

## АНОТАЦІЯ

*Гичка К.М.* Розсіяний склероз: дослідження коморбідної патології та розробка діагностично-прогностичних критеріїв з використанням гліканових маркерів імуноглобулінів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина. – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2020.

Одним із пріоритетних напрямків сучасних наукових досліджень у клінічній неврології є вивчення нових патогенетичних механізмів розвитку розсіяного склерозу (РС) та пошук надійних критеріїв для його діагностики з метою оптимізації лікувальної тактики та оцінки прогнозу цього захворювання. Актуальність проблеми зумовлена також зростаючою поширеністю патології, більш тяжчим перебігом у разі коморбідних станів та відчутними її соціально-економічними наслідками (друге місце серед причин інвалідизації внаслідок хвороб нервової системи, потреба у довготривалому лікуванні та реабілітації), а також значною питомою вагою РС у структурі захворюваності населення молодого, працездатного віку.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і представлено новий підхід щодо покращення діагностики і лікування РС шляхом визначення нових діагностично-прогностичних біомаркерів цього захворювання у зразках сироватки крові та цереброспінальної рідини хворих осіб, вивчено структуру коморбідної патології при РС та особливості її виникнення у часовому зв'язку з першими проявами цього захворювання.

Викладено клініко-статистичний аналіз результатів клініко-неврологічного, радіологічного (МРТ-обстеження) та імунобіологічного обстеження 141-го хворого на РС різного віку та статі, які проходили комплексне амбулаторне або стаціонарне лікування на клінічній базі кафедри неврології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (неврологічне відділення КЗ ЛОР Львівської обласної клінічної лікарні) у період з 2016 по 2019 рр. Імунобіологічні дослідження сироватки крові та цереброспінальної рідини (ЦСР) були проведені на кафедрі

гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

На першому етапі власних досліджень вивчали особливості клінічного перебігу РС з урахуванням коморбідної патології, досліджували поширеність та структуру супутньої патології у обстежених хворих, визначали кореляційні зв'язки між віком пацієнтів на момент виникнення у них супутньої патології та інвалідизацією за розширеною шкалою оцінки ураження функціональних систем EDSS. Для вирішення цього завдання було обстежено 77 хворих на РС із загальної групи, у яких було документально підтверджено поєднання РС та супутньої патології.

На другому етапі наукової роботи досліджували діагностичне та прогностичне значення процесів глікозилювання імуноглобулінів у зразках сироватки крові та ЦСР у хворих на РС. Для вирішення цього завдання було проведено аналіз експонування гліканів імуноглобулінів у сироватці крові та лікворі пацієнтів із РС методом лектин-імуноферментного аналізу. Із загальної групи (n=141) дослідили 20 зразків сироватки крові хворих на РС, з них - 12 зразків ЦСР. Отримані результати у хворих порівнювали з показниками контрольної групи, яку склали 18 практично здорових осіб відповідного віку та статі, одноразових донорів Львівського обласного центру служби крові.

На третьому етапі дисертаційної роботи вивчали клініко-патогенетичні особливості демієлінізуючого процесу на етапі переходу клінічно ізольованого синдрому (КІС) в клінічно достовірний РС (КДРС) шляхом дослідження парних зразків сироватки крові та цереброспінальної рідини щодо глікозилювання імуноглобулінів. Для цього із 12-ти зразків сироваток крові та ЦСР хворих, описаних на другому етапі, було відібрано та проаналізовано сім пар зразків сироваток крові та ліквору. Також на цьому етапі досліджували інші патогенетичні маркери аутоімунного процесу, зокрема, зміни концентрації глікоформ IgG на молекулах імуноглобулінів хворих на РС та зміни вмісту гліканів імуноглобулінів у їх ЦСР і сироватці крові. Отримані результати порівнювали з показниками контрольної групи із

9-ти практично здорових осіб відповідного віку та статі - одноразових донорів Львівського обласного центру служби крові.

На четвертому етапі представленої наукової роботи, враховуючи особливості клінічного перебігу РС, його активність, прогресування, отримані нами нові дані щодо патогенетичних механізмів розвитку цього захворювання, досліджували процеси експонування глікозильних залишків на аутоантитілах до основного білка мієліну (ОБМ) та загальних антитілах сироватки крові хворих залежно від проведеного лікування. На цьому етапі обстежили 44 пацієнти із загальної групи (n=141), яких поділили на наступні підгрупи: наївні (неліковані) пацієнти – 17 осіб; хворі, які лікувалися інтерфероном  $\beta$ 1В (ІФН) у дозі 0,3 мг (9,6 млн МО) підшкірно через день, протягом 12 місяців - 15 осіб; пацієнти після терапії кортикостероїдами (1000 мг в/в краплино впродовж 5-ти днів) – 12 осіб. До контрольної групи увійшли 23 здорові особи відповідного віку та статі. При РС, як аутоімунному захворюванні, виникає багато типів аутоантитіл, які спричиняють демієлінізацію. Антитіла до основного білка мієліну (ОБМ) є домінуючими, саме тому ми обрали їх для дослідження. Для виділення специфічних анти-ОБМ антитіл із сироватки крові хворих на РС використовували кон'юганти рекомбінантного людського ОБМ із магнітними наноносіями. Визначали експонування досліджуваних лектинів на імуноглобулінах сироватки крові, після чого проводили розділення імуноглобулінів на тотальні і специфічні та порівнювали експонування глікозильних залишків на антитілах тотальних та аутоантитілах, притаманних РС.

Обстеження хворих розпочинали із клініко-неврологічного та соматичного огляду, збирали анамнез хвороби та життя пацієнтів. При клініко-анамнестичному аналізі оцінювали дані анамнезу, отримані під час розмови з хворим або взяті з медичної документації, з обов'язковим врахуванням віку і статі хворого, тривалості РС, з уточненням даних щодо супутніх захворювань чи станів. При клініко-неврологічному огляді оцінювали неврологічний статус, перебіг захворювання та тяжкість стану. Був здійснений детальний неврологічний огляд пацієнтів з оцінкою ступеня

інвалідизації за шкалою EDSS, а при детальному фізикальному обстеженні їх оглядали за системами організму, клінічно визначали наявність супутніх захворювань. За необхідністю проводили консультації інших спеціалістів (офтальмолога, кардіолога, ревматолога). Одночасне проведення загальних клініко-лабораторних, інструментальних (ультразвукових, радіологічних) та біохімічних досліджень у оглянутих пацієнтів дало змогу виключити патологію інших органів і систем, які б змогли вплинути на результати проведених імунологічних тестів.

Імунологічні дослідження включали: визначення загального вмісту імуноглобулінів IgG у зразках сироваток крові та ЦСР хворих на РС, визначення загального вмісту імунних комплексів імуноглобулінів IgG-IgM у зразках сироваток крові та ЦСР, лектин-імуноферментний аналіз для визначення глікозилювання імуноглобулінів, визначення гліканів методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції, афінну очистку препаратів імуноглобулінів IgG, мас-спектрометричний аналіз, кон'югацію антитіл із магнітними наноносіями, виділення специфічних аутоантитіл до основного білка мієліну.

Статистичний аналіз даних проводили з використанням програмного забезпечення OriginPro (OriginLab), Prism7 (GraphPad) та Excel (Microsoft). Для оцінки відмінності досліджуваних масивів даних використовували наступні критерії: для параметричних даних – t-критерій Стюдента (парний та непарний), дисперсійний аналіз (ANOVA) для визначення зв'язку між багатьма зразками; для непараметричних даних використовували U-критерій Манна-Уїтні для оцінки зв'язку між двома популяціями, чи тест множинного порівняння Дунна для порівняння усіх досліджуваних груп (здорові донори та групи з різним типом терапії). Аналіз парних зразків проводили за допомогою тесту Вілкоксона. Такий широкий спектр лабораторно-інструментальних обстежень обумовлений необхідністю поглиблення знань про дискусійні питання патогенезу розсіяного склерозу та розробки діагностично-прогностичних критеріїв цього захворювання.

Усі дослідження проводили з дотриманням основних положень

Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964 р. з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000 р.) та Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 року.

За результатами дисертації отримали нові дані про патогенетичні механізми розвитку РС, представлено новий підхід щодо покращення діагностики розсіяного склерозу із урахуванням коморбідної патології при цьому захворюванні та визначили нові діагностичні і прогностичні біомаркери цього захворювання шляхом дослідження змін глікозильних детермінант імуноглобулінів у зразках сироватки крові та ЦСР.

У результаті комплексного клініко-неврологічного аналізу виявлено, що в одного пацієнта із РС в середньому діагностувалось  $1,73 \pm 0,14$  випадків супутніх захворювань. Згідно МКХ-10 було констатовано наявність 16 класів коморбідних захворювань та діагностовано 61 вид нозологій: 26 у чоловіків та 48 у жінок. Найчастіше у пацієнтів із РС діагностували захворювання органів травлення – у  $18,80 \pm 3,39\%$  обстежених, кістково-м'язової системи, сполучної тканини – у  $17,29 \pm 3,28\%$  та органів дихання – у  $15,04 \pm 3,10\%$ . У поширеності коморбідної патології домінували остеохондроз ( $15,58 \pm 4,13$  випадки на 100 осіб) та гастродуоденіт ( $11,69 \pm 3,66$  випадки на 100 осіб).

Переважну більшість ( $p < 0,01$ ) випадків виникнення коморбідного захворювання було відзначено після дебюту РС. Встановили достовірні відмінності між віком хворих на момент дебюту розсіяного склерозу ( $p < 0,05$ ), віком пацієнтів на момент виникнення коморбідної патології ( $p < 0,05$ ), тривалістю РС ( $p < 0,01$ ), тривалістю супутнього захворювання ( $p < 0,01$ ) поміж пацієнтами, у яких супутня патологія виникла до дебюту розсіяного склерозу та пацієнтами, у яких коморбідне захворювання констатовано через певний час після появи перших симптомів цього захворювання. Ступінь важкості захворювання, оцінений у балах за шкалою інвалідизації EDSS, був вищим на 17,9% у пацієнтів із коморбідним захворюванням, що виникло після дебюту розсіяного склерозу, порівняно з тими, у кого воно зафіксовано до нього

( $3,49 \pm 0,14$  проти  $2,96 \pm 0,19$ ). Найбільший інтервал ( $12,17 \pm 3,74$  років) між моментом виникнення супутньої патології та дебютом РС був у пацієнтів із ендокринними захворюваннями, розладами харчування і порушенням обміну речовин. Після дебюту РС найдовший інтервал до виникнення супутньої патології спостерігався у пацієнтів, яким діагностували захворювання сечостатевої системи -  $11,00 \pm 2,52$  років.

Встановлено зв'язок коморбідної патології із розвитком РС, показано, що не лише РС впливає на клінічний перебіг супутніх захворювань, а й супутні захворювання роблять перебіг РС важчим. У разі коморбідності РС з низкою захворювань та станів нарастають темпи його прогресування та важкість.

Показано, що зміни глікозилювання імуноглобулінів IgG визначають їх про- чи антизапальний вплив. Довели, що РС притаманна поява імуноглобулінів IgG із зміненим спектром глікозилювання, які володіють патологічними прозапальними властивостями.

Підтвердили зростання окремих глікоформ IgG при РС. Різноманітність гліканів у складі імуноглобулінів, а також вплив імуноглобулінів на функцію антитіл визначає їх маркерні властивості при РС і потенційні терапевтичні можливості, оскільки знаючи конфігурацію необхідного глікану прозапальні антитіла можна перетворити в антизапальні. Розробили тести для оцінки нативних форм гліканів IgG, використовуючи метод лектин-імуноферментного аналізу для паралельного виявлення глікозилювання IgG в сироватці та ЦСР хворих на РС. Рівень експонування сіалових залишків був вищим у сироватках крові хворих на РС та набагато нижчим у цереброспінальній рідині. Підтвердили, що в досліджуваних зразках ліквору та сироватках крові пацієнтів із РС відбуваються значні зміни експонування термінальних сіалових кислот та корових фукозильних залишків, які не пов'язані зі зміною кількості самих N-гліканів чи появою додаткових сайтів глікозилювання на молекулах імуноглобулінів. Отримані дані свідчать про відсутність імунних комплексів у зразках ЦСР досліджуваних пацієнтів, оскільки отримані значення близькі до інструментальної межі детекції.

Виявлені істотні зміни гліканових маркерів у складі імуноглобулінів IgG

у сироватках крові здорових донорів, хворих на РС та ЦСР пацієнтів із РС, які дозволяють відрізнити як сироватку здорових донорів від сироватки хворих, так і ЦСР від сироватки пацієнтів із РС, що несе в собі важливий діагностично-прогностичний потенціал при цьому захворюванні. Показали, що зміни гліканів імуноглобулінів у сироватках крові пацієнтів із РС носять прозапальний характер. Глікозилювання імуноглобулінів ЦСР достовірно різниться від глікозилювання імуноглобулінів сироватки крові, і тому відображає досі невідому властивість імуноглобулінів ЦСР до зміненого глікозилювання. Змінене глікозилювання виявили для фукозовмісних та сіаловмісних гліканів імуноглобулінів IgG, визначили його важливе діагностичне значення при РС, оскільки детекція вказаних показників у сироватці крові є набагато простішим та доступнішим методом діагностики у порівнянні з дослідженням ліквору. Клінічно підтвердили, що процес глікозилювання імуноглобулінів проявляється підвищенням активності захворювання на РС та корелює із збільшенням тривалості хронічного запального процесу.

Імуноглобуліни у ЦСР хворих на РС містять достовірно менше мішеней зв'язування лектинів SNA та PSqL - залишків сіалової кислоти приєднаної  $\alpha$ 2,6-зв'язком до галактози у складі розгалужених N-гліканів ( $p < 0,001$ ), достовірно вищу кількість мішеней лектину AAL - залишків фукози приєднаних до корового залишку N-ацетилгалактозаміну ( $p < 0,05$ ) та збільшену кількість мішеней зв'язування лектину LCA ( $p < 0,05$ ) у порівнянні із сироваткою пацієнтів, хворих на РС. Підтвердили, що глікан-ліганд лектину AAL на молекулі IgG може слугувати показником тривалості, активності та прогресування захворювання і накопичення в організмі IgG із зміненим спектром гліканів, що важливо для визначення початку захворювання на РС.

Обґрунтували використання детекції глікозилювання IgG як молекулярного маркера запальних процесів при РС і показали, що саме запальна аутоімунна природа РС призводить до зростання корових фукозильних залишків гліканів IgG, а також запропоновано методи їх

ефективної детекції як в ЦСР, так і в сироватці крові.

Дослідження процесів глікозилювання антитіл у лікворі та сироватці крові пацієнтів із РС є надзвичайно важливим як з позиції розгляду їх як ключової ланки в патогенезі захворювання, так і як надійного діагностичного біомаркера цього патологічного стану та біомаркера переходу клінічно ізольованого синдрому розсіяного склерозу (КІС) в клінічно достовірний розсіяний склероз (КДРС).

Виявили, що зміни глікозилювання імуноглобулінів відбуваються в усіх субкласах імуноглобулінів IgG.

При аналізі зміни глікоформ IgG встановили, що зміни глікоформ при РС співпадають з такими ж змінами, раніше описаними для інших аутоімунних захворювань. При РС відбувається зростання вмісту бісектуючих форм гліканів, що пояснює зростання зв'язування лектину LCA та, можливо, AAL. Дослідження нових патогенетичних механізмів РС має наукове та практичне значення і є перспективним для подальшого вивчення.

Аналіз методами капілярного електрофорезу та мас-спектрометрії показав, що зростання експонування мішеней зв'язування лектину LCA на імуноглобулінах ЦСР при РС пов'язане із збільшенням вмісту бісектуючих (повністю чи частково) десіалованих форм гліканів, зокрема FABG2S1, FA2B(6)G1, FA2BG2. Водночас, в ЦСР вміст бісектованих глікоформ був достовірно нижчим ( $p < 0,05$ ) у порівнянні із зразками сироваток на усіх досліджуваних субкласах імуноглобулінів, як от IgG1, IgG2/3 та IgG4. Достовірно нижчий вміст сіалових кислот у ЦСР, у порівнянні з сироваткою, виявлено лише для субкласу імуноглобулінів IgG4 ( $p < 0,05$ ) у ЦСР у порівнянні із сироваткою крові. Отже, змінені глікоформи імуноглобулінів IgG можуть слугувати біомаркером аутоімунного процесу при розсіяному склерозі.

Визначили, що зростання корових фукозильних залишків відбувається саме на аутоантитілах притаманних РС. Виявили, що зміна глікозилювання антитіл сироватки крові хворих, що спостерігалась у групах пацієнтів із РС, як нелікованих, так тих хто зазнавав терапії кортикостероїдами чи ІФН  $\beta$ -1В,

відбувались внаслідок появи патологічних аутоантитіл. Встановили, що отримані дані вказують на важливість виявлення саме патологічних аутоантитіл та оцінки їх глікозилювання як маркера важкості перебігу РС.

Група хворих на РС, що зазнавала терапії інтерфероном  $\beta$ -1В характеризувалась зменшеним рівнем антитіл до ОБМ класів IgG та IgM, у порівнянні з нелікованими хворими. Рівні антитіл наближались до таких у клінічно здорових донорів.

Після проведеної терапії спостерігався посилений рівень експонування антизапальних сіалових залишків на молекулах IgG та асоційованих нативних імунних комплексах, а також посилене експонування фукозилюваних корових триманозидних залишків на молекулах IgG та асоційованих нативних імунних комплексах.

Проаналізувавши історії хвороб пацієнтів із КІС підсумували, що діагностика РС на ранніх стадіях є надзвичайно складним процесом, який, однак, має важливе значення для вибору тактики лікування і, відповідно, прогнозу подальшого його перебігу.

Висловили припущення, що визначення олігоклональних IgG у ЦСР у хворих на РС є більш чутливим методом при постановці достовірного діагнозу РС, порівняно із даними МРТ дослідження.

Встановили, що при РС має місце змінене глікозилювання антитіл у ЦСР та сироватці крові хворих. Цей показник є одним із ключових, що задіяні в патогенезі РС, а також слугує надійним біомаркером активності, прогресування РС та терапевтичної відповіді при цьому патологічному стані, що дозволяє покращити діагностику вказаного захворювання і оцінити ефективність проведеної терапії.

**Ключові слова:** розсіяний склероз, коморбідність, біомаркери, імуноглобуліни, глікозилювання.

## ABSTRACT

*Hychka K.M.* Multiple sclerosis: the study of comorbid pathology and elaboration of diagnostic and prognostic criteria using glycan markers of immunoglobulins. - Qualifying research paper with manuscript copyright.

Ph.D. thesis with a degree in 222 – Medicine. – Danylo Halytsky Lviv National Medical University Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2020.

One of the priorities in modern scientific research in clinical neurology is the study of new pathogenetic mechanisms of multiple sclerosis (MS) and the search for reliable diagnostic criteria with a view to optimizing treatment strategy and assessing the prognosis of the disease. The issue relevance is caused by an increasing prevalence of pathology, its more severe course for comorbidities and its notable social and economic consequences (it is ranked second among the causes of disability resulted from nervous system disorders, the need for long-term treatment and rehabilitation), as well as MS predominance among a working-age youth.

The thesis presents a conceptual synthesis and a new approach to improving the MS diagnosis and treatment by identifying new diagnostic and prognostic biomarkers in patients' blood serum and cerebrospinal fluid samples. The structure of comorbid pathology in MS and the peculiarities of MS occurrence in temporal connection with the first showing of the disease were studied.

Clinical and statistical analysis with the results of clinical and neurological, radiological (MRI scanning) and immunobiological testing of 141 MS patients of different age and gender was outlined. In 2016-2019, the patients received comprehensive outpatient or inpatient treatment on the clinical basis of the Department of Neurology of Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Department of Neurology of CNE LRC Lviv Regional Clinical Hospital). Immunobiological studies of blood serum and cerebrospinal fluid (CSF) were carried out at the Department of Histology, Cytology and Embryology of Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

At the first stage of research paper, MS clinical course peculiarities in the light of comorbid pathology were studied, the prevalence and structure of comorbid

pathology in patients were investigated, and correlations between the patients' age at the time of comorbid pathology and disability on the Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) were determined. To that end, 77 MS patients of the general group were examined, with the combination of MS and comorbid pathology documented.

At the second stage of research paper, the diagnostic and prognostic value of immunoglobulin glycosylation processes in MS patients' blood serum and CSF samples was investigated. To that end, the exposure of immunoglobulin glycans in MS patients' blood serum and cerebrospinal fluid by lectin-enzyme-linked immunosorbent assay (lectin ELISA) was analysed. 20 blood serum samples of MS patients from the general group (n = 141) were examined, of which 12 were CSF samples. The findings of MS patients were compared with those of the control group consisted of 18 generally healthy individuals of the appropriate age and gender who once donated blood at the Lviv Regional Blood Service Center.

At the third stage of the thesis, clinical and pathogenetic peculiarities of demyelination at the time of transition of clinically isolated syndrome (CIS) to clinically definite MS (CDMS) were studied by examining paired samples of blood serum and cerebrospinal fluid for immunoglobulin glycosylation. To that end, of 12 blood serum and CSF samples of patients described at the second stage, 7 paired samples of blood serum and cerebrospinal fluid were selected and analysed. At this stage, other pathogenetic markers of the autoimmune process were studied; in particular, changes in the concentration of IgG glycoforms on immunoglobulin molecules of MS patients and changes in the content of immunoglobulin glycans in the CSF and blood serum. The findings were compared with those of the control group consisted of 9 generally healthy individuals of the appropriate age and gender who once donated blood at the Lviv Regional Blood Service Center.

At the fourth stage of research work, taking into account MS clinical course peculiarities, MS activity and advance, our findings on the pathogenic mechanisms of the disease development, the exposure of glycosyl residues on myelin basic protein (MBP) autoantibodies and total antibodies in blood serum of patients depending on the treatment strategy were studied. At this stage, 44 patients of the

general group (n = 141) were examined, which were divided into subgroups: naive patients (those who did not get treatment) - 17 people; patients who were under interferon  $\beta$ 1B (IFN) therapy at a dose of 0.3 mg (9.6 million IU) s/c every other day for 12 months - 15 people; patients after corticosteroid therapy (1000 mg iv infusion for 5 days) - 12 people. The control group included 23 healthy individuals of the appropriate age and gender. In MS, as an autoimmune disease, there are many types of autoantibodies that cause demyelination. MBP antibodies are dominant, that is why we chose them for our study. Conjugates of recombinant human MBP with MRI scans were used for isolating specific anti-MBP antibodies from MS patients' blood serum. The exposure of lectins to serum immunoglobulins was determined, after that, immunoglobulins were separated into total and specific, and the exposure of glycosyl residues on total antibodies and on MS specific autoantibodies was compared.

The examination of patients was started with clinical, neurological and physical check-ups, and a collection of information about the disease and their life. During clinical and anamnestic analysis, information obtained during conversation with patients or taken from their medical records were assessed, taking into account their age and gender, MS duration, and clarifying information on coexisting diseases or conditions. The neurological status, disease course and condition severity were assessed during clinical and neurological check-ups. A detailed neurological examination of patients was carried out assessing disability on the EDSS scale. During a detailed physical examination, patients were examined for body systems with clinical determination of coexisting diseases. Where necessary, there were consultations with other specialists (ophthalmologist, cardiologist, and rheumatologist). General clinical laboratory and biochemical testing, as well as instrumental scanning (ultrasound and radiological), which were simultaneously carried out, made it possible to exclude pathology of other organs and systems that could affect the results of immunological testing.

Immunological testing included: determination of the total content of IgG antibodies in MS patients' blood serum and CSF samples, determination of the total content of immune complexes containing IgG and IgM antibodies in blood serum

and CSF samples, determination of immunoglobulin glycosylation by lectin ELISA, determination of glycans by capillary electrophoresis technique - laser-induced fluorescence, affinity chromatography of IgG antibody preparations, mass spectrometric analysis, conjugation of antibodies with MRI scans, isolation of specific MBP autoantibodies.

The statistical data analysis was performed using OriginPro (OriginLab), Prism7 (GraphPad), and Excel (Microsoft) software. The following criteria were used for assessing differences in data sets: for parametric data – the Student's t-test (paired and unpaired), for determining a correlation between many samples – the analysis of variance (ANOVA); for nonparametric data - the Mann–Whitney U test to assess a correlation between two populations, or the Dunn's multiple comparison test for comparing all study groups (healthy donors and groups with different types of therapy). Paired samples were analysed using the Wilcoxon signed-rank test. The broad scope of laboratory and instrumental examinations is due to the need for enhancing knowledge about discussion points of the pathogenesis of multiple sclerosis and the need for developing diagnostic and prognostic criteria of the disease.

All studies were carried out in compliance with the basic provisions of the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, the World Medical Association Declaration of Helsinki about Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (as of 1964 as amended, including the 2000 version), and the MoH of Ukraine Order No. 690 as of September 23, 2009.

The thesis findings provided new data on the pathogenetic mechanisms of MS development, presented a new approach for improved diagnosis of multiple sclerosis including comorbid pathology in MS and identified new diagnostic and prognostic biomarkers of the disease by examining changes in immunoglobulin glycosyl determinants in blood serum samples.

The comprehensive clinical and neurological analysis revealed that one MS patient had been diagnosed with an average of  $1.73 \pm 0.14$  of coexisting diseases. According to ICD-10, there were 16 classes of comorbid diseases were established and 61 types of nosology were diagnosed: 26 - in men and 48 - in women. MS

patients were mostly diagnosed with digestive system diseases - in  $18.80 \pm 3.39\%$  of patients, musculoskeletal system and connective tissue diseases -  $17.29 \pm 3.28\%$  of patients, and respiratory diseases -  $15.04 \pm 3.10\%$  of patients. The prevalence of comorbid pathology was dominated by osteochondrosis ( $15.58 \pm 4.13$  cases per 100 people) and gastroduodenitis ( $11.69 \pm 3.66$  cases per 100 people).

The vast majority ( $p < 0.01$ ) of comorbidity cases was noted after the onset of MS. Reliable differences between the age of patients were found at onset of multiple sclerosis ( $p < 0.05$ ), the age of patients at the time of comorbid pathology ( $p < 0.05$ ), the duration of MS ( $p < 0.01$ ), the duration of comorbid disease ( $p < 0.01$ ) between patients with coexisting pathology developed before the onset of multiple sclerosis and patients with comorbid disease diagnosed some time after the onset of the disease. The disease severity, assessed in points on the EDSS scale, was higher by 17.9% in patients with comorbid disease that occurred after the onset of MS, compared with those who had it before the onset of MS ( $3.49 \pm 0.14$  vs.  $2.96 \pm 0.19$ ). The longest interval ( $12.17 \pm 3.74$  years) between the time of comorbid pathology and the onset of MS was in patients with endocrine diseases nutritional disorders and metabolic disorders. After the onset of MS, the longest interval before the onset of comorbid pathology was observed in patients diagnosed with genitourinary diseases -  $11.00 \pm 2.52$  years.

The comorbid pathology and MS development were associated. It was shown that not only MS affects the clinical course of coexisting diseases, but also coexisting diseases make the course of MS more severe. In the case of MS comorbidity with a number of diseases and conditions, the rates of its advance and severity increase.

It was shown that changes in IgG glycosylation determine their pro- or anti-inflammatory effects. It was proved that the onset of IgG immunoglobulins with altered glycosylation spectrum and pathological pro-inflammatory properties is prevalent in MS.

The growth of individual IgG glycoforms in MS was confirmed. The variety of glycans in immunoglobulins, as well as the effect of immunoglobulins on antibody function determine their marker properties in MS and therapeutic potential,

because knowing the configuration of a glycan proinflammatory antibodies can be converted into anti-inflammatory ones. Tests for assessing native IgG glycans were developed using the lectin-ELISA method for a parallel detecting of IgG glycosylation in MS patients' blood serum and CSF. The exposure rate of sialic acid residues was higher in MS patients' blood serum and much lower in MS patients' cerebrospinal fluid. It was confirmed that in MS patients' blood serum and CSF samples there are significant changes in the exposure of terminal sialic acids and measles fucose residues, which are not associated with changes in the amount of N-glycans or the appearance of extra glycosylation sites on immunoglobulin molecules. The findings show no immune complexes in patients' CSF samples, as the values obtained are close to the instrument detection limit.

It was revealed that major changes in glycan markers in the composition of IgG antibodies in blood serum of healthy donors and MS patients, in CSF of MS patients, that allow for both healthy donors' blood serum to be distinguished from unhealthy patients' blood serum, as well as CSF to be distinguished from MS patients' blood serum, bear an important diagnostic and prognostic potential for the disease. It was shown that changes in the immunoglobulin glycans in the MS patients' blood serum are pro-inflammatory. Immunoglobulin glycosylation in CSF significantly differs from immunoglobulin glycosylation in blood serum, and therefore reflects still unknown property of immunoglobulins in CSF towards altered glycosylation. Altered glycosylation was observed in IgG glycans containing fucose and sialic acid residues. Its important diagnostic value in MS was also determined, as it is a much simpler and more accessible diagnostic method for finding these indicators in blood serum rather than in cerebrospinal fluid. It was clinically confirmed that the immunoglobulin glycosylation is manifested by an advance in MS activity and correlates with a chronic inflammatory process prolongation.

Immunoglobulins in MS patients' CSF contain significantly fewer targets for binding lectins SNA and PSqL - sialic acid residues attached to galactose in branched N-glycans ( $p < 0,001$ ) by  $\alpha 2,6$ -linkage, significantly higher number of targets for lectin AAL - fucose residues attached to the core residue of N-acetylgalactosamine ( $p < 0.05$ ) and increased number of targets for binding lectin

LCA ( $p < 0.05$ ) compared to MS patients' blood serum. It was confirmed that the glycan ligand of lectin AAL on the IgG molecule may indicate the disease duration, activity and advance, as well as accumulation of IgG with altered glycans in the body, what is essential for identifying the onset of MS.

The use of IgG glycosylation as a molecular marker of inflammatory processes in MS was substantiated. It was shown that the MS inflammatory autoimmune nature results in the growth of core fucose residues of IgG glycans. In addition, methods for their effective detection in both CSF and serum were proposed.

The study of immunoglobulin glycosylation in MS patients' cerebrospinal fluid and blood serum is extremely important both in the terms of considering them as a key link in the pathogenesis of the disease and as a reliable diagnostic biomarker of a pathosis and a biomarker of the transition of clinically isolated syndrome (CIS) to clinically definite multiple sclerosis (CDMS).

It was found that changes in the immunoglobulin glycosylation occur in all subclasses of IgG antibodies.

When analysing changes in IgG glycoforms, it was found that changes in glycoforms in MS coincide with the same changes previously described for other autoimmune diseases. In MS, there is an increase of bisecting glycans, which explains the increase in the binding of lectin LCA and probably AAL. The study of new pathogenetic mechanisms of MS has scientific and practical significance and is promising for further investigation.

Analysis by capillary electrophoresis and mass spectrometry showed that the increase in exposure of binding targets of lectin LCA on CSF immunoglobulins in MS is associated with the increase in bisecting (fully or partially) desialated forms of glycans, in particular FABG2S1, FA2B(6)G1, and FA2B2. Meanwhile, the content of bisected glycoforms in the CSF was significantly lower ( $p < 0.05$ ) compared with blood serum samples in all subclasses of immunoglobulins, such as IgG1, IgG2/3, and IgG4. Compared with blood serum, significantly lower content of sialic acids in the CSF was found only for IgG4 subclass ( $p < 0.05$ ). Therefore, altered glycoforms of IgG antibodies may be an autoimmune process biomarker in

multiple sclerosis.

It was determined that the growth of core fucose residues occurs on MS specific autoantibodies. It was found that the change in glycosylation of serum antibodies in MS patients, both who did not get any treatment and those who were under corticosteroid or IFN  $\beta$ -1B therapy, resulted from the onset of pathological autoantibodies. It was established that findings indicate the importance of detecting pathological autoantibodies and assessing their glycosylation as a marker of MS severity.

Compared with patients who did not get any treatment, the group of MS patients that were under interferon  $\beta$ -1B therapy, was characterized by a decrease in IgG and IgM antibodies to MBP. Antibody levels approached those of clinically healthy donors.

After therapy, there was an increased exposure of anti-inflammatory sialic acid residues on IgG molecules and associated native immune complexes, as well as increased exposure of core fucose trimanoside residues on IgG molecules and associated native immune complexes.

Having analysed CIS patients' medical records, it was concluded that an early diagnosis of MS is an extremely difficult process, however, which is important for a choice of treatment strategy and, accordingly, the prognosis of its further course.

It was suggested that the determination of oligoclonal IgG in CSF in MS patients is a more sensitive method for reliable diagnosing of MS, compared with MRI data.

It was found that in MS there is an altered glycosylation of antibodies in patients' CSF and blood serum. This rate is one of the key ones involved in the pathogenesis of MS, and is as a reliable biomarker of MS activity and advance, and therapeutic response of the pathosis, which helps to improve the diagnosis of the disease and to assess treatment efficacy.

**Key words:** multiple sclerosis, comorbidity, biomarkers, immunoglobulins, and glycosylation.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Knopf J, Magorivska I, Maler J, Spitzer P, Bilyy R, Biermann M, **Ничка К**, Bondt A, Wuhrer M, Toes R, Schett G, Herrmann M, Muñoz L. Low amounts of bisecting glycans characterize cerebrospinal fluid-borne IgG. *Journal of neuroimmunology* 2018;(320):19-24. (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).
2. Magorivska I, Dönczö B, Dumych T, Karmash A, Boichuk M, **Ничка К**, Mihalj M, Szabó M, Csánky E, Rech J, Guttman A, Vari SG, Bilyy R. Glycosylation of random IgG distinguishes seropositive and seronegative rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*.2018:1-7. (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).
3. **Гичка КМ**. Характеристика коморбідних захворювань у пацієнтів із розсіяним склерозом залежно від його дебюту. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2018;(2):63-68.
4. **Гичка КМ**, Негрич ТІ. Аналіз коморбідних захворювань у хворих на розсіяний склероз. *Український неврологічний журнал*. 2017;4(45):11-18. . (Особистий внесок – брала участь у формулюванні ідеї та гіпотези роботи, проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).
5. **Гичка КМ**. Неврологічна коморбідність при розсіяному склерозі. *Прикарпатський вісник НТШ. Пульс*. 2017;(8):119-130.
6. Негрич ТІ, **Гичка КМ**, Матвієнко ЮО. Больові та вертеброгенні синдроми у хворих на розсіяний склероз. *Медичні науки. Праці наукового товариства ім.Шевченка* 2018;(52):46-57.(Особистий внесок – брала участь у формулюванні мети роботи, проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).
7. **Гичка КМ**, Бойчук МО, Думич ТІ, Парижак СЯ, Білий РО, Негрич ТІ. Оцінка впливу терапії інтерфероном  $\beta$ -1b на рівень та патологічну природу

імуноглобулінів IgG у хворих на розсіяний склероз. Запорожський медичний журнал. 2018;(6):762-767. (Особистий внесок – брала участь у формулюванні мети роботи, проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).

8. **Гичка КМ.** Зміна глікозильних детермінант імуноглобулінів у хворих на розсіяний склероз як діагностичний маркер захворювання. Міжнародний неврологічний журнал. Том 16, №1 22-29, 2020

9. **Гичка К.М.,** Негрич Т.І., Білий Р.О. Дослідження процесів глікозилювання антитіл у сироватці крові та цереброспінальній рідині хворих на розсіяний склероз як біомаркер при цьому захворюванні. Том 16, №3,2020 Міжнародний неврологічний журнал

Тези доповідей:

10. Негрич ТІ, **Гичка КМ.** Характеристика пацієнтів із розсіяним склерозом з коморбідними захворюваннями в анамнезі-тези. XXIV Львівський медичний Форум.2018: 61–62. (Особистий внесок – брала участь у проведенні літературного пошуку, визначенні мети роботи, проведенні досліджень, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).

11. Paryzhak S, Bilyy R, Dumych T, Herrmann M, Nehrych T, **Ничка К,** Muñoz E, Voichuk M. Glycosylation of IGG in patients with multiple sclerosis at different treatment conditions.EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2017).8 - 11 September 2017 in Lviv, Ukraine. 2017p. с.20. (Особистий внесок – брала участь у проведенні літературного пошуку, визначенні мети роботи, проведенні досліджень, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).

12. **Гичка КМ.** Вивчення ефективності терапії інтерфероном  $\beta$ -1b на рівень та патологічну природу імуноглобулінів IgG у хворих на розсіяний склероз. К.М. Гичка XXV Львівський медичний Форум.2019.