения профессора Я.С. Циммермана: сборник научных работ молодых ученых / ГБОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России. Пермь. – 2013. – 139 с. – С. 36-39.

10. Вовлечение семафорина SEMA4D в демиелинизирующее поражение нервной системы / *И.Ю. Данченко*, Т.В. Байдина, Т.Н. Трушникова, Е.М. Куклина // «Практическая медицина», Неврология. Рассеянный склероз, специальный выпуск. – 2013. – № 1-1 (68) – С. 51-53.

11. Исследование семафорина CD100 при ремиттирующем рассеянном склерозе / *И.Ю. Данченко*, Т.В. Байдина, Т.Н. Трушникова и др. // Нейроиммунология. – 2013. – Том XI, №1-2. – С. 43-44.

12. Features of Sema4D/CD72 expression in immune system in multiple sclerosis / Е.М. Kuklina, Т.В. Baidina, *I.Y. Danchenko*, I.V. Nekrasova // 15TH INTERNATIONAL CONGRESS

OF IMMUNOLOGY, MILAN, ITALY. BOOK OF ABSTRACTS. – 2013. – August 22-27. – P. 767.

13. *Данченко, И.Ю.* Семафорин Sema4D в стадию ремиссии и обострения при рассеянном склерозе / И.Ю. Данченко // «Неврология сегодня и завтра». «Кафедре неврологии и нейрохирургии Кировской государственной медицинской академии XXV лет». Сборник научно-исследовательских работ Межрегиональной научной конференции неврологов, нейрохирургов, детских неврологов и психиатров. Киров. – 2014. – С. 34-40.

14. *Данченко, И.Ю.* Изучение иммунных взаимодействий CD100-CD72 при рассеянном склерозе / И.Ю. Данченко // Нейроиммунология. – 2015. – Том XII, № 1–2. – С. 31-32.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**ЗД** – здоровые доноры

**МРТ** – магнитно-резонансная томография

**ПИТРС** – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза

**РС** – рассеянный склероз

**ЦНС** – центральная нервная система

**CD** – The Cluster of Differentiation, молекулы дифференцировки лимфоидных клеток

**EDSS** – Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала инвалидизации Курцке

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

**IL** – interleukin, интерлейкин

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

**MFI** – Mean Fluorescence Intensity, средняя интенсивность свечения

**MFI-20** – Multidimensional Fatigue Inventory, шкала субъективной оценки астении

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

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

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

**sSema4D** – soluble Sema4D, растворимая форма семафорина Sema4D

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