

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Гичка Катерина Миколаївна

УДК : 616.832-004.2:57.082.13:616.155.37-097]-037

ДИСЕРТАЦІЯ

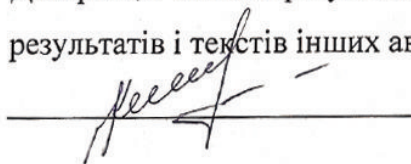
**« Розсіяний склероз: дослідження коморбідної патології та розробка
діагностично-прогностичних критеріїв з використанням гліканових
маркерів імуноглобулінів»**

222 – медицина

22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 Гичка К.М.

Науковий керівник: Негрич Тетяна Іванівна, доктор медичних наук, професор

Львів – 2020

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 β 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 домінантними, 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 глікозилування 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 наростають 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 α 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 (KIC) 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 β -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 β -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 фукозилізованих 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 (whose who did not get treatment) - 17 people; patients who were under interferon β 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 ± 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 ± 4.13 cases per 100 people) and gastroduodenitis (11.69 ± 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 ± 0.14 vs. 2.96 ± 0.19). The longest interval (12.17 ± 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 ± 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 β -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 β -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, Wuhler 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 β -1b на рівень та патологічну природу імуноглобулінів IgG у хворих на розсіяний склероз. Запорозький 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. 2020;16(1):22-29.

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. Міжнародний неврологічний журнал. 2020;16(3):22-29.

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, **Hychka K**, Muñoz E, Boichuk 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. c.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 β -1b на рівень та патологічну природу імуноглобулінів IgG у хворих на розсіяний склероз. К.М. Гичка XXV Львівський медичний Форум.2019.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	23
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ПАТОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ ТА ОСОБЛИВОСТІ КОМОРБІДНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ПРИ ЦЬЙ ПАТОЛОГІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	33
1.1. Визначення коморбідності та її вплив на клінічний перебіг хронічних захворювань	33
1.1.1. Неврологічна коморбідність при розсіяному склерозі.....	37
1.1.2. Особливості перебігу розсіяного склерозу при больових та вертеброгенних синдромах.....	46
1.2. Роль глікозилювання імуноглобулінів в патогенезі розсіяного склерозу	51
1.3. Імуноглобуліни церебро-спінальної рідини при розсіяному склерозі ...	57
1.4. Біомаркери церебро-спінальної рідини при розсіяному склерозі	60
Висновки до розділу 1	64
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	67
2.1. Загальна характеристика хворих та дизайн дослідження	67
2.2. Методи дослідження	72
2.2.1. Клініко-неврологічні методи дослідження	72
2.2.2. Імунологічні лабораторні методи дослідження	73
2.2.3. Статистична обробка отриманих результатів	78
Висновки до розділу 2	80
РОЗДІЛ 3. КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСТЕЖЕНИХ ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ З КОМОРБІДНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ В АНАМНЕЗІ	82
Висновки до розділу 3	96
РОЗДІЛ 4. ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЗМІН ГЛІКОЗИЛЬНИХ	

ДЕТЕРМІНАНТ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА ЦЕРЕБРО-СПІНАЛЬНІЙ РІДИНІ ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ, ЯК МАРКЕРА ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ЦЬОМУ ЗАХВОРЮВАННІ	98
4.1. Дослідження глікозилювання імуноглобулінів у зразках сироватки крові та цереброспінальної рідини хворих на розсіяний склероз	99
4.2. Дослідження парних зразків сироватки крові та церебро-спінальної рідини хворих на розсіяний склероз щодо змін глікозилювання імуноглобулінів	109
4.3. Аналіз вмісту глікоформ IgG при розсіяному склерозі методом капілярного-електрофорезу-індукованої лазером флуоресценції	124
4.4. Зміни гліканів імуноглобулінів у церебро-спінальній рідині та сироватці крові хворих на розсіяний склероз	129
Висновки до розділу 4	136
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА ДІАГНОСТИЧНО-ПРОГНОСТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЗМІН ГЛІКОЗИЛЮВАННЯ АУТОАНТИТІЛ ДО ОСНОВНОГО БІЛКА МІЄЛІНУ ПРИ РОЗСІЯНОМУ СКЛЕРОЗІ	138
5.1. Створення магнітних мікрокон'югатів на основі основного білка мієліну та їх використання для виділення аутоантитіл до основного білка мієліну із сироватки крові хворих на розсіяний склероз	138
5.2. Визначення експонування глікозильних залишків на аутоантитілах до ОБМ та загальних антитілах сироватки крові хворих на розсіяний склероз залежно від клінічних особливостей захворювання та проведеної терапії	140
Висновки до розділу 5	148
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	149
ВИСНОВКИ	167
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	170
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	172

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ADCC – антитіло-залежна клітинна цитотоксичність

AAL – лектин алеврії оранжевої (*Aleuria aurantia*)

aAT - аутоантитіла класу IgG

CMT1C - хвороба Шарко-Марі-Тутта типу 1C

CXCL13 - ліганд хемокіна 13

EDSS – Expanded Disability Status Scale (розширена шкала оцінки ступеня інвалідизації)

GFAP - гліальний фібрилярний кислий білок

ILAE – Міжнародна протиепілептична ліга

IgG – імуноглобуліни класу G

IVIG – довенний IgG

LCA – лектин сочевиці звичайної (*Lens culinaris*)

NfL - нейрофіламенти

PSqL – лектин трутовика лускатого (*Polyporus squamosus*)

SNA – лектин бузини чорної (*Sambucus nigra*)

TNF- α - Фактор некрозу тканин

АІЗ – аутоімунні захворювання

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ВАШ - візуальна аналогова шкала болю

ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр

ГСН - гострі симптоматичні напади

ЕН – епілептичні напади

ЕЕГ - електроенцефалографія

ЗФР – забуферний фізіологічний розчин

ІК – імунний комплекс

ІФА – імуноферментний аналіз

ІФН – інтерферон

ІХС – ішемічна хвороба серця

КЕ-ІЛФ – метод капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції

КДРС – клінічно достовірний розсіяний склероз

КІС – клінічно ізольований розсіяний склероз

КЗ ЛОР «ЛОКЛ» – комунальний заклад Львівської обласної ради «Львівська обласна клінічна лікарня»

МГ – міастенія гравіс

МКХ-10 – міжнародна класифікація хвороб 10 перегляду

мРНК - матрична рибонуклеїнова кислота

МРТ – магнітно-резонансна томографія

ОБМ – основний білок мієліну

ОБМГ - опитувальник болю МакГілла

ОГ – оптична густина

ОКА – олігоклональні антитіла

ОКС – олігоклональні смуги

ПЕТ - протиепілептичної терапії

РС – розсіяний склероз

СЧВ - системний червоний вовчак

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

ТСБ – трисольовий буфер

ХОЗЛ – хронічне обструктивне захворювання легень

ЦНС – центральна нервова система

ЦСР – цереброспінальна рідина

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Розсіяний склероз (РС) є аутоімунним захворюванням, частка якого становить 11 % від усіх захворювань нервової системи [1,2,3]. 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 зростаючою поширеністю патології 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 розсіяного склерозу у структурі захворюваності населення молодого, працездатного віку [4, 5, 6].

Переважає більшість хворих на розсіяний склероз має коморбідну патологію. У разі коморбідності розсіяного склерозу з низкою захворювань та станів актуальною є проблема наростання темпів його прогресування та важкості, що вимагає більш глибокого вивчення поширеності та структури коморбідної патології у осіб з розсіяним склерозом [7, 8, 9]. Також, до кінця не зрозуміло, які саме супутні захворювання домінують при РС.

На сьогоднішній день патофізіологічні механізми розвитку розсіяного склерозу вивчені недостатньо. Відомо, що РС виникає у відповідь на утворення аутоантитіл до компонентів центральної нервової системи (ЦНС). Аутоімунним захворюванням, до яких відноситься і РС, притаманна поява імуноглобулінів (IgG) із зміненим спектром глікозилювання, які володіють патологічними прозапальними властивостями. Різноманітність гліканів у складі імуноглобулінів, а також вплив імуноглобулінів на функцію антитіл робить їх як цікавими об'єктами-маркерами захворювань, так і потенційними терапевтичними агентами, адже знаючи конфігурацію необхідного глікану прозапальні антитіла можна перетворити у антизапальні [14].

Станом на сьогодні залишається недосконалою діагностично-прогностична тактика при РС [10]. Досі немає єдиної клінічної ознаки або

діагностичного тесту, достатніх для абсолютно точної діагностики РС. Більшість біомаркерів здатні характеризувати лише групу хворих загалом, маючи низькі діагностичні якості при застосуванні тесту в індивідуальному порядку [11]. Вагома частка лабораторних біомаркерів РС не використовується у звичній практиці лікарів-неврологів через брак доведеної високої валідності цих тестів, що пов'язано із труднощами при стандартизації цих досліджень [12]. Тому, надзвичайно актуальним є розробка діагностичних валідних лабораторних тестів, в тому числі запропонованих нами, з використанням системного підходу, для підвищення точності діагностики та прогнозування РС, а також оцінки клінічного перебігу цього захворювання та ефективності проведеної терапії.

Незважаючи на те, що біомаркери в сироватці крові є досить чутливими, біомаркери цереброспінальної рідини (ЦСР) надають інформацію про те, що відбувається в ЦНС з меншою варіабельністю. ЦСР є основним діагностичним джерелом, оскільки омиваючи тканини мозку, вона буде першим середовищем, де можуть накопичуватися маркери захворювання, пов'язаного з ЦНС. Недавні дослідження з новими біомаркерами свідчать про те, що аналіз ліквору є надзвичайно важливим для встановлення достовірного діагнозу РС та його прогнозу [14]. Нові біомаркери ЦСР можуть сприяти оцінці активності захворювання, терапевтичному моніторингу РС, а також дають змогу зробити більш точними прогностичні висновки [15-17]. Тому аналіз особливостей глікозилування IgG в ЦСР з метою пошуку нових більш надійних біомаркерів РС та встановлення їх зв'язку із змінами глікозилування IgG у сироватці крові пацієнтів із РС є доцільним та актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційна робота виконана на кафедрі неврології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького в рамках науково-дослідної роботи "Клініко-патогенетичні особливості захворювань нервової системи різного генезу (розсіяний склероз, епілепсія, вертеброневрологічні розлади, хвороба Паркінсона) в мешканців Західноукраїнського регіону" (Державний реєстраційний номер – 0113U000210), 17.01.2018р. тему було змінено «Дослідження нових біомаркерів клінічного

перебігу розсіяного склерозу» (Державний реєстраційний номер – 0118U000107). Лабораторна частина роботи виконувалась на кафедрі гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького на підставі договору про науково-медичну співпрацю.

Мета дослідження - оптимізація прогнозування перебігу РС із урахуванням коморбідної патології; розробка нових критеріїв діагностики РС на основі змін глікозильних детермінант імуноглобулінів класу Ig-G у сироватці крові та цереброспінальній рідині хворих на розсіяний склероз.

Завдання дослідження:

1. Визначити клініко-неврологічні характеристики РС з урахуванням коморбідної патології.
2. Оцінити діагностичне та прогностичне значення процесів глікозилювання імуноглобулінів у зразках сироватки крові та цереброспінальної рідини хворих на розсіяний склероз.
3. Оцінити клінічне та імунобіологічне значення парних зразків сироватки крові та цереброспінальної рідини хворих на РС щодо змін глікозилювання імуноглобулінів як біомаркера переходу клінічно ізольованого синдрому розсіяного склерозу в клінічно достовірний розсіяний склероз.
4. Дослідити зміни вмісту глікоформ IgG на молекулах імуноглобулінів у хворих на РС як діагностичного біомаркера аутоімунного процесу.
5. Дослідити зміни вмісту гліканів у церебро-спінальній рідині та сироватці крові хворих на розсіяний склероз як діагностичного біомаркера при цьому захворюванні.
6. Оцінити діагностично-прогностичне значення експонування глікозильних залишків на аутоантитілах до ОБМ та загальних антитілах сироватки крові хворих на РС залежно від клінічних особливостей захворювання та проведеної терапії.

Об'єкт дослідження: розсіяний склероз.

Предмет дослідження: клінічні параметри розсіяного склерозу з урахуванням супутніх захворювань, клінічне та імунобіологічне значення змін глікозильних детермінант імуноглобулінів й змін глікозилювання аутоантитіл до

ОБМ у сироватці крові та цереброспінальній рідині у хворих на розсіяний склероз.

Методи дослідження

Анамнестичний, загально-клінічний, клініко-неврологічний (в тому числі розширена шкала оцінки ступеня інвалідизації та шкала ураження функціональних систем за J. Kurtzke), імунобіологічний (визначення загального вмісту імуноглобулінів IgG та імунних комплексів імуноглобулінів IgG та IgM у зразках сироваток крові людини та ЦСР, лектин-імуноферментний аналіз для визначення глікозилювання імуноглобулінів, визначення гліканів методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції, афінна очистка препаратів імуноглобулінів Ig, мас-спектрометричний аналіз, кон'югація антитіл із магнітними наноносіями, виділення специфічних аутоантитіл до основного білка мієліну), статистична обробка результатів.

Наукова новизна отриманих результатів

У дисертаційній роботі на підставі проведених комплексних клініко-неврологічних та імунобіологічних досліджень вивчено особливості клінічного перебігу коморбідних захворювань у пацієнтів із розсіяним склерозом. Вперше було вивчено поширеність та структуру коморбідної патології при РС, її вплив на прогресування неврологічного дефіциту та тривалість захворювання, появу коморбідної патології у часовому зв'язку з першими проявами РС.

Вперше на підставі клініко-неврологічних та імунобіологічних досліджень змін глікозильних детермінант у сироватці крові та лікворі хворих запропонували нові діагностичні та прогностичні біомаркери розсіяного склерозу. Вперше дослідили маркерні властивості глікозилювання імуноглобулінів у зразках сироватки крові та цереброспінальної рідини хворих на розсіяний склероз методом лектин-імуноферментного аналізу. Вперше клінічно підтвердили, що процес глікозилювання імуноглобулінів проявляється підвищенням активності захворювання та корелює із збільшенням тривалості хронічного запального процесу при РС.

Вперше довели, що зміни глікозилювання імуноглобулінів відбуваються в усіх субкласах імуноглобулінів IgG.

Вперше підтвердили діагностичну роль дослідження парних зразків сироватки крові та цереброспінальної рідини хворих на розсіяний склероз щодо змін глікозилювання імуноглобулінів з використанням лектинів SNA та PSqL, при оцінці переходу клінічно ізольованого синдрому РС (KIC) в клінічно достовірний РС (КДРС).

Вперше запропонували для визначення аутоімунного процесу визначати глікоформи IgG методом капілярного-електрофорезу-індукованої лазером флуоресценції.

Вперше встановили, що зміни гліканів імуноглобулінів у ЦСР та сироватці крові хворих на розсіяний склероз можна використовувати для підтвердження аутоімунного характеру патологічного процесу у пацієнтів із симптомами ураження ЦНС.

Вперше провели оцінку діагностично-прогностичного потенціалу змін глікозилювання аутоантитіл до ОБМ при розсіяному склерозі.

Вперше створили магнітні мікрокон'югати на основі основного білка мієліну та проаналізували їх використання для виділення аутоантитіл до ОБМ із сироватки крові хворих на розсіяний склероз.

Вперше провели визначення експонування глікозильних залишків на аутоантитілах до ОБМ та загальних антитілах сироватки крові хворих на РС залежно від клінічних особливостей захворювання та проведеної терапії.

Беручи до уваги результати проведених досліджень процесів глікозилювання антитіл у сироватці крові та церебро-спінальній рідині хворих на РС, вперше встановили важливість цих процесів як з позиції розгляду їх як ключової ланки в патогенезі захворювання, так і як надійного біомаркера активності, прогресування РС та терапевтичної відповіді при цьому патологічному стані.

Вперше, використовуючи сучасні імунобіологічні методи, знайдено нові біомаркери, які дозволяють покращити діагностику цього захворювання, а також оцінити ефективність проведеної терапії.

Практичне значення отриманих результатів.

У ході виконання дисертаційної роботи здобувачем встановлено зв'язок

коморбідної патології із розвитком розсіяного склерозу. Показали, що не лише розсіяний склероз впливає на перебіг супутніх захворювань, а і супутні захворювання роблять перебіг РС важчим. Виявили основні класи коморбідних захворювань згідно МКХ-10 і визначили структуру коморбідної патології за класами у хворих на РС залежно від віку, статі обстежених, ступеня їх інвалідизації за шкалою EDSS та відношення до дебюту РС. Довели, що розуміння механізмів впливу коморбідної патології на перебіг РС, дає змогу конкретизувати вказані процеси і є пріоритетним завданням проведеного дослідження. Обґрунтували доцільність вивчення структури коморбідної патології у хворих на розсіяний склероз.

Обґрунтували доцільність проведення комплексного клініко-неврологічного та імунобіологічного обстеження хворих на РС. Виявили зміни щодо експонування гліканів у сироватках крові здорових донорів, хворих на РС та ЦСР пацієнтів із РС, які вказують на істотні зміни глікозилювання, що дозволяє відрізнити як сироватку здорових донорів від сироватки хворих, так і ЦСР від сироватки пацієнтів із РС. Довели, що глікозилювання імуноглобулінів є важливим діагностичним маркером при РС, так як визначення вказаних показників у сироватці крові є набагато простішим та доступнішим методом діагностики у порівнянні з дослідженням ліквору.

Для прогнозування РС, зокрема переходу клінічно ізольованого синдрому РС в клінічно достовірний РС, запропонували проводити дослідження вмісту глікоформ IgG на молекулах імуноглобулінів у хворих на РС і визначили її маркерні властивості. Виявили зростання вмісту бісектуючих форм гліканів, що пояснює зростання зв'язування лектину LCA, AAL.

Для діагностики активності та прогресування захворювання і накопичення в організмі імуноглобулінів із зміненим «прозапальним» спектром гліканів, що важливо для визначення початку захворювання на РС, запропонували використовувати лектин-імуноферментний аналіз, який показав достовірне зростання експонування гліканів – мішеней зв'язування лектину AAL на імуноглобулінах IgG пацієнтів із РС.

Встановили, що визначення олігоклональних смуг IgG у ЦСР у хворих на

РС є більш чутливим методом для постановки достовірного діагнозу РС, порівняно із даними МРТ дослідження.

Доказали, що з метою оцінки ефективності проведеної терапії у хворих на РС доцільно враховувати зміни глікозилювання аутоантитіл до основного білка мієліну у сироватці їх крові.

Впровадження результатів дослідження

Основні наукові та практичні результати дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес на кафедрі неврології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України, кафедрі неврології та нейрохірургії Івано-Франківського національного медичного університету МОЗ України, кафедрі неврології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» та в практичну діяльність неврологічних відділень Львівської обласної клінічної лікарні, Волинської обласної клінічної лікарні, КНП «Центр ПМСД Кремінської райради».

Особистий внесок дисертанта

Дисертація є самостійною науковою працею дисертанта. Автор особисто провела аналіз наукової літератури за темою дисертаційної роботи, виконала комплексне клініко-неврологічне обстеження хворих на РС. Самостійно здійснила формування та обробку первинної документації, провела статистичну обробку та аналіз отриманих результатів дослідження. Приймала безпосередню участь у проведенні імунобіологічних досліджень. Дисертантом самостійно написані всі розділи дисертації, сформовані загальні висновки та практичні рекомендації, забезпечено їх висвітлення в періодичних виданнях. Спільно з науковим керівником сформульовані мета та завдання дисертаційної роботи, розроблені план, дизайн дослідження, обговорені отримані результати та здійснено впровадження результатів дослідження в медичну практику.

Консультативну допомогу та сприяння при виконанні імунобіологічних лабораторних досліджень за темою дисертаційної роботи надав д.біол.н., професор кафедри гістології, цитології та ембріології ЛНМУ ім.Данила Галицького Білий Ростислав Олександрович.

Апробація результатів дисертації

Основний зміст дисертаційної роботи було представлено на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання неврології, психіатрії, наркології та медичної психології», (Тернопіль 2018), XXV Львівський медичний Форум (Львів 2019), міжнародний симпозіум «Immunotechnology in Medicine 2019» Innovation SMART LION (Львів 2019), засідання Львівського обласного товариства неврологів 2017, 2018, 2019 рр.

Публікації

За темою дисертації опубліковано 12 наукових робіт. Серед них: 9 статей (із них 6 у наукових фахових виданнях, рекомендованих ДАК України для публікації результатів дисертаційних досліджень, серед яких 3 одноосібні, – у виданнях, що цитуються в міжнародних науково-метричних базах даних, та 3 – у провідних виданнях, що індексуються базами даних Scopus/Web of Science), 3 тез доповідей у матеріалах науково-практичних конференцій.

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 200 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 6 розділів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел. Обсяг основного тексту дисертації складає сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 6 таблицями та 48 рисунками. Список використаних джерел містить 259 найменування, з них 37 кирилицею та 222 латиницею.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ПАТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ ТА ОСОБЛИВОСТІ КОМОРБІДНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ПРИ ЦІЙ ПАТОЛОГІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Визначення коморбідності та її вплив на клінічний перебіг хронічних захворювань

Коморбідність (лат. со – разом, morbus – хвороба) – це наявність додаткової клінічної картини, яка вже існує або може з'явитися самостійно, крім поточного захворювання, і завжди відрізняється від нього. Термін уточнили Н.С. Kraemer і М. Ван den Akker, визначивши коморбідність як поєднання у одного хворого двох і/або більше хронічних захворювань, патогенетично взаємопов'язаних між собою, котрі збігаються у часі у одного пацієнта незалежно від активності кожного з них (<https://en.wikipedia.org/wiki/Comorbidity>). Деякі автори протиставляють поняття коморбідності і мультиморбідності, визначаючи коморбідність як наявність різних захворювань, пов'язаних доведеним єдиним патогенетичним механізмом, а мультиморбідність як наявність різних захворювань, не пов'язаних між собою доведеними на поточний момент патогенетичними механізмами. Інші дослідники стверджують, що мультиморбідність є поєднання багатьох хронічних або гострих хвороб і медичних станів у однієї людини, і не акцентують увагу на єдності або різниці їх патогенезу.

Термін «коморбідність», був запропонований у 1970 р. американським лікарем, дослідником і епідеміологом А.Р. Feinstein, який на прикладі соматичних хворих з гострою ревматичної лихоманкою виявив, що у пацієнтів на тлі одночасно перебігаючих кількох захворювань прогноз є гіршим [18]. Незабаром коморбідність стала окремим дослідницьким напрямом в різних галузях медицини, а в ХХІ столітті оформляється в систему знань про можливі закономірності взаємодії захворювань, частоти, ступеня обтяженості, раціоналізації фармакопейної та інших лікувальних тактик в конкретних

клінічних ситуаціях поліморбідності. Йде процес формування коморбідності як наукової дисципліни на принципах доказової медицини. Неоціненна роль в цьому аспекті клініко-морфологічного співставлення. Певною мірою стали зрозумілі причини коморбідності: анатомічна близькість, єдиний патогенетичний механізм, причинно-наслідковий зв'язок і ускладнення [19].

Проведення в подальшому досліджень і розуміння проблеми множинності захворювань з різних аспектів теорії і практики медицини дало нові визначення цього феномену, одне з них – поліпатія. Поліпатія – це хворобливий стан організму людини, обумовлений безліччю патологічних процесів (патофізіологічних і патоморфологічних), їх проявів, ускладнень, наслідків, які можуть кваліфікуватися як нозологічні форми (одиниці), синдроми, клініко-діагностичні ознаки і симптоми [20]. Розуміння того, що пацієнт може страждати одночасно кількома захворюваннями, породило безліч синонімів коморбідності – поліморбідність, мультиморбідність, мультифакторні захворювання, співхворобливість, подвійний діагноз, плюрипатологія тощо. Загальноприйнятої термінології коморбідності в силу різного розуміння патогенетичних механізмів різних захворювань, хронічних або гострих хвороб і медичних станів у однієї людини поки-що не вироблено.

В емпірично сформованій класифікації виділяють наступні варіанти коморбідності [21, 22, 23]:

- Причинна коморбідність – ураження різних органів і систем, обумовлене єдиним патологічним агентом. Наприклад, алкогольна вісцеропатія у пацієнтів з хронічною алкогольною інтоксикацією; патологія, асоційована з курінням, або системне ураження сполучної тканини при колагенозах.

- Ускладнена коморбідність – результат основного захворювання, зазвичай проявляється послідовно через деякий час після його екзацерації у вигляді ураження органів-мішеней. Наприклад, хронічна ниркова недостатність внаслідок діабетичної нефропатії у хворих на цукровий діабет 2 типу або ішемічний інсульт в результаті гіпертонічного кризу у хворих на гіпертонічну хворобу.

- Ятрогенна коморбідність – проявляється при необхідному

фармакологічному впливі, за умови заздалегідь встановленої небезпеки тієї чи іншої медичної процедури. Наприклад, наслідки тривалої терапії глюкокортикоїдами, лікування нестероїдними протизапальними препаратами тощо.

- Неуточнена коморбідність – передбачає наявність єдиних патогенетичних механізмів розвитку захворювань, але вимагає проведення ряду тестів, що підтверджують гіпотезу дослідника або клініциста. Наприклад, розвиток еректильної дисфункції у пацієнтів з атеросклерозом і артеріальною гіпертензією, а також виникнення ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки верхніх відділів шлунково-кишкового тракту у судинних хворих.

- «Випадкова» коморбідність - наприклад, поєднання ішемічної хвороби серця та жовчнокам'яної хвороби або комбінація набутої вади серця і псоріазу. Однак, гадана «випадковість» даних комбінацій в майбутньому може бути пояснена з клінічних та наукових позицій.

Наявність коморбідних захворювань обумовлює збільшення ліжко-днів стаціонарного лікування, ймовірність інвалідизації, перешкоджає проведенню реабілітації, збільшує число ускладнень після хірургічних втручань, вимагає великих витрат на діагностику, лікування, реабілітацію.

Коморбідність широко поширена серед пацієнтів, госпіталізованих в загально-медичні стаціонари. На етапі первинної медико-санітарної допомоги пацієнти з кількома захворюваннями одночасно швидше є правилом, ніж винятком. Крім лікарів загальної практики і терапевтів з проблемою коморбідності досить часто стикаються і вузькі спеціалісти, зокрема, неврологи, але останні рідко звертають увагу на цілий спектр хвороб у одного пацієнта і займаються лікуванням переважно профільного захворювання.

Число коморбідних захворювань істотно підвищується з віком: з 10% у віці до 19 років до 80% у осіб 80 років і старше. Згідно з даними М. Fortin, базованими на аналізі 980 історій хвороби, взятих з щоденної практики сімейного лікаря, поширеність коморбідності становить від 69% серед хворих молодого віку до 93% серед осіб середнього віку і до 98% у старшій віковій групі. При цьому число хронічних захворювань варіює від 2,8 у молодих пацієнтів до 6,4 у людей

похилого віку [22] (цит. за Беялов Ф.И., 2009). За даними більше 3000 патологоанатомічних досліджень хворих з соматичною патологією, що надійшли в багатопрофільний стаціонар з приводу декомпенсації хронічного захворювання (середній вік $67,8 \pm 11,6$ року), частота коморбідності становить 94,2%, найбільш поширені комбінації з двох і трьох нозологій, але в поодиноких випадках (до 2,7%) у одного пацієнта спостерігалось 6-8 хвороб одночасно [23].

Найбільший рівень поширеності мультинозологій серед осіб обох статей відзначається у віці від 45 років і старше. Провідним класом хвороб за кількістю поєднань серед перших основних захворювань є хвороби системи кровообігу, а серед других і третіх – захворювання ендокринної системи, розлади харчування та обміну речовин. Велике число поєднань по вертикалі і горизонталі дають також хвороби органів травлення, респіраторні патології та хвороби кістково-м'язової системи та сполучної тканини[20].

На підставі світового наукового досвіду сформульовані базові тези коморбідності [24]:

- Коморбідні хвороби зустрічаються часто, особливо у літніх пацієнтів.
- Підвищена частота коморбідності не може пояснюватися тільки високою поширеністю хвороб.
- Коморбідність проявляється як соматичними, так і нейро-психічними захворюваннями, що свідчить про системний характер порушень функціонування організму.
- У пацієнтів з коморбідними захворюваннями зростає тяжкість стану і погіршується прогноз.
- Якість життя пацієнтів знижується при коморбідних захворюваннях – більшою мірою внаслідок психічних розладів, ніж соматичних захворювань.
- Важливо виробити оптимальну стратегію ведення поєднаних хвороб.
- Коморбідність ускладнює діагностику захворювань.
- Вибір лікування пацієнта часто визначається поєднанням захворювань і патологічних станів.
- Коморбідні хвороби знижують комплаєнтність пацієнтів до лікування.
- Лікування декількох захворювань збільшує ризик побічних ефектів ліків

і вимагає врахування взаємного впливу медикаментів.

- Коморбідні захворювання значно збільшують витрати на лікування.
- Потрібно розробляти і вдосконалювати організаційні форми допомоги пацієнтам з коморбідними захворюваннями.
- Необхідно вдосконалювати методику наукових досліджень з діагностики та лікування поєднаних хвороб.
- В рекомендації з діагностики та лікування захворювань доцільно включати розділи коморбідності і регулярно розширювати їх.

Вплив коморбідної патології на клінічні прояви, діагностику, прогноз і лікування багатьох захворювань є багатогранний та індивідуальний. Взаємодія захворювань, віку і лікарського патоморфозу значно змінює клінічну картину а й перебіг основної нозології, характер і тяжкість ускладнень, погіршує якість життя хворого, обмежує або ускладнює лікувально-діагностичний процес [20].

1.1.1. Неврологічна коморбідність при розсіяному склерозі

Вивчення коморбідності при розсіяному склерозі (РС) є актуальним, оскільки наявність супутніх захворювань впливає на своєчасність діагностування РС, вибір лікування а також погіршує якість життя пацієнтів, їх функціональний статус, збільшу смертність [25, 26, 27]. Дані щодо поширеності асоційованих захворювань у пацієнтів із РС відрізняються через відмінності характеристик досліджуваних популяцій, методологій проведення досліджень, підходів до класифікації нозологій [28, 29], хоча згідно різних авторів супутні хвороби зустрічаються приблизно у половині випадків [30].

За даними Martie RA. (2016) [31] цифри (у відсотках) коморбідності різних медичних (соматичних, неврологічних, психіатричних) станів в популяції пацієнтів із РС за період 1984-2011 рр. становлять – тривожність (22,2%), біполярний розлад (2,4%), ХОЗЛ (8,3%), депресія (16,7%), епілепсія (1%), фіброміалгія (3,7%), гіпертензія (10,2%), ІХС (2,4%), мігрень (10,8%), автоімунний тиреоїдит (2,9%). Як бачимо, із суто статистичної токи зору, коморбідності є частою проблемою при РС. Їх частота залишається недооціненою, вони нерідко розвиваються перед або паралельно із першими

проявами захворювання, дослідження по епідеміології демонструють гетерогенні результати. Коморбідність впливає на затримку встановлення точного діагнозу РС, зростання рівня госпіталізацій, асоціюється із нижчими соціо-економічним статусом та якістю життя в популяції пацієнтів, підвищеною смертністю.

Метою цього розділу є огляд світової медичної літератури по проблемах коморбідності між РС та іншими патологіями нервової системи, а також з'ясувати вплив останніх на перебіг та клінічні характеристики головного представника демієлінізуючих розладів.

У неврологічній практиці часто стикаються з проблемою коморбідності, і це лежить в основі формування спеціалізованих напрямків медичної науки: нейроурології, ангіоневрології, нейроендокринології та інші. Зустрічаються і менше вивчені поєднання хронічних аутоімунних захворювань нервової системи, наприклад, наявність у одного пацієнта захворювання нейро-м'язової передачі та демієлінізуючого ураження центральної нервової системи (ЦНС). Питання про патогенез цієї асоціації досі залишається невирішеним: чи є вона частиною неспецифічної імунної реакції та генетичної схильності або виключно випадкова. Відомо, що будь-який аутоімунний процес в організмі збільшує ризик розвитку схожого по патогенезу стану з ураженням інших органів і систем.

Нещодавнє велике епідеміологічне дослідження популяції хворих з міастенією в Швеції встановило, що ризик розвитку будь-яких аутоімунних станів при наявності міастенії (МГ) достовірно вищий на 22%, при цьому в групі високого ризику знаходяться молоді люди і жінки [32].

Загальновідомо, що патологічні процеси при МГ обумовлені порушенням нервово-м'язової передачі під дією аутоантитіл до ацетілхолінових рецепторів постсинаптичної мембрани. У результаті формується аутоімунний постсинаптичний блок внаслідок зменшення числа рецепторів ацетилхоліну і їх недостатньої чутливості до медіатора [33].

З кожним роком зростає число описаних випадків поєднання МГ з демієлінізуючими захворюваннями ЦНС. Серед останніх відзначають мієліт, ретробульбарний неврит, гострий розсіяний енцефаломієліт, РС, оптикомієліт

[34, 35, 36]. Однак, беручи до уваги невелику кількість досліджень в рамках описаної проблеми, відносно низьку поширеність як МГ, так і РС, в даний час питання про сутність цієї асоціації залишається відкритим.

Як МГ, так і демієлінізуючі патології мають прогресуючий перебіг, швидко призводять до зниження працездатності, інвалідизації, погіршення якості життя хворих, що обумовлює високу медичну та соціальну значимість проблеми. Поєднання цієї патології, з одного боку, ускладнює стан пацієнтів, з іншого - подовжує діагностичний пошук в силу недостатнього досвіду ведення пацієнтів з поєднаною аутоімунною патологією.

Підвищений інтерес у фахівців викликає питання про вплив тимектомії на розвиток демієлінізації в ЦНС у хворих на МГ [37]. Згідно тимогенної теорії, виникнення МГ пов'язують з патологічними змінами тимуса: гіперплазією, пухлиною та інші. Існують незаперечні дані, що вказують на участь дисфункції вилочкової залози у патогенезі МГ, проте її структурні порушення при цьому захворюванні досить гетерогенні. У зв'язку з цим, тимектомія є основним патогенетично обґрунтованим методом комплексного лікування хворих на МГ [38]. Результати довгострокових спостережень оперативного лікування МГ як у вітчизняній, так і зарубіжній літературі нечисленні. Є повідомлення про відсутність патології тимусу і неефективності тимектомії в окремих клінічних групах МГ, навіть виділяють «тимус-незалежні» форми захворювання [39]. Висловлюється думка, що дисрегуляція гуморального імунітету, опосередкована тимектомією, призводить до розвитку оптиконеїромієліту і РС [40, 41, 42, 43]. При відсутності великих проспективних досліджень в даний час не можна оцінити наслідки для пацієнта і ступінь ризику розвитку РС після подібної операції.

Іншим сценарієм розвитку обговорюваного поєднання захворювань є випадки МГ, що розвилася на тлі вже існуючого РС. Необхідно відзначити, що в деяких випадках пацієнти були ліковані β -інтерферонами-1a і 1b або глатирамер ацетатом [44, 45]. Виникнення патології нейро-м'язової передачі на фоні терапії препаратами, що змінюють перебіг РС, може мати наступне пояснення. Подібне лікування могло спровокувати розвиток аутоімунного процесу за допомогою

модуляції імунної відповіді: посилення Th2-клітинних реакцій, збільшення продукції аутоантитіл. З іншого боку, розвиток двох захворювань у одного пацієнта може бути спорадичним, що виникли незалежно від наявності імуномодуючої терапії [45].

Вивчення питань коморбідності МГ і РС має як теоретичну, так і практичну значимість. Визначення поширеності поєднання цих двох станів і ретельний збір катамнезу пацієнтів після тимектомії з приводу МГ допоможуть відповісти на важливе питання про природу такої асоціації: випадковість це чи закономірність. Розшифровка імунопатологічних механізмів, що лежать в основі подібних поєднань, зробить істотний внесок в розуміння факторів ризику, перебігу захворювань, планування їх терапії та визначення прогнозу. З огляду на новизну і малу висвітленість цієї проблеми у вітчизняній науковій літературі, обговорення вказаного питання важливо для формування адекватної тактики ведення таких пацієнтів.

Щодо синдрому Гієна-Барре, то в сенсі коморбідності між ним і РС дані залишаються суперечливими. В одному данському дослідженні повідомляли про його частоту 0%, що не відрізнялося від очікуваних величин в цілому по популяції [46]. У чотирьох інших дослідженнях гостра аутоімунна полінейропатія виявлялася серед хворих на РС з частотою 0,11–1,66% [47, 48, 49, 50]. Найвищі показники походили із внутрішньо-лікарняного данського дослідження [48], тоді як результати інших досліджень ґрунтувалися на поліклінічних записах. У американському дослідженні, здійсненому Langer-Gould A, Albers KB, Van Den Eeden SK, Nelson LM (2010 р.) [50], частота синдрому Гієна-Барре перед встановленням діагнозу РС дорівнювала 0%. У двох дослідженнях (Edwards LJ, Constantinescu CS., 2004; Langer-Gould A, Albers KB, Van Den Eeden SK, Nelson LM, 2010)[49, 50] повідомляють, що частота гострої аутоімунної полінейропатії була вища серед хворих на РС, порівняно зі здоровою популяцією.

Згідно традиційної точки зору, епілептичні напади (ЕН) відносяться до рідкісних і навіть атипових проявів РС [51, 52]. Про можливості розвитку судом при РС згадували вже в перших посібниках з цього захворювання, при цьому

незмінно підкреслювалося, що судомні прояви не відносяться до його характерних симптомів. Класичне уявлення про «нехарактерність» епілепсії для РС склало основну причину того, що ця проблема протягом тривалого періоду не привертала уваги дослідників, і більшість її аспектів вивчені недостатньо. Тим часом, передбачувана рідкість епілептичних нападів при РС ще не свідчить про їх клінічну незначущість.

Точна частота епілепсії при РС невідома, існуючі дані досить суперечливі. З одного боку, ряд авторів вказують, що частота епілепсії при РС становить менше 1%, тобто значимо не відрізняється від такої в загальній популяції. З іншого боку, є досить багато досліджень, в яких відзначена істотно більш висока частота епілепсії при РС - до 7,5 - 8,6%, і навіть до 14,5% [53].

Причинно-наслідкові зв'язки між епілепсією і РС дискусійні [54, 55, 56, 57]. По-перше, розвиток епілепсії і РС у одного і того ж хворого може бути наслідком випадкового поєднання двох незалежних захворювань. По-друге, можлива коморбідність епілепсії і РС (мається на увазі, що і те і інше захворювання можуть мати загальні сприятливі фактори). По-третє, епілепсія може бути наслідком РС.

Особливий інтерес представляє природа ЕН у пацієнтів з РС, поява яких традиційно асоціюється з кірковим епілептогенним вогнищем. При РС в нейродегенеративний процес включається не тільки біла речовина мозку, в якій переважають процеси демієлінізації, але й сіра, де виражені нейрональні ураження.

Кіркова демієлінізація протікає з ураженням аксонів, дендритів і нейронів. Ступінь пошкодження нейронів у вогнищах 1-го типу в сірій речовині в 3-4 рази нижчий, ніж в білій. Так як кіркові вогнища погано візуалізуються на магнітно-резонансній томографії (МРТ), їх найчастіше виявляють при аутопсії та біопсії, тому динаміка розвитку цих пошкоджень зараз не вивчена.

Виникнення ЕН пов'язують як з ураженням кори головного мозку і білякортикальної білої речовини у вигляді вогнищ демієлінізації і/або набряку (на клітинному рівні це може відображати, наприклад, аномальну експресію іонних каналів, затримку або блокування потенціалу дії з гіперсинхронізації кластерів

нейронів і ін.), так і з лабільністю церебральних регуляторних механізмів, що супроводжують загострення РС [57]. В якості альтернативного механізму припускають активацію латентного фокуса епілептичної активності внаслідок супутніх хронічного запального процесу, метаболічних порушень і змін церебрального мікрооточення (наприклад, іритація нейронів та їх підвищена збудливість внаслідок деполяризації через підвищення проникності клітинної мембрани антитілами, цитокінами й іншими імунними факторами). При цьому, виникають пароксизмальні епізоди, які можуть бути проявом як гострих симптоматичних нападів (ГСН), пов'язаних з поточним імунним пошкодженням, так і симптоматичної епілепсії. Як відомо, виникнення ГСН знаходиться в тісному тимчасовому і нейробіологічному зв'язку з гострим структурним пошкодженням головного мозку і не відповідає основній дефініції епілепсії про неспровокований характер нападів, розробленій Міжнародною протиепілептичною лігою (ILAE) 2010 р.

У більшості досліджень наголошується, що найчастіший тип ЕН при РС – вторинно-генералізовані напади, нерідко – прості або складні парціальні ЕН [55]. Проте, з урахуванням анатомічної варіабельності локалізації бляшок, напади при РС вирізняються великою різноманітністю. При РС описані *epilepsia partialis continua*, міоклонічні, абсансні, різноманітні рефлексорні та інші напади (до 10% нападів залишаються некласифікованими). Втім, слід зазначити, що не всі напади, описані при РС, причинно з ним пов'язані, особливо це стосується первинно-генералізованих нападів з початком у дитячому або підлітковому віці (в таких випадках більш ймовірно випадкове поєднання ідіопатичної генералізованої епілепсії з РС). Багато дослідників відзначають високу частоту розвитку при РС епілептичного статусу – як генералізованих, так і парціальних нападів, причому останні (складні парціальні) можуть імітувати психічні порушення, тому при пароксизмальних порушеннях сприйняття або сплутаності свідомості у пацієнта з РС рекомендовано проведення ЕЕГ.

Щодо клінічних особливостей РС, що протікає з епілепсією, дані суперечливі. Частина авторів відзначає, що епілептичні напади найбільш часто розвиваються при ремітуючому перебігу. Інші дослідники, навпаки, відзначають

асоціацію епілептичних нападів з прогресуючим перебігом. Існують дані про те, що епілептичні напади при РС частіше розвиваються у чоловіків, хоча в більшості популяційних досліджень співвідношення чоловіків і жінок не відрізнялася від очікуваного при РС [51]. Щодо демографічних характеристик пацієнтів важливим видається більш висока частота епілептичних нападів при ранньому дебюті РС.

За спостереженням Толстих Н.В., Корольової Н.Ю. та співавт. [58], більше половини випадків виникнення ЕН у хворих на РС пов'язані із загостреннями захворювання, що відповідає дефініції ГСН. У фазі ремісії напади можуть не повторюватися. Однак відзначено, що у 50% із загального числа хворих на РС, які перенесли ЕН, симптоматична епілепсія розвивається як самостійне захворювання і протікає активно незалежно від наявності загострень РС. У 60% пацієнтів ЕП супроводжуються вторинною генералізацією, у третини пацієнтів реєструються епізоди серійного і статусного перебігу [58]. На думку зазначених авторів, призначення протиепілептичної терапії (ПЕТ) вже після перших ЕН є обґрунтованим (виходячи з того, що у хворого є патологія, що створює стійку схильність до ЕН, тому ризик рецидиву нападів найчастіше розцінюється як високий).

Будь-які специфічні зміни, характерні для пацієнтів із РС і епілептичними нападами, на рутинній магнітно-резонансній томографії, як правило, відсутні. Існують дані про відносно більш високе вогнищеве навантаження, особливо в лобовій і/або скроневій частці, або в області стовбура, а також більшу виразність атрофічних змін у пацієнтів із РС та епілепсією. В останні роки, у зв'язку з появою МРТ з високою напруженістю магнітного поля і спеціальних послідовностей для кращої візуалізації кортикальних структур (наприклад, double inversion recovery, DIR), з'являються дані про більш виражене ураження кори у пацієнтів з ЕН [59].

Абсолютна більшість досліджень, присвячених коморбідності між РС та пухлинами головного або спинного мозку, не виявила жодних кореляцій [19]. Лише в одному з них, де були представлені різні гістологічні варіанти

новоутворів, засвідчено про підвищений ризик в цих пацієнтів доброякісних пухлин класу менінгіом [60].

У останньому мета-аналізі (Marrie RA, Reider N, Cohen J et al.) [61] здійснено систематичний огляд 515 статей по коморбідності демієлінізуючої і нейро-судинної патології, з них виділено 10 досліджень із методологічно якісним дизайном. На основі ретельної обробки даних засвідчено, що частота інсульту загалом в досліджуваних групах коливалася в діапазоні 0,4-7,0%, а, зокрема, ішемічного інсульту – від 1,2% до 1,4%. Згідно висновків одного із цих досліджень, вища частота інсульту була серед пацієнтів із РС жіночої статі [62]. Згідно суб-аналізу семи вибраних досліджень частота інсульту загалом і його ішемічного варіанту зокрема була вища серед хворих на РС, порівняно із популяційними групами [63, 64]. Частота геморагічного інсульту між хворими і здоровими особами достовірно не відрізнялася [65].

Про зв'язок між РС та паркінсонізмом рідко повідомляється. Описано клінічні, рентгенологічні та DAT сканування у двох пацієнтів з паркінсонізмом [66]. На МРТ виявлено демієлінізуючі ураження ЦНС в обох пацієнтів. З іншого боку, результати DAT сканів підтвердили хворобу Паркінсона. Ще немає відкритих даних про те, чи можуть ураження РС викликати паркінсонізм, або це лише випадкові знахідки двох різних захворювань у того самого пацієнта. Хоча є випадки причинно-наслідкового зв'язку між паркінсонізмом та РС, деякі з літературних звітів та наші спостереження дозволяють припустити, що хвороба Паркінсона та РС можуть співіснувати як два окремих захворювання у того самого пацієнта. Можливо, що симптоми хвороби Паркінсона можуть посилюватися через специфічну локалізацію бляшок, пояснюючи сприятливу реакцію на кортикостероїди у деяких пацієнтів.

Хвороба Шарко-Марі-Тутта типу 1С (СМТ1С) є рідкісною формою спадкової демієлінізуючої нейропатії, що спричинена мутаціями LITAF (lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α) гена на хромосомі 16p12-16p13.3. На сьогоднішній день повідомлено лише про дев'ять мутацій в гені LITAF. Усі, представлені до теперішнього часу, СМТ1С пацієнти, які містять мутації в гені LITAF, фенотипово маніфестують легкою, повільно прогресуючою

дем'єлінізуючою нейропатією, що не супроводжується додатковими симптомами. Деякі варіанти послідовності ідентифіковані в гені LITAF ідеально виділяються з фенотипом CMT1C, тоді як інші варіанти виявляються у пацієнтів, які страждають хронічними набутими нейропатіями.

Центральна дем'єлінізація, викликана розсіяним склерозом рідко зустрічається у пацієнтів з генетичними нейропатіями. У всіх зареєстрованих до теперішнього часу пацієнтів, які страждають на CMT1C, які містять мутацію Gly112Ser, фенотип м'якої повільно прогресуючої дем'єлінізуючої нейропатії був без залучення симптоматики центральної нервової системи.

В дослідженні Potulska-Chromik A, Sinkiewicz-Darol E, Kostera-Pruszczyk A, [67] вперше представлено три покоління родини CMT1C, де у пробанда хвороба CMT1C співіснує з центральною дем'єлінізацією, що відповідає критеріям первинного прогресуючого розсіяного склерозу (ППРС), а її брат і мати, які несуть тільки мутацію гена LITAF, мають симптоми лише периферійної невропатії. Пробанд не тільки мала мутацію LITAF, але також поліморфізм активації послідовності ген TNF- α . Припускають, що в центральній нервовій системі мутації Gly112Ser в гені LITAF може викликати запальну реакцію, що веде до ППРС, шляхом впливу на експресію гена TNF- α . В промоторній послідовності гена TNF- α був виявлений поліморфізм 308G>, який раніше досліджувався в різних популяціях РС. Хоча було показано, що поліморфізм -308G> А зустрічається в подібних частотах у хворих на розсіяний склероз і в контрольних групах, його функціональне значення доведено не було. У хворих на РС, які мають поліморфізм -308G> А, виявлено значно вищий рівень експресії мРНК TNF- α . Функціональна актуальність 308G>А поліморфізму також була підтверджена *in vitro*, в якому була знайдена висока транскрипційна активність гена TNF- α , що містить -308G> алель.

Співіснування дем'єлінізуючої периферійної невропатії і первинного прогресуючого розсіяного склерозу є не випадковим. Центральні і периферійні розлади є результатом взаємодії пов'язаних функцією двох генів.

Хвороба Вільсона - спадкове захворювання, при якому порушується метаболізм міді, а основними синдромами є печінкові та неврологічні розлади. У

дослідженні Dzieżyc K, Litwin T, Członkowska A.[68] було представлено двох пацієнтів із супутніми хворобою Вільсона та РС. В обох випадках діагноз РС передував діагностиці хвороби Вільсона. Обидва пацієнти мали неврологічні ознаки, характерні для РС. У першого пацієнта були виявлені типові ознаки для хвороби Вільсона (гіпомімія, сіалорея, поведінкові зміни). Другий пацієнт зазнав пошкодження печінки без будь-яких неврологічних симптомів. В обох випадках клінічний перебіг РС був дуже м'яким (17 і 12 років спостереження), що може бути викликано імуносупресивним ефектом дії вільної міді.

1.1.2. Особливості перебігу розсіяного склерозу при больових та вертеброгенних синдромах

У клінічній картині у хворих на РС внаслідок багатовогнищового демієлінізуючого ураження нервової системи больові синдроми зустрічаються досить часто і в теперішній час характеризуються більшістю дослідників як поширений розлад [69, 70, 71, 72]. Про виникнення болю на різних етапах захворювання, за даними сучасних досліджень, повідомляють від 29 до 90% хворих. Хоча больові синдроми і не відносяться до типових клінічних проявів цього захворювання, проте наявність болю при РС може суттєво погіршити якість життя пацієнтів [73, 74] і сприяти поглибленню симптомів неврологічного дефіциту [69, 75]. Водночас, дані про ступінь впливу больових синдромів на повсякденне існування хворих на РС і на пришвидшення розвитку у них інвалідизації неоднозначні і потребують уточнення [69, 71, 72, 76].

У багатоцентровому дослідженні щодо поширеності болю при РС, в якості основних факторів, пов'язаних з розвитком болю [72], вказано на більшу тривалість захворювання, більш старший вік, не ремітуючий перебіг, зменшення фізичної активності і значну інвалідизацію. Тоді як за іншими даними, біль при РС прямо корелює з рівнем тривоги, депресії та втоми і посилюється за умов появи розладів сну та збільшення спастичності [69, 73, 77, 78].

В одних випадках больові синдроми при РС безпосередньо пов'язані з демієлінізуючим процесом в ЦНС та його наслідками, в інших – є результатом коморбідних захворювань, з високою вірогідністю взаємного обтяжуючого

впливу [69, 70, 72]. Однак ступінь і напрямок цього впливу потребують подальшого вивчення.

За даними [79] Чуприни Г.М., Свиридової Н.К., Петренка М.С. (2016), середній рівень поширеності больових синдромів у хворих на РС становить 76,3%. У досліджуваній популяції вони мають більш значне поширення і важчий перебіг за даними показників шкал опитувальника болю МакГілла (ОБМГ) та візуальної аналогової шкали болю (ВАШ) у групі хворих з коморбідною патологією. Найбільш виражені больові синдроми, за даними оцінки показників ОБМГ та ВАШ, відмічаються у пацієнтів із РС з полімодальним перебігом болю та за умов полікоморбідності.

Про зв'язок між РС та болем голови, зокрема, первинним було відомо давно. Згідно даних одного дослідження понад 50% осіб із підтвердженим діагнозом РС відзначали наявність цефалгій (найчастіше, болю голови напруги та мігрені), причому найчіткіша кореляція існувала між наявністю мігрені і рецидивуючо-ремітуючим перебігом основного захворювання [80]. Інше дослідження засвідчило, що первинні цефалгії при РС зустрічаються із частотою 73,5% у фазі ремісії і 38,9% - у фазі загострення. Розколюючий біль голови був найпоширенішою первинною цефалгією під час загострень, а мігрень та біль голови напруги – при ремісіях [81]. Цікаво, що згідно дещо інших даних, при РС біль голови напруги асоціювався зі старшим віком, чоловічою статтю і вторинно-прогресуючим перебігом [82].

В одному дослідженні порівнювали хворих на РС з мігренню і хворих лише на РС. Було виявлено, що в першій групі радіологічно виявляли більш виражене залучення чорної речовини і червоного ядра [83]. Ці знахідки підкреслюють важливий факт, що демієлінізуючі вогнища в одних ділянках мозку, ймовірно, більш асоційовані з виникненням цефалгічних синдромів, ніж в інших. Іншою зоною головного мозку, пов'язаною із розвитком мігреноподібних болів при демієлінізації, є навколоводопровідна сіра речовина. Фактично, у хворих на РС, що мають бляшки тут, а також у середньому мозку, ризик виникнення мігреноподібних станів у чотири рази вищий, порівняно із хворими, в котрих немає залучення згаданої ділянки [84]. В літературі описано кілька випадків, де

дебют або погіршення вже існуючої мігрени були маніфестними симптомами РС [85, 86]. Це ж стосується і кластерного болю голови [87]. Хоча, згадані вище випадки і підкреслюють можливий причинний зв'язок між бляшками РС і подальшим розвитком болю голови, існує припущення і про двонапрямлену залежність між РС та мігренню/болем голови напруги. Говорять про можливий вплив цефалгії не лише на перебіг основного захворювання, але і на його радіологічні характеристики [88].

Існує багато потенційних терапевтичних можливостей в лікуванні цефалічних синдромів у згаданих пацієнтів, хоча цей біль може бути і рефрактерним. Пацієнти із РС часто страждають від різних коморбідностей (депресія, нейропатичний біль, астения), тому дуже важливим є адекватний контроль болю голови, котрий може посилювати депресію в цій популяції хворих.

Також біль може виникати при дистрофічних процесах хребта. Дистрофічні процеси хребта у хворих на РС розвиваються так само, як і в популяції в цілому. В умовах спастичного парезу і атаксії, по-перше, зростає навантаження на паравертебральні м'язи, і по-друге, можуть прискорюватися дистрофічні процеси в міжхребцевих дисках і дуговідросткових суглобах.

Найчастіше люмбалгія та ішіалгія при РС клінічно не відрізняються від больових синдромів при дорзопатії на фоні остеохондрозу хребта. Як результат прогресування дистрофічного процесу в дисках, може розвиватися стиснення спинного мозку останніми. Таку причину больового синдрому на рівні шийного відділу описав К. Bashir [89] у 14 пацієнтів з розсіяним склерозом. Клінічно це проявлялося прогресуючою мієлопатією, цервікалгією, корінцевими синдромами на шийному рівні.

Р. Korovessis et al. [90] повідомляють про хворого, якого до встановлення діагнозу РС тричі оперували з приводу гриж міжхребцевих дисків на рівні шийного, грудного і поперекового відділів. С. Poser [91] виявив при магнітно-резонансній томографії характерні для РС цервікальні вогнища на рівні компресії спинного мозку зміненими міжхребцевими дисками. Подібні результати зареєстровані і Muccilli A al. [92]. Це підтверджує гіпотезу Xydis VG

[93] і Eden D [94] про зв'язок шийного остеохондрозу і вогнищ на рівні шийного відділу спинного мозку. Однак, в літературі по МРТ подібні зміни описуються як «вогнища мієломаляції», що виникають на рівні міжхребцевої грижі.

М.М. Спірін, Є.Г. Безніско, Н.А. Маренічев опублікували окремим розділом в монографії Гусєва Е., Завалішина І., Бойко А. «Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания» [95] результати рентгенографії хребта, виконаної у 25 хворих на розсіяний склероз (36 досліджень), МРТ хребта і спинного мозку у 28 хворих (42 дослідження: 21 - шийного відділу, 15 - грудного, 6 - поперекового). Ті чи інші патологічні зміни дисків і суміжних з ними тіл хребців (звуження міжхребцевої щілини, грижі Шморля, звапніння диска, субхондральної склероз, остеофіти) описано у 93% хворих. Це є дуже високий відсоток виявлення дистрофічних змін, враховуючи, що середній вік пацієнтів відносно невеликий (34,7 +/- 11,0 року), а 50% в групі становлять особи молодше 35 років.

У пацієнтів з РС діють ушкоджуючі фактори, що призводять до прискорення дистрофічних процесів. Є взаємозв'язок рентгенологічних змін, оцінених в балах, і деяких імунологічних показників (рівня активованих Т-лімфоцитів з маркером HLA-DR, $r = 0,77$; $p < 0,05$), рентгенологічних змін шийного відділу хребта і вмісту циркулюючих імунних комплексів ($r = 0,75$; $p < 0,05$). Можна припустити, що аутоімунна агресія при РС спрямована не тільки проти мієліну, а й проти кісткової, хрящової та м'язової тканин.

При МРТ зміни дисків спостерігали у 88,9% хворих (в тому числі, протрузії у 48,2%, випинання гриж в горизонтальній площині у 26,0%, грижі Шморля у 22,2%). У 26,0% було стиснення дурального мішка або спинного мозку зміненими дисками, у 2 хворих виявлені вогнища мієломаляції, причому в однієї з них виявлено три вогнища в шийному відділі спинного мозку, два з яких розцінені як вогнища демієлінізації. Однак дистрофічні зміни хребта у хворих на РС не були настільки виражені, як у пацієнтів з остеохондрозом. У групі розсіяного склерозу виявлені достовірні кореляції МРТ-змін (в балах) з оцінками за шкалою EDSS ($r = 0,4$; $p < 0,05$) та амбулаторним індексом ($r = 0,4$; $p < 0,05$).

Згадані вище автори досліджували також статико-динамічні функції хребта при РС. Досить частими були функціональні блокади міжхребцевих сполучень. У 25% випадків блокади виявлені в шийному відділі, в 50% - в грудному, в 63% - в поперековому відділі. У 94% осіб виявлено одно- і двосторонні функціональні блокади крижово-клубового зчленування. Подібні блокади мали місце незалежно від підвищення або зниження м'язового тону в кінцівках пірамідного або мозочкового характеру.

Клінічні ознаки спондилоартрозу за шкалою А.І. Продана виявлені у 55,0% хворих на РС, що є достовірно частіше, ніж при остеохондрозі (26,5%; $p < 0,05$). При рентгенографії спондилоартроз виявлено у 38,5% пацієнтів.

Порушення статики хребетного стовпа у хворих на РС зустрічалися достовірно частіше, ніж у контрольній групі. Вони полягали в наявності сколіозу (81,7%), сколіотичної постави (15,0%), зміні фізіологічних вигинів хребта в сагітальній площині. Найчастіше зустрічався S-подібний комбінований сколіоз (2 дуги, 2 вершини: ThVII-IX і LI-III, в 75,0%). Зміни положення таза виявлено у всіх обстежених хворих на РС («скручений» таз у 65,0%, «косий» - у 35,0%).

Передумовами для розвитку сколіозу при РС можуть бути координаторні і пропріорецептивні порушення (подібні розлади легкого ступеня виявлено у пацієнтів з сколіозами при спеціальних інструментальних дослідженнях). Крім того, на статистику хребта впливає зміна положення таза, що формується через порушення роботи м'язів, що прикріплюються до тазових кісток.

М'язово-тонічний синдром також був достовірно більш вираженим у хворих на РС, ніж у здорових осіб, значущих відмінностей із групою хворих з остеохондрозом не виявлено. Особливістю при РС є більш «рівномірний» розподіл м'язово-тонічних порушень по відділах хребта, а також помірна вираженість цих порушень, в той час, як при остеохондрозі переважно втягується один відділ із розвитком вираженого м'язово-тонічного синдрому.

Остеопороз при РС зустрічається часто, так як порушується рухова активність, пацієнти проходять тривале лікування глюкокортикоїдами, відзначається низький рівень вітаміну D в крові, серед пацієнтів переважають жінки. Біль, зумовлений остеопорозом, локальний, і, значною мірою,

провокується зміною положення тіла. За даними Cosman F, Nieves J, Komar L et al. [96], спонтанні переломи трапляються у 22% хворих на РС (у здорових людей - в 2%). За два роки спостереження втрата кісткової маси тіл хребців у хворих на РС склала 1,6-3,5%, за відсутності такої в групі контролю. Кісткова маса тіл хребців у жінок з РС була на 10% нижче вікової норми. Подібні порушення збільшують ризик переломів від 2 до 6 разів.

На основі сказаного вище можливо констатувати, що неврологічні порушення при РС прискорюють розвиток різнопланових функціональних та органічних (дистрофічних) процесів у хребті.

1.2. Роль глікозилювання імуноглобулінів в патогенезі розсіяного склерозу

Відомо, що РС виникає у відповідь на утворення аутоантитіл до компонентів ЦНС. При цьому надійні маркери діагностики, перебігу та лікування цього захворювання відсутні. Нашими останніми дослідженнями показано, що аутоімунним захворюванням, до яких відноситься і РС, притаманна поява імуноглобулінів класу IgG із зміненим спектром глікозилювання, які володіють патологічними прозапальними властивостями. При цьому дослідження нативних гліканів імуноглобулінів при РС на момент початку даної роботи не проводилось. Водночас, за участі наукових груп Львівського національного медичного університету виявлено кілька важливих діагностичних критеріїв щодо участі гліканів нативних імуноглобулінів у розвитку аутоімунної патології, зокрема з використанням розробленого цією науковою групою лектин-імуноферментного методу аналізу (Патент UA95297, 2014) показано, що при аутоімунному ревматоїдному артриті зростає експонування фукози на асоційованих з IgG імунних комплексах, та показано зростання співвідношення сіалових кислот до N-ацетилгалактозаміну в ході терапії захворювання, а використання лектин-імуноферментного аналізу дозволило оцінити важкість перебігу хронічного захворювання РА (при порівнянні з іншими клінічними показниками) [97]; показано, що рівень сіялування анти-гістонових антитіл не

лише корелює з рівнем їх прозапального потенціалу та важкістю перебігу аутоімунного захворювання системного червоного вовчаку (яке у більшості випадків характеризується наявністю анти-гістонових аутоантитіл) [98], а рівень сіалювання анти-гістонових імуноглобулінів IgG (аутоантитіл) визначає здатність даних антитіл забезпечувати фагоцитоз відмираючих пізніх апоптичних клітин після опсонізації [99]. Показано, що патогенність анти- β 2GP1-IgG аутоантитіл, які виявляються при вторинному антифосфоліпідному синдромі (аутоімунне захворювання, що вражає систему коагуляції) залежить від глікозилювання імуноглобулінів IgG [100]. Подібні дані, щодо зв'язку глікозилювання ауто-антитіл із важкістю патологій отримані для ревматоїдного артриту, системного червоного вовчаку (СЧВ), міастенічного синдрому Ламберта-Ітона та синдрому Гієна-Барре вони визначаються змінами гліканового складу молекул імуноглобуліну G, і обумовлені важкістю захворювання або терапією [97, 98, 101]. А останні дослідження змін гліканових фрагментів (в даному випадку досліджувались не нативні, а денатуровані форми гліканів), підтвердили зв'язок зміненого глікозилювання імуноглобулінів та аутоімунних патологій (Campbell & Packer, 2016; Wahl et al., 2018)[102, 103] та інші роботи групи під керівництвом Г. Лаук.

Чому ж важливе глікозилювання імуноглобулінів? Відповідь на дане питання криється в будові молекули IgG, два важких та два легких ланцюга білкової молекули IgG з'єднані таким чином (Рис.1А), що молекула IgG має дві чітко виражені ділянки - варіабельну антиген-зв'язувальну ділянку F(ab)₂, спроектованої для максимально ефективного розпізнавання антигену, та відносно константну ділянку Fc (від англ. Fragment crystalizable), названу так за здатністю до кристалізації. Оскільки будова даної ділянки є відносно сталою, їй приділяють менше уваги (у порівнянні з F(ab)₂ ділянкою). Проте, не варто забувати про надважливу функцію даної ділянки – вона зв'язується з ефекторними молекулами, такими як рецептори IgG – FcγR на імуномодуючих клітинах і власне забезпечує функцію імуноглобулінів, передаючи сигнал про розпізнаний антиген ефекторним клітинам імунної системи. Є багато рецепторів FcγR [104], що володіють різною афінністю до

різних структурних конформації молекули IgG, проте усіх їх можна поділити на дві групи – прозапальні та антизапальні відповідно до відповіді, яку чинитиме ефекторна клітина у відповідь на активацію відповідних рецепторів. Експресія різних рецепторів також є різною на різних клітинах імунної системи [105, 106].

До залишку аспарагіну Asn297 кожного з двох важких ланцюгів в Fc ділянці приєднано N-глікан. Даний N-глікан в молекулі IgG на відміну від інших класів імуноглобулінів (IgA, IgD, IgE, IgM) є єдиним сайтом глікозилювання в константній частині молекули (у деяких антитіл у варіабельній ділянці можуть з'являтися сайти додаткового глікозилювання, які є притаманні конкретному типу антитіла і визначаються рекомбінацією генів IgG) [107]. Основу глікану складає його ядро, або кора, побудований із двох залишків глюкозаміну GlcNAc та трьох залишків манози (Man), до першого з них приєднуються два інших утворюючи дві гілки глікану (приєднаних зв'язком у 3- та 6-положеннях). До кінцевих маноз в складі кору можуть приєднуватися залишки глюкозаміну, до них – залишки галактози (Gal), а до залишків галактози – залишки сіалової кислоти (sialic acid, SA). Це максимальний по довжині глікан, який зустрічається в молекулі IgG. В середині кору, до першого залишку глюкозаміну може приєднуватися залишок фукози (приєднання здійснюється $\alpha 1,6$ -зв'язком). Окрім того, до залишку манози, що є місцем «галуження» ланцюга може також приєднуватися залишок ще однієї молекули глюкозаміну, даний залишок стерично вбудовується між приєднаними ланцюгами і тому отримав назву бісектуючого. Приєднання до кожної з гілок гліканів контролюються різними і незалежними ензимами, що призводить до більшої різноманітності глікоформ на імуноглобулінах.

Велика кількість рецепторів із різною спорідненістю та різна кількість глікоформ робить можливим велику кількість взаємодій з різним ефектом. Після кількох років досліджень наші уявлення про ці взаємодії зводяться до наступного (рис. 1.1): зв'язування імуноглобуліну із найбільш повним гліканом носить найбільш антизапальний характер, прозапальні властивості імуноглобуліну зростають із зменшенням довжини глікану, імуноглобулін без глікану не володіє прозапальними властивостями, залишки фукози та бісектуючий глікан

впливають на опосередковану антитілами цитотоксичність ADCC та дозволяють «більш тонко» регулювати про- та анти-запальні властивості молекули IgG. Так, мишачі та людські імуноглобуліни IgG всіх підкласів, позбавлені фукозильних залишків, з підвищеною афінністю приєднувались до рецепторів FcγRIIIa (*Homo sapiens*) і FcγRIV (*Mus musculus*), та відповідно призводили до посилення антитіло-залежної цитотоксичності антитіл. Бісектуючий глікан може впливати на експонування фукозильних залишків [108].

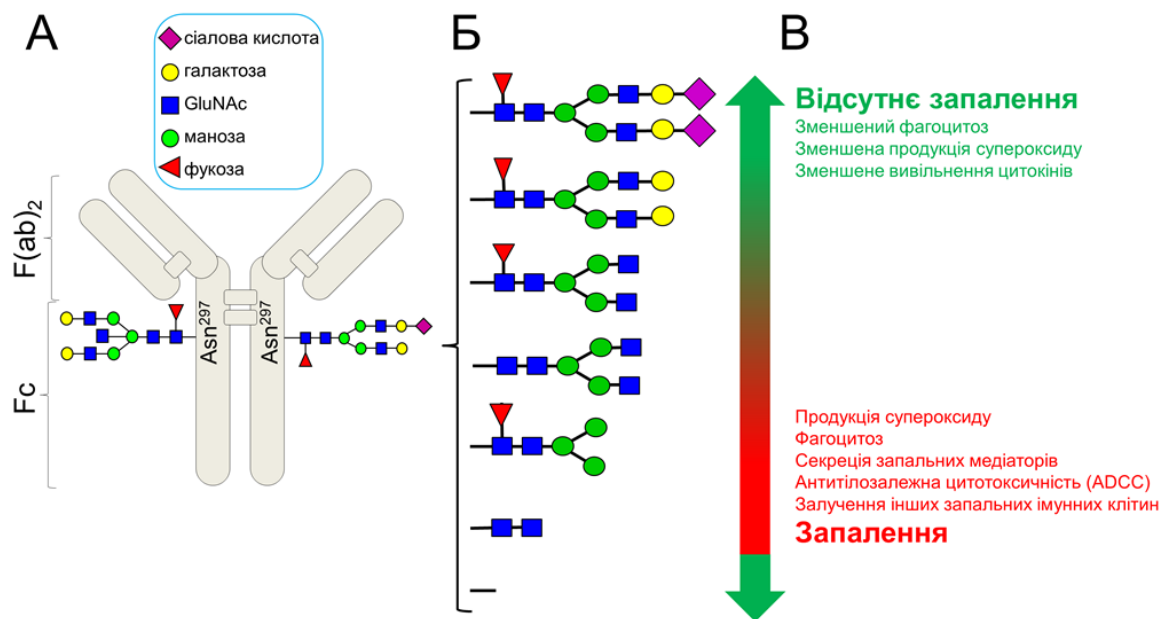


Рисунок 1.1 – Вплив глікозилювання на будову молекули імуноглобуліну IgG.

А – схема розміщення гліканів в складі молекули IgG. Б – окремі типи гліканових залишків та (В) – їх вплив на про- та антизапальні властивості молекули IgG. За матеріалами (Biermann et al., 2016; Knopf, HC Biermann, E Muñoz, & Herrmann, 2016)

Використовуючи дані властивості фукозильних залишків, були розроблені та використані у клінічній практиці препарати терапевтичних антитіл другого покоління, у складі яких відсутні залишки фукози, що важливо для забезпечення оптимальної антитіло-залежної клітинної цитотоксичності. Водночас, термінальні залишки сіалової кислоти є негативно зарядженими, а будучи спрямовані один до одного в складі молекули IgG вони взаємо відштовхують ланцюги Fc ділянки надаючи їй більш «бочкоподібної» форми та, відповідно,

антизапальних властивостей (внаслідок зміни афінності до відповідних рецепторів) [109, 110, 111, 112].

Оскільки багато з молекул вуглеводів є ізомерами, тому при використанні методів їх детекції, які включають визначення їх молекулярної маси (а це наразі всі денатуруючі методи аналізу, як мас-спектрометрія, капілярний електрофорез, рідинна хроматографія) визначається лише маса усіх можливих ізомерів глікану, а не якийсь конкретний їх тип. Так манози та галактози є гексозами і при визначенні часто виявляють лише число гексоз в молекулі, відповідно гексози позначають як “Н”. Але, оскільки залишки галактози приєднані до ланцюгів що містять манози, то структура Н3 позначає три манозні залишки (корглікану), водночас Н4 може позначати три манози і одну галактозу. Відповідно глюкозаміноглікан позначають “N”, фукозу “F”, сіалові кислоти “S”, а числом вказують кількість залишків у молекулі. На основі даної класифікації описані наступні глікани в складі молекули IgG (рис. 1.2).

Особливість використаного методу детекції гліканів на основі лектинів є його здатність розпізнавати окремі конкретні вуглеводні залишки.

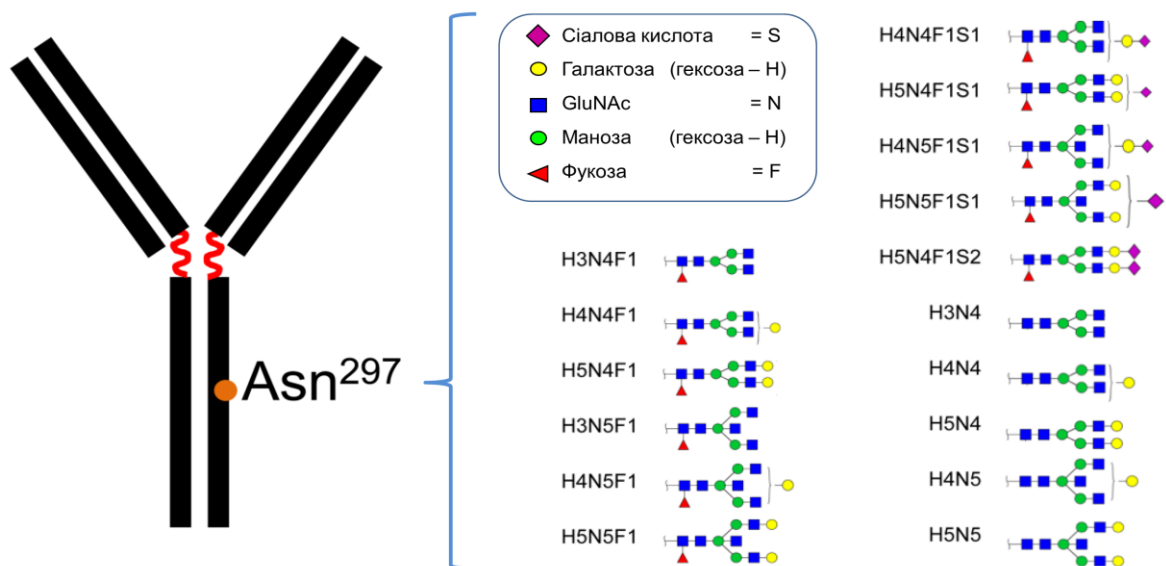


Рисунок 1.2 – Основні глікоформи, що виявляються в складі імуноглобуліну IgG методом мас-спектрометрії

Як видно, різноманітність гліканів в складі імуноглобулінів, а також вплив імуноглобулінів на функцію антитіл робить їх як цікавими об'єктами-маркерами

захворювань, так і потенційними терапевтичними агентами, адже знаючи конфігурацію необхідного глікану про-запальні антитіла можна перетворити у анти-запальні, як це показано, наприклад у моделі ревматоїдного артрити у лабораторних мишей [14].

Водночас, на початок даної роботи зміни нативних глікоформ імуноглобулінів при РС не досліджувались. У статті (Wuhrer et al., 2015) [113] описано дослідження гліканів імуноглобуліну IgG1 в сироватці та цереброспінальній рідині при РС методами мас спектрометрії. В роботі визначено вміст окремих вуглеводнів в складі гліканів досліджуваних імуноглобулінів. Було проаналізовано пари зразків імуноглобулінів IgG виділених із сироватки крові та цереброспінальної рідини і показано відмінності у глікозилюванні групи IgG1 у ЦСР хворих на РС у порівнянні із здоровими донорами. Відмінностей глікозилювання IgG1 у сироватці крові виявлено не було. Показано, що у ЦСР хворих на РС виявлено підвищений вміст бісектуючого N-ацетилгалактозаміну (GlcNAc), рівень афукозилювання та галактозилювання був знижений. Останні зміни є відомими факторами, що посилюють ефекторну функцію IgG. Регресійним аналізом показано, що зміни глікозилювання ЦСР досягають свого піку через 2-3 місяці після останнього рецидиву захворювання. Водночас будову гліканів, змінених при РС встановити не вдалось через інструментальні обмеження методу.

Зважаючи на те, що РС є антитіло-залежним захворюванням, а запальні процеси міняють глікозильний склад IgG в даній роботі було проаналізовано зміни глікозильних детермінант на загальних та патологічних аутоантитілах у сироватці та в ЦСР хворих на РС.

1.3. Імуноглобуліни церебро-спінальної рідини при розсіяному склерозі

Незважаючи на значний прогрес у медичній діагностиці, наші уявлення про нормальні значення білків у цереброспінальній рідині (ЦСР), проникність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), вміст глюкози в ЦСР базуються на даних, які давно не оновлювались [114].

ЦСР є основним діагностичним джерелом, оскільки омиваючи тканини мозку вона буде першим середовищем, де можуть накопичуватись «маркери» захворювання пов'язаного з ЦНС. Оскільки на сьогодні досі не відомі збудники РС, не існує жодного специфічного антитіла (як при інфекційних захворюваннях), присутність якого вказувала б на наявність РС [114]. З кожним із чотирьох оновлень діагностичних критеріїв РС, що мали місце за останні 20 років [115, 116, 117, 118], аналіз ЦСР ставав все менш і менш важливим для підтвердження РС, аж до останніх оновлень у 2010 році, які відзначають важливість аналізу ЦСР.

В нормальній ЦСР більшість білків, включаючи імуноглобуліни, походять із плазми крові, яка дістається вентрикулярного та субарахноїдального простору та відфільтровується у гематоенцефалічному бар'єрі. Фактори, які впливають на кінцеву концентрацію білків (перенесених із плазми крові) у ЦСР включають:

А) концентрацію білка в плазмі крові, (якби гематоенцефалічний бар'єр був повністю інтактним, тоді концентрація цих білків була б пропорційною такій у плазмі);

Б) розмір білкової молекули, для білків із глобулярною формою здатність білка до проникнення через гематоенцефалічний бар'єр є обернено пропорційною до його діаметру (і таким чином до молекулярної маси);

В) функціональний стан гемато-енцефалічного бар'єру. Ушкодження ГЕБ збільшує швидкість трансудації усіх білків плазми та зростання їх концентрації у ЦСР. Зважаючи на концентрацію імуноглобулінів у ЦСР – більшу за очікувану за умов непроникності гематоенцефалічного бар'єру та враховуючи їх концентрацію в сироватці – автори [119] вказують на ймовірне джерело

продукції імуноглобулінів в центральній нервовій системі. Відомо, що електрофоретичний спектр імуноглобулінів в ЦСР відрізняється від такого в сироватці [119]. Коли відбувається локальний синтез імуноглобулінів в ЦНС, на електрофорезі ЦСР (агарозному, в поліакриламідному гелі чи внаслідок розділення ізоелектрофокусування) у дифузній зоні імуноглобулінів починають виявлятися чіткі олігоклональні смуги (вони виникають внаслідок високої концентрації якихось конкретних – можливо патологічних – антитіл). Така картина отримала в клініці назву олігоклональних антитіл (невеликої кількості клонів), коли кожна смуга відповідає продукту окремого клону секреторних лімфоцитів в межах ЦНС [120]. Оскільки IgG складають понад 90% від усіх гамма-глобулінів у ЦСР, «олігоклональні антитіла» зазвичай відносять до цього класу імуноглобулінів. Поява олігоклональних смуг є наслідком низького вмісту гамма-глобулінів у ЦСР. Нормальний рівень гамма-глобулінів, як от IgG, в ЦСР становить менше 40 мг/л (у сироватці – 16 000 мг/л). Тобто різниця в концентрації становить ~400 разів. Тож, якщо інтратекально синтезується всього 10 мг/л білків (що є відносно малою концентрацією для активних В-лімфоцитів), вміст синтезованих IgG буде складати 25% від загальної їх вмісту, а зважаючи, що такий синтез може забезпечитись дочірніми клітинами одного клону (гермінативного центру) є зрозумілою поява олігоклональних смуг. Проте, при РС можливий синтез IgG до рівня 200 мг/л (що становить лише 1/80 від вмісту у сироватці, але 500% від нормального вмісту у ЦСР).

На сьогодні виділяють наступні стани, пов'язані із надмірним синтезом олігоклональних смуг IgG (які виявляють ізоелектрофокусом [121], хоч з 2005 року метод електрофорезу рекомендують доповнювати імуноблотом проти IgG[122]) :

- 1) демієлінізуючі розлади
- 2) хронічні інфекції ЦНС зумовлені вірусами, бактеріями, амебами та гельмінтами
- 3) група станів, пов'язаних із зміненою імунною відповіддю, що включає такі стани як системний червоний вовчак (СЧВ), синдром Бехчета, нейросаркоїдоз, неврологічні прояви ЦНС, увео-менінгіт та ін.[123].

Олігоклональні смуги можуть спостерігатись в ЦСР, сироватці крові, чи в них обох. При РС окремі олігоклональні смуги виявляються в ЦСР, але відсутні в сироватці, що вказує на їх походження в межах гематоенцефалічного бар'єру. Наявність олігоклональних смуг в ЦСР є ознакою патології, але не тестом специфічним для виявлення РС [119, 124].

Дослідження розподілу імуноглобулінів з використанням радіоактивних міток підтвердили, що за нормальних умов джерелом IgG в ЦСР є сироватка, але при запальних патологіях пов'язаних з активацією В-лімфоцитів та плазматичних клітин у цереброспінальному просторі останні стають джерелом «надлишкових» IgG. Було показано, що при РС спостерігається міграція В-лімфоцитів із периферичної крові у церебральну паренхіму, зокрема в перивенозний простір церебральних кровоносних судин. Ці клітини здатні секретувати імуноглобуліни у позаклітинну рідину мозку. За деякими оцінками, в мозку пацієнтів з РС знаходиться до 10^8 плазматичних клітин, із загальною синтетичною здатністю до 100 мг/день IgG. За нормальних умов мозкова тканина не містить, або містить дуже мало, плазматичних клітин. При РС імуноглобулін-вмісні клітини (плазматичні клітини, як вони виявляються імуногістохімичними методами) зосереджені в ділянках демієлінізації, а давніші ділянки ушкодження мають набагато менше цих клітин, ніж новоутворені вогнища. Плазматичні клітини з крові навряд чи можуть переходити через гематоенцефалічний бар'єр, отже, основним джерелом патологічних імуноглобулінів вважають лейкоцити, які проникли з крові, і перетворившись на плазматичні клітини в нервовій тканині, продукують аутореактивні імуноглобуліни [125, 126].

При дослідженні розподілу олігоклональних смуг ізоелектричним фокусуванням було встановлено, що деякі смуги виявляються більше ніж в одному вогнищі, в той час як інші-притаманні якійсь конкретній ділянці ураження. Це показує, що хоч в усіх випадках стимулюючим може виступати один антиген, клони плазматичних клітин, які синтезують антитіла, виникають від різних материнських клітин, які в свою чергу, займають певні окреслені ділянки в мозку. Наприклад, при такому захворюванні як підгострий склерозуючий паненцефаліт (Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) -also

known as Dawson disease) на противагу до РС, олігоклональні смуги із різних вогнищ запалення є схожими, що вказує на більш генералізовану продукцію антитіл у порівнянні з РС.

При інфекційних захворюваннях ЦНС до 90% всієї антигенної активності антитіл в олігоклональних смугах спрямовано проти інвазивного збудника захворювання (тобто 90% антитіл спрямовані на розпізнавання та нейтралізацію збудника). При РС – антигенна специфічність антитіл в основному напрямлена проти різних компонентів імунної системи [127, 128], що накладає обмеження у використанні олігоклональних смуг в діагностиці аутоімунних розладів ЦНС, зокрема РС [129].

Використання аналізу ЦСР при діагностиці РС підсумовано в наступних оглядових та консенсусних роботах: [122, 129, 130].

Тому в представленій роботі ми вирішили проаналізувати особливості глікозилування IgG в ЦСР з метою пошуку нових більш надійних маркерів РС, а також встановлення їх зв'язку із змінами глікозилування IgG у сироватці пацієнтів із РС.

1.4. Біомаркери церебро-спінальної рідини при розсіяному склерозі

Оцінка активності перебігу РС є важливою для надання адекватної допомоги пацієнту. На даний час ця оцінка заснована на кількості рецидивів, прогресуванні інвалідності та появі нових вогнищ на МРТ. Надійних біомаркерів, що відображають субклінічне захворювання, все ще бракує.

Прогнозування клінічного прогресування РС залишається великою проблемою. Складність відображає велику неоднорідність захворювання. Аксональна дегенерація накопичується протягом захворювання і є основною причиною постійної неврологічної дисфункції у хворих на РС. Оцінка аксональної дегенерації ґрунтується, головним чином, на клінічних параметрах та результатах МРТ, однак ці параметри не є дуже точними. Більш ефективні біомаркери аксональної дегенерації потребують детального вивчення [131, 132].

Декілька цитокінів та хемокінів церебро-спінальної рідини були вивчені,

як потенційні маркери активності РС. Ці молекули беруть участь у запальній відповіді як модулятори клітин та міграції до місць запалення. Підвищення прозапальної дії та зменшення прозапальних цитокінів та хемокінів відбувається під час загострень РС [133].

Ліганд хемокіна 13 (CXCL13) є В-клітинним хіміотрактантом, який бере участь у формуванні В-клітинних фолікулів, що мають важливе значення в патофізіології РС. CXCL13 підвищується у ЦСР пацієнтів із РС, і його рівень, корелює з активністю захворювання [134, 135]. Вважається, що присутність В-клітинних фолікулів відіграє важливу роль у клінічному прогресуванні РС [136, 137]. Одне дослідження показало, що CXCL13 постійно збільшується при прогресуючому РС, що свідчить про те, що CXCL13 корелює з клінічним прогресуванням захворювання [138]. Однак більш перспективні дослідження все ще необхідні для оцінки ролі CXCL13 в прогностичній оцінці РС. CXCL13 корелює з активністю В-клітин при РС, тому він є хорошим кандидатом в біомаркери для оцінки ефективності терапії, орієнтованої на В-клітини, таких як ритуксимаб та окрелізумаб. Було показано, що в лікворі CXCL13 знижувався під час терапії ритуксимабом [139, 140]. Інші імунодепресивні методи лікування також здатні знизити рівень CXCL13 у лікворі [141]. Майбутні дослідження можуть врахувати, що цей біомаркер прогнозує терапевтичну відповідь, особливо у кандидатів на терапію В-клітинами [142]. CXCL13 у ЦСР виявляється перспективним біомаркером ЦНС при оцінці активності РС, хоча кількість досліджень все ще невелика і результати недостатньо надійні, щоб запропонувати її використання в рутинній клінічній практиці.

Фетуїн А (alpha-2-HS-glycoprotein) – це глікопротеїн, виявлений протеомічним аналізом церебро-спінальної рідини. Його рівні корелюють з підвищеним ризиком переходу від клінічно ізольованого синдрому до ремітуючо рецидивуючого розсіяного склерозу [143]. Цей глікопротеїн збільшується у пацієнтів із вторинно прогресуючим розсіяним склерозом, а також у лікворі пацієнтів з ремітуючо рецидивуючим розсіяним склерозом, що дозволяє припустити, що підвищений фетуїн А потенційно корисний як маркер активності РС [144,145]. Рівень в ЦСР фетуїну А був знижений у пацієнтів, які отримували

наталізумаб протягом 1 року [144, 145, 146]. Необхідні додаткові дослідження з цим та іншими лікарськими засобами для оцінки ролі цього біомаркера в оцінці терапевтичної відповіді у пацієнтів із РС.

Нейрофіламенти (Nf) є найважливішим компонентом аксонального цитоскелету в нейронах і складаються з трьох ланцюгів: легкий (NfL) з 68-70kDa, проміжний (NfI) з 145-160kDa і важкий (NfH) з 200-220kDa. Вони забезпечують структурну підтримку нейронів і регулюють діаметр аксона. Нейрофіламенти виділяються у значній кількості після пошкодження аксонів або дегенерації нейронів. У цих ситуаціях Nf потрапляє в інтерстиціальну та церебро-спінальну рідину [147]. При РС концентрація NFL в лікворі збільшуються після рецидивів, досягаючи свого піку через 2 тижні після початку симптомів, залишаючись підвищеними протягом щонайменше 15 тижнів після загострення [148, 149]. Рівень нейрофіламентів церебро-спінальної рідини пов'язаний з наявністю МРТ вогнищ, що накопичують гадоліній [150]. Ці дані свідчать про те, що підвищений рівень нейрофіламентів у лікворі корелює з клінічними та МРТ-параметрами, будучи потенційним біомаркером клінічної активності РС. Рівень легких нейрофіламентів у спинно-мозковій рідині відображає пошкодження нейронів і потенційно корелює з аксональною дегенерацією. Високі рівні нейрофіламентів NfL у лікворі були позитивно корельовані з більш високим показником вираженості РС. Крім того, більш високі рівні NfL були пов'язані з більш високим ризиком перетворення з ремітуючо рецидивуючого розсіяного склерозу у вторинно прогресуючий розсіяний склероз [151]. Деякі дослідження показали, що більш високі рівні NFL в лікворі були пов'язані з тривалим прогресуванням інвалідності [152-154]. NFL у церебро-спінальній рідині є потенційним біомаркером для пошкодження нейронів та клінічного прогресування РС. Рівень NFL у лікворі був значно знижений після імуносупресивного лікування мітоксантроном [141]. Рівень NfL у спинномозковій рідині також перевірявся у пацієнтів з РС, які отримували наталізумаб, із помітним зниженням під час лікування [154]. Рівень NfL церебро-спінальної рідини також вивчався у пацієнтів, які отримували фінголімод, та знижені рівні спостерігалися після лікування [155]. У пацієнтів, які отримували

фінголімод, не знижуючи рівня NfL у лікворі, було клінічне погіршення та поява нових вогнищ на МРТ. Ці висновки дозволяють припустити, що принаймні деякі методи лікування РС асоціюються з прогресивним зниженням рівня NfL в лікворі, і що постійне підвищення рівнів NfL в ЦСР може свідчити про погану терапевтичну реакцію. Потрібні додаткові докази, але наявні дані підтверджують використання цього біомаркера в клінічних випробуваннях у пацієнтів із РС.

Маркери гліального пошкодження церебро-спінальної рідини також були протестовані у хворих на РС. Гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) є компонентом ниток астроцитів. Підвищений рівень GFAP у лікворі відображає пошкодження астроцитів. У лікворі хворих на розсіяний склероз підвищений рівень GFAP порівняно з контролем. Пацієнти із розсіяним склерозом з більш важкою інвалідністю мають більш високий рівень GFAP у лікворі, ніж пацієнти з меншими обмеженими можливостями та контрольною групою, що дозволяє припустити, що GFAP у лікворі може бути біомаркером клінічного прогресування та прогнозу даного захворювання [156-159].

Більш перспективні дослідження, що співвідносять рівень біомаркерів нейронної та гліїної дегенерації з клінічними та нейровізуальними даними, все ще необхідні для більш точного встановлення їх ролі в прогнозуванні прогресування РС.

Основний білок мієліну (ОБМ) є компонентом мієліну центральної нервової системи. Рівень базового мієлінового білка в лікворі раніше був протестований як предиктор клінічного прогресування. Спостерігали підвищення рівня ОБМ церебро-спінальної рідини при загостренні захворювання, однак високий рівень ОБМ не підвищувався в міру прогресування захворювання [138, 160]. Хоча потенційний маркер ОБМ не корелює з клінічною прогресією РС.

Фактор некрозу тканин (TNF- α) церебро-спінальної рідини є прозапальним цитокіном. Суперечливі результати з цим біомаркером були виявлені при РС. Проте деякі дослідники описали зв'язок між рівнями (TNF- α) церебро-спінальної рідини та активністю РС [161, 162].

Остеопонтин - це матричний білок, який працює як протизапальний

цитокін. Рівні цього білка з плейотропними функціями співвідносяться з рецидивами та активністю захворювання. Рівень остеопонтину цереброспінальної рідини був знижений у пацієнтів під час лікування наталізумабом [163].

В останні роки з'явилося кілька варіантів терапії РС. Для оптимізації використання цих препаратів було запропоновано багато алгоритмів, більшість з яких засновані на виникненні клінічних рецидивів, клінічному прогресуванні та появі нових вогнищ на МРТ. Були також оцінені деякі нові параметри, такі як активність захворювання та атрофія мозку. Однак параметри для оцінки ефективності лікування все ще є неточними. Вклад вимірювання деяких біомаркерів у лікворі та оцінці ефективності терапії вивчається [164].

Недавні дослідження з новими біомаркерами свідчать про те, що аналіз ліквору є надзвичайно важливим для встановлення достовірного діагнозу РС та його прогнозу. Нові біомаркери цереброспінальної рідини можуть сприяти оцінці активності захворювання, прогностичній оцінці та терапевтичному моніторингу РС.

Багато інших молекул в лікворі, такі як CHI3L1, IL-6 або CXCL13, демонструють потенціал як маркери для клінічної практики, але для підтвердження їх важливості необхідні подальші дослідження.

Біомаркери потрібні для прогнозування перебігу захворювання та реакції на лікування. Незважаючи на те, що біомаркери в сироватці крові є досить інформативними біомаркери цереброспінальної рідини, надають інформацію, про те, що стосується ЦНС, з меншою варіабельністю.

Висновки до розділу 1

РС – хронічне аутоімунне демієлінізуюче захворювання ЦНС, в патогенез якого залучені клітинні і гуморальні імунні механізми. В останні роки відзначається стрімке зростання поширеності РС, а також інших системних та аутоімунних захворювань. У зв'язку з цим коморбідна патологія в осіб, які

страждають РС, перестає бути рідкістю і набуває важливого науково-практичного значення. Оскільки в розвитку багатьох імунних (і зокрема – нейроімунних) патологій, лежать єдині патогенетичні механізми, існує думка про те, що в пацієнтів, котрі мають одне захворювання аутоімунної природи, не можна виключати наявність коморбідних станів з високим ризиком ураження інших органів і систем, причому ймовірність приєднання супутньої патології залежить як від форми основного захворювання, так і від генетичного дефекту, що лежить в його основі.

Актуальність вивчення коморбідної патології, потенційно здатної вплинути на перебіг основного захворювання, визначається також значною гетерогенністю клінічної картини РС, необхідністю пошуку маркерів несприятливого перебігу захворювання. Також широке використання в останні роки хворобо-модифікуючих препаратів і розширення їх спектра вимагають стратифікації ризиків даної терапії. Можливо вивчення різних фенотипів РС (наприклад, РС в поєднанні з коморбідними розладами) допоможе в розробці діагностичних і прогностичних маркерів перебігу цього захворювання і дозволить забезпечити профілактику ускладнень терапії.

Незважаючи на велику кількість досліджень, проблема коморбідних захворювань у хворих на РС до кінця не вивчена, отримані результати багато в чому суперечливі. У міру того як нові високоефективні імунотропні препарати будуть широко впроваджуватися в клінічну практику, не можна виключати розвитку коморбідних станів, не типових як для природного перебігу РС, так і для терапії препаратами першого ряду. Всі пацієнти з РС до початку лікування і на фоні прийому хворобо-модифікуючих агентів повинні періодично проходити скринінг для ранньої діагностики коморбідної патології. Необхідне продовження проведення поглиблених епідеміологічних, генетичних і клініко-імунологічних досліджень для оцінки співвідношення ефективності і безпеки нових груп ліків від РС в сенсі ятрогенної коморбідності.

Беручи до уваги, що в патогенезі РС ключова роль відводиться імунним (лабораторним) змінам, ймовірно, ці відхилення можна виявити за допомогою лабораторних тестів. Більше того, за причинно-наслідковим зв'язком, виявлення

подібних змін в лабораторних показниках повинно передувати виявленню наслідків процесу демієлінізації – вогнищам на МРТ. Саме тому, в останні десятиліття особливий інтерес становлять лабораторні біомаркери РС.

Хоча процес пошуку та валідизації біомаркерів є досить тривалим (як правило триває більше 20 років) та складним, безумовно, надзвичайно важливим є відкриття та впровадження у рутинне використання нових біомаркерів при РС із вираженими діагностичними та прогностичними якостями.

Згідно з останніми рекомендаціями, дослідження біомаркерів в лікворі дозволяє на ранньому етапі встановити діагноз підтвердженого РС, саме тому, проведення люмбальної пункції з дослідження ліквору повинно бути стандартною процедурою для первинних хворих із підозрою на РС.

Існує цілий ряд лабораторних біомаркерів РС, що здатні не лише виявляти це захворювання, а й характеризувати його особливості та передбачати клінічний перебіг. Однак, досі не розроблено алгоритму використання таких діагностично-прогностичних лабораторних тестів при цьому захворюванні.

Все вказане вище визначає актуальність проведених нами досліджень.

Результати власних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Гичка КМ. Неврологічна коморбідність при розсіяному склерозі. Прикарпатський вісник НТШ. Пульс. 2017;(8):119–129.
2. Негрич ТІ, Гичка КМ, Матвієнко ЮО. Больові та вертеброгенні синдроми у хворих на розсіяний склероз. Медичні науки. 2018;52(1):46-56.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна характеристика хворих та дизайн дослідження

Представлена робота виконана на кафедрі неврології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та у Львівському обласному науковому центрі з вивчення проблем розсіяного склерозу та інших демієлінізуючих захворювань, що знаходиться на базі неврологічного відділення КЗ ЛОР «ЛОКЛ». Експериментальні (імунобіологічні) дослідження сироватки крові та цереброспінальної рідини були проведені на кафедрі гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького у відповідності до підписаної угоди про науково-медичну співпрацю. Робота виконувалась у термін з 2016 по 2019 рр.

Організація дослідження ґрунтувалася на положеннях Гельсінської декларації. Комісією з питань біомедичної етики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол №5 від 23 лютого 2017 р.), (протокол № 9 від 31 жовтня 2017 р.) та (протокол № 6 від 28 вересня 2020 р) встановлено, що це наукове дослідження відповідає етичним та моральноправовим вимогам згідно з наказом МОЗ України № 281 від 01.11. 2000 р. Від усіх хворих отримали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Було проведено клініко-неврологічне, МРТ та лабораторне обстеження 141-му хворому на РС різного віку та статі, які проходили комплексне стаціонарне або амбулаторне лікування у неврологічному відділенні КЗ ЛОР Львівської обласної клінічної лікарні на клінічній базі кафедри неврології у період з 2016 по 2019 рр.

Критеріями включення пацієнтів у дослідження були: згода хворого на участь у дослідженні, достовірний діагноз РС згідно з критеріями МакДональда 2010 року [165], вік від 18 до 60 років. Критерії виключення: неможливість

надати письмову згоду на участь у дослідженні, вагітність, вік молодший за 18 років та старші понад 60 років.

У ході клінічного обстеження збирали анамнез життя та хвороби пацієнтів, проводили клініко-неврологічний та соматичний огляди.

При клініко-анамнестичному аналізі оцінювали анамнестичні дані, отримані під час розмови з хворим або взяті з медичної документації, з обов'язковим уточненням віку і статі хворого, тривалості РС.

При клініко-неврологічному огляді оцінювали неврологічний статус, перебіг захворювання та тяжкість стану пацієнта.

При детальному фізикальному обстеженні оглядали пацієнтів за системи 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 дали змогу виключити патологію інших органів і систем, які б змогли вплинути на результати проведених імунологічних тестів.

Робота проводилась у чотири етапи. На першому етапі власних досліджень вивчали особливості клінічного перебігу розсіяного склерозу з урахуванням коморбідної патології, досліджували поширеність та структуру коморбідної патології у обстежених хворих, визначали кореляційний зв'язок між ступенем важкості РС за сумою балів за шкалою EDSS та віком на момент виникнення коморбідного захворювання. Для вирішення цього завдання було обстежено 77 пацієнтів із загальної групи ($n=141$), у яких було документально підтверджено поєднання РС та супутньої патології. Усі хворі, які ввійшли до досліджуваної групи, знаходилися на стаціонарному або амбулаторному лікуванні у КЗ ЛОР «ЛОКЛ», або ж отримували консультації у Львівському обласному науковому центрі з вивчення проблем розсіяного склерозу та інших демієлінізуючих захворювань.

Обстежені пацієнти з досліджуваної групи перебували у віці від 18 до 60 років. Середній вік дебюту РС – $(28,26 \pm 1,17)$ року (від 12 до 51 року), коморбідних захворювань – $(31,26 \pm 1,06)$ року (від 5 до 54 років). У чоловіків

середній вік дебюту РС становив ($24,21 \pm 1,78$) року, а у жінок – ($30,71 \pm 1,45$) року ($p < 0,05$). Середня тривалість РС у хворих дорівнювала ($9,60 \pm 0,61$) року. Оцінка за шкалою EDSS показала, що пацієнти мали бал шкали EDSS від 1,5 до 5,5, середній бал – ($3,19 \pm 0,15$). З-поміж обстежених пацієнтів переважали жінки – 62,34% ($n=48$), а 37,66% ($n=29$) були чоловіки, що відповідає загальним гендерним особливостям поширення розсіяного склерозу у популяції. За віковою ознакою хворих було розділено на 4 групи (рис. 2.1):

-18-32 роки – 40,26% ($n=31$), з них 61,29% ($n=19$) – чоловіки і відповідно 38,71% ($n=12$) - жінки;

-33-47 років – 33,77% ($n=26$), у цій віковій категорії осіб жіночої статі – 76,92% ($n=20$), чоловіків відповідно – 23,08% ($n=6$);

- 48-55 років – 23,38% ($n=18$), у цій групі жінок було 77,78% ($n=14$), а чоловіків – 22,22% ($n=4$)

- >56 років – 2,60% ($n=2$), у цій групі були тільки жінки 100%, чоловіків представлено не було 0%.

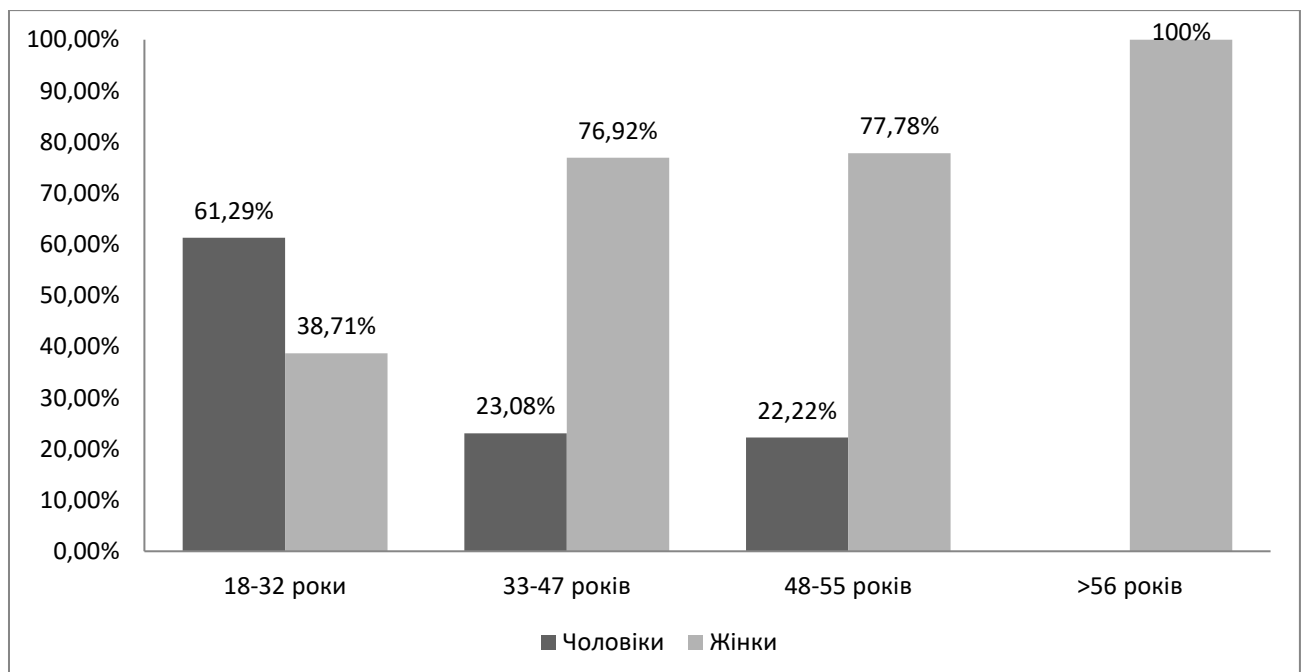


Рисунок 2.1 – Вікова структура хворих на РС, з коморбідними захворюваннями

За тривалістю перебігу РС пацієнтів було розділено на наступні групи:

- 1-5 років – 27,27% (n=21), з них 61,90% (n=13) – чоловіки і відповідно 38,10% (n=8) – жінки;

- 6-10 років – 32,47% (n=25), у цій групі осіб жіночої статі – 76,00% (n=19), чоловіків відповідно – 24,00% (n=6);

- >11 років – 40,26% (n=31), серед них – жінок 67,74% (n=21), у той час чоловіків – 32,26% (n=10).

За тривалістю перебігу коморбідної патології пацієнтів розділили на ідентичні за тривалістю групи:

- 1-5 років – 50,43% (n=59), з них 64,41% (n=38) склали жінки, відповідно 35,59% (n=21) – чоловіки;

- 6-10 років – 29,06% (n=34), у цій групі 61,76% (n=21) – жінки, 38,24% (n=13) – чоловіки;

- >11 років – 20,51% (n=24), з них 83,33% (n=20) склали жінки, відповідно 16,67% (n=4) – чоловіки.

Серед обстеженого контингенту пацієнтів $6,49 \pm 2,81\%$ (n=5) – курці, з них 20,00% – жінки (n=1) і, відповідно, 80,00% (n=4) – чоловіки.

На другому етапі наукової роботи вивчали діагностичне та прогностичне значення процесів глікозилювання імуноглобулінів у зразках сироватки крові та ліквору хворих на РС. Було проведено аналіз експонування гліканів у сироватці крові та цереброспінальній рідині (ЦСР) у хворих на розсіяний склероз. Із загальної групи (n=141) відібрали 20 зразків сироватки крові хворих на розсіяний склероз, з них 12 зразків ліквору хворих на РС, а також проаналізували 18 зразків сироватки крові здорових донорів. Усі зразки отримали за добровільної згоди пацієнтів, які перебували на комплексному амбулаторному або стаціонарному лікуванні на клінічній базі кафедри неврології (неврологічне відділення КЗ ЛОР Львівської обласної клінічної лікарні) у період з 2016 по 2019 рр.

Обстежені особи з досліджуваної групи знаходилися у віці від 23 до 49 років. Середній вік досліджуваних становив $35,0 \pm 7,1$ років. Серед оглянутих хворих було 15 жінок (75,0%) та 5 чоловіків (25,0%). У 8-ми пацієнтів (40,0%) діагностували КІС, а у 12-ти (60,0%) – клінічно достовірний РС. Тривалість хвороби у цих пацієнтів перебувала в межах від 1 до 13 років, з середнім

(медіанним) значенням 1 [1; 5,3] років. Бал EDSS в обстежених знаходився у діапазоні від 1,5 до 4,5 балів, з середнім значенням 2,3 [2,0; 3,1] бали.

На третьому етапі проводили дослідження парних зразків сироватки крові та цереброспінальної рідини хворих на РС щодо змін глікозилювання імуноглобулінів. Із 12-ти хворих описаних на другому етапі було відібрано та проаналізовано 7 пар зразків сироваток крові і цереброспінальної рідини. Обстежені пацієнти перебували у віці від 25 до 41 років. Середній вік досліджуваних становив $33,0 \pm 5,8$ років, з поміж них було 6 жінок (85,7%) та 1 чоловік (14,3%). Тривалість хвороби у цих пацієнтів перебувала в межах від 1 до 13 років, з середнім (медіанним) значенням 1 [1; 1] років. Бал EDSS у цих хворих знаходився у діапазоні від 1,5 до 2 балів (у всіх пацієнтів був легкий перебіг патологічного процесу), з середнім значенням $1,8 \pm 0,3$ бали. Отримані дані порівнювали з показниками контрольної групи, яку склали 9 практично здорових осіб відповідного віку та статі.

На четвертому етапі власних досліджень визначали експонування глікозильних залишків на аутоантитілах до ОБМ та загальних антитілах сироватки крові хворих на розсіяний склероз залежно від клінічних особливостей захворювання та проведеної терапії. На цьому етапі залучили в дослідження 44 пацієнти із загальної групи ($n=141$) та поділили їх на наступні підгрупи пацієнтів: первинні (неліковані) пацієнти – 17 осіб, пацієнти, які отримували терапію кортикостероїдами – 12 осіб, пацієнти, які лікувалися інтерфероном $\beta 1b$ (ІФН) - 15 осіб. Усі зразки отримали за добровільної згоди пацієнтів, які перебували на комплексному амбулаторному або стаціонарному лікуванні на клінічній базі кафедри неврології (неврологічне відділення КЗ ЛОР Львівської обласної клінічної лікарні) у період з 2016 по 2019 рр. Середній вік обстежених становив $38,5 \pm 1,37$ років. З поміж оглянутих хворих була 21 жінка (47,7%) та 23 чоловіки (52,3%). З'ясовано, що тривалість хвороби у цих пацієнтів перебувала в межах від 0 до 26 років, з середнім значенням $7,9 \pm 0,93$ роки. Бал за шкалою EDSS в обстежених перебував у діапазоні від 1,5 до 7 балів, з середнім значенням $3,7 \pm 0,24$ бали. Отримані результати у хворих порівнювали з

показниками контрольної групи, яку склали 23 практично здорові особи відповідного віку.

Контрольна група. Контрольна група включала 32 здорові особи відповідного віку та статі, які були одноразовими донорами крові Львівського обласного центру служби крові (9 осіб – на третьому етапі власних досліджень і 23 на четвертому етапі власних досліджень). Робота із цією групою осіб здійснювалася на підставі підписаного договору про науково-медичну співпрацю. Особам контрольної групи проводили імунологічне дослідження сироватки крові. Ретельний огляд, детальне опитування, загальні лабораторні дослідження (загальний та біохімічний аналізи крові) та додаткові лабораторні тести надали можливість виявити відсутність у осіб контрольної групи хронічної патології, а також наявність захворювань протягом останніх шести місяців.

2.2. Методи дослідження

Для вивчення клінічних особливостей перебігу РС при коморбідних захворюваннях пацієнтам проводилось комплексне клініко-неврологічне та імунологічне дослідження сироватки крові та церебро-спінальної рідини. Методика обстеження передбачала отримання від досліджуваних добровільної письмової інформованої згоди. Усі обстеження виконували за єдиною схемою з використанням стандартизованих карт пацієнтів, інформацію з яких вводили в комп'ютеризовану базу даних.

2.2.1. Клініко-неврологічні методи дослідження

Аналіз неврологічного симптомокомплексу у пацієнтів із розсіяним склерозом проводився з урахуванням клініко-інструментального обстеження, детальної характеристики скарг, даних соматичного й неврологічного статусу. Для встановлення діагнозу РС користувалися переглянутими критеріями McDonald et al. 2017 року [165].

Був проведений детальний неврологічний та соматичний огляд пацієнтів з оцінкою ступеня інвалідизації за допомогою розширеної шкали ступеня

інвалідизації EDSS, яка дає уявлення про ступінь інвалідизації та тяжкість проявів хвороби, вираженої в балах від 0 (норма) до 10 (смерть) та шкали ураження функціональних систем за J. Kurtzke [166]. Остання містить 7 розділів для оцінки:

1) зорових функцій; 2) функцій стовбура мозку та черепно-мозкових нервів (ЧМН); 3) пірамідних функцій; 4) мозочкових функцій; 5) функцій чутливості; 6) функцій кишечника і сечового міхура; 7) церебральних (психічних) функцій.

Згідно з оцінкою за шкалою EDSS виділяли три ступені тяжкості захворювання: легкому ступеню хвороби відповідали 0-3 бали за шкалою EDSS, середньому ступеню – 3,5-5,5 балів, а тяжкому – 6-9,5 балів цієї шкали.

Оцінка неврологічного статусу проводилася за стандартною методикою з визначенням вищих мозкових функцій, функцій ЧМН, дослідження рухової сфери (активні, пасивні рухи, сила м'язів верхніх та нижніх кінцівок, оцінка вираженості спастичності, фізіологічні та патологічні рефлекси), поряд із цим здійснювалось обстеження чутливої сфери (визначення больової, тактильної, м'язово-суглобової, температурної чутливості; визначення вібраційної чутливості за допомогою камертону з частотою 128 Гц (С); визначення двомірно-просторової чутливості та стереогнозу), а також функцій статичної та координації рухів.

Усі пацієнти мали ремітуючо-рецидивуючий перебіг або знаходилися на стадії клінічно-ізолюваного синдрому (KIC). Відслідковували частоту клінічно зафіксованих загострень РС за рік у разі ремітуючого перебігу за попередній період і за період дослідження.

Активність розсіяного склерозу визначали при клінічній наявності рецидивів і/або МРТ активності (вогнища, що накопичували контраст (гадоліній); нові чи зростаючі T2 вогнища, що оцінювалися не менше одного разу на рік) [167].

2.2.2. Імунологічні лабораторні методи дослідження

Визначення загального вмісту імуноглобулінів IgG у зразках сироваток крові людини та ЦСР.

Для визначення вмісту імуноглобулінів IgG загальних та асоційованих імунних комплексів IgG-IgM у сироватці, у 96-лунковий імунологічний планшет (Nunc, Maxisorp) вносили по 50 мкл F(ab')₂ фрагментів антитіл до імуноглобуліну IgG (H+L) людини із концентрацією 2 мкг/мл у 0,1 М карбонатному/бікарбонатному буфері, рН 9,6, антитіла в активуючому буфері сорбувались на поверхні імунологічного планшету. Планшети інкубували 12 год при 4°C. Відмивали три рази забуференим фізіологічним розчином з 0,1% детергенту Tween 20. Вільні сайти зв'язування блокували 4 %-им бичачого сироваткового альбуміну у забуференому фізіологічному розчині з 0,1% детергенту Tween 20 по 100 мкл/лунку протягом 2 год при 37 °C. Відмивали три рази забуференим фізіологічним розчином з 0,1% детергенту Tween 20 та додавали розчин сироватки (1:1 000) в цьому ж буфері. Інкубували 1 год при кімнатній температурі. Промивали тричі забуференим фізіологічним розчином з 0,1% детергенту Tween 20 та додавали антитіла (1:15 000) проти IgG людини, кон'юговані із пероксидазою. Інкубували 1 год при кімнатній температурі, промивали тричі забуференим фізіологічним розчином з 0,1% детергенту Tween 20 та вносили по 50 мкл хромогенної речовини тетраметилбензидину, яка окиснювалась пероксидазою до забарвленого продукту, інкубували у темноті впродовж 10-15 хв до появи кольору (порівнювали із стандартом) після чого додаванням 50 мкл 10 %-ої сульфатної кислоти зупиняли дію ензиму та вимірювали поглинання світла при 450 нм, використовуючи мікропланшетний аналізатор PerkinElmer HTS 7000.

Визначення загального вмісту імунних комплексів імуноглобулінів IgG-IgM у зразках сироваток крові людини та ЦСР.

Для визначення вмісту імуноглобулінів IgG загальних та асоційованих імунних комплексів IgG-IgM у сироватці, у 96-лунковий імунологічний планшет (Nunc, Maxisorp) вносили по 50 мкл F(ab')₂ фрагментів атитіл до імуноглобуліну IgG (H+L) людини із концентрацією 2 мкг/мл у 0,1 М карбонатному/бікарбонатному буфері, рН 9,6, антитіла в активуючому буфері сорбувались на поверхні імунологічного планшету. Планшети інкубували 12 год при 4°C. Відмивали три рази забуференим фізіологічним розчином з 0,1%

детергенту Tween 20. Вільні сайти зв'язування блокували 4 %-им бичачого сироваткового альбуміну у забуференому фізіологічному розчині з 0,1% детергенту Tween 20 по 100 мкл/лунку протягом 2 год при 37 °С. Відмивали три рази забуференим фізіологічним розчином з 0,1% детергенту Tween 20 та додавали розчин сироватки (1:1 000) в цьому ж буфері, або розчин ЦСР (1:10) в цьому буфері. Дані розведення за попереднім аналізом забезпечували надлишкове насичення сайтів зв'язування імуноглобулінів. Інкубували 1 год при кімнатній температурі. Промивали тричі забуференим фізіологічним розчином з 0,1% детергенту Tween 20 та додавали антитіла (1: 5 000) проти імуноглобулінів IgM кон'юговані із пероксидазою (таким чином з планшетом зв'язувались імунні комплекси, розпізнані анти-IgG антитілами, а самі комплекси оцінювали за кількістю анти-IgM мішеней зв'язування). Зразки інкубували 1 год при кімнатній температурі, промивали тричі забуференим фізіологічним розчином з 0,1% детергенту Tween 20 та додавали по 50 мкл хромогенної речовини тетраметилбензидину, яка окиснювалась пероксидазою до забарвленого продукту, інкубували у темноті впродовж 10-15 хв до появи кольору (порівнювали із стандартом) після чого додаванням 50 мкл 10 %-ої сульфатної кислоти зупиняли дію ензиму та вимірювали поглинання світла при 450 нм, використовуючи мікропланшетний аналізатор PerkinElmer HTS 7000.

Лектин-імуноферментний аналіз для визначення глікозилювання імуноглобулінів.

Аналіз здійснювали згідно із запатентованим методом [168]. Для визначення змін глікозилювання імуноглобулінів IgG сироватки, у 96-лунковий імунологічний планшет (Nunc, Maxisorp) вносили по 50 мкл F(ab')₂ фрагментів атитіл до імуноглобуліну IgG (H+L) людини із концентрацією 2 мкг/мл в 0,1 М карбонатному/бікарбонатному буфері, рН 9,6, антитіла в активуючому буфері сорбувались на поверхні імунологічного планшету. Планшети інкубували 12 год при 4°С. Відмивали три рази трисольовим буфером (ТСБ) з 0,05% детергенту Tween 20, який містив 1mM CaCl₂, MgCl₂ (далі - ТСБ-Т-Са) (дані іони необхідні для зв'язування лектинами їх мішеней). Вільні сайти зв'язування блокували 3 %-им деглікозильованим желатином у ТСБ-Т-Са по 100 мкл/лунку протягом 2 год

при 37 °C. Тричі промивали ТСБ-Т-Са, та вносили розчин сироватки (1:1 000) в цьому ж буфері, або розчин ЦСР (1:10) в цьому буфері. Дані розведення за попереднім аналізом забезпечували надлишкове насичення сайтів зв'язування імуноглобулінів. Інкубували 1 год при кімнатній температурі. Відмивали три рази ТСБ-Т / 0,1 М CaCl₂, MgCl₂, та додавали біотинільовані лектини (LCA, AAL, PSqL та SNA) у концентрації 50-100 нг/мл. Інкубували 1 год при кімнатній температурі. Тричі промивали ТСБ-Т-Са, вносили розчин стрептавідин-пероксидази (1:10 000) та інкубували 1 год при кімнатній температурі. Тричі промивали ТСБ-Т-Са та додавали по 50 мкл хромогенної речовини тетраметилбензидину, яка окиснювалась пероксидазою до забарвленого продукту, інкубували у темноті впродовж 10-15 хв до появи кольору (порівнювали із стандартом) після чого додаванням 50 мкл 10 %-ої сульфатної кислоти зупиняли дію ензиму та вимірювали поглинання світла при 450 нм, використовуючи мікропланшетний аналізатор PerkinElmer HTS 7000.

Визначення гліканів методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції.

Визначення гліканів методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції здійснювалось в лабораторії проф. Гутмана, Дослідний центр молекулярної медицини, Лабораторії біорозділення Горвац, Факультет медицини, Університет Дебрецену, Угорщина. Для цього із зразків сироватки за допомогою носія білок-А (рекомбінантний білок стафілококу, що розпізнає імуноглобуліни IgG) виділялись антитіла, глікан ензиматично від'єднувався білком PNGазою F та флуоресцентно мітився амінопірен-трисульфонієвою кислотою, очищався і аналізувався методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції на приладі Beckman PA800 Plus Pharmaceutical Analysis System. Дані дослідження здійснені відповідно до опублікованої методики [169] в рамках наукової співпраці.

Афінна очистка препаратів імуноглобулінів IgG.

Очищення імуноглобуліну IgG із сироватки та спинномозкової рідини здійснювали використовуючи рекомбінантний білок-G агарозу. Колонку (спін-колонку, в якій протік здійснюється шляхом центрифугування), що містила 100

мкл білка-G агарози, промивали і врівноважували 10 об'ємами буфера зв'язування (150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5). Зразок розводили 1/1 зв'язуючим буфером, обережно наносили на колонки (400 мкл) і витримували 30 хв при кімнатній температурі. Усі промивання / елюції проводили центрифугуванням при 3000 об / хв. Промиті фракції збирали і колонку промивали 2 мл ТСБ в 10 етапів. IgG елюювали 0,1 М гліцин-HCl, pH 2,7, негайно нейтралізували 1 М Трис-HCl, pH 9,0. Концентрацію білка вимірювали спектрофотометром Jasco (Jasco, Японія).

Мас-спектрометричний аналіз.

Мас-спектрометричний аналіз Fc-глікозилювання отриманих фракцій здійснювали методом LC-ESI-MS (рідинна хроматографія-електросперій іонізація-мас спектрометрична детекція) в Центрі протеоміки та метаболоміки Медичного центру Університету м. Ляйлен, Ляйден, Нідерланди в рамках наукової співпраці. Для цього для аналізу Fc-глікозилювання елюати IgG, виділені на афінних колонках, піддавали триптичному розщепленню, додаючи 600 нг трипсину, обробленого тозил-фенілаланіл-хлорометилкетонм (Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина) в 40 мкл буфер гідрокарбонату амонію з наступною інкубацією протягом ночі при 37°C. Розщеплені фрагменти IgG відокремлювали та аналізували хроматографічно на Ultimate 3000 UHPLC (Dionex Corporation), у поєднанні з детекторами Maxis Impact HD квадрупольний мас-спектрометр-час польоту (мс) (Bruker Daltonics, Бремен, Німеччина), як описано раніше з незначними модифікаціями [170].

Кон'югація антитіл із магнітними наночастинками.

Основний білок мієліну (ОБМ) (Sigma-Aldrich, США) кон'югували із суперпарамагнітними мікрочастинками BioMagPlus (МЧ) (Polysciences, Inc, США). Процедура виконували відповідно до оригінального протоколу виробника [171]. Коротко, 1 мл (10 мг) суспензії МЧ переносили у 15 мл конічну пробірку. За допомогою магніту МЧ осаджували та відбирали супернатант. Для промивання МЧ, до отриманого осаду додавали 10 мл 0,05 М МЕС (2-(N-морфоліно)етансульфанова кислота) буферу, pH 5,2, і перемішували. МЧ осаджували за допомогою магніту і повторювали процедуру 2 рази. Після

останнього промивання, МЧ розсуспендовували у 10 мл 0,05 М МЕС буфера. До отриманої суспензії додавали 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімід (ЕДАК) (1,6 мг ЕДАК/мг МЧ) та інтенсивно перемішували. Інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Магнітно осаджували активовані МЧ та відбирали супернатант. Повторювали промивання МЧ 4 рази. 2 мг ОБМ розчиняли у 5 мл 0,05 М МЕС буферу та додавали до активованих МЧ. Інкубували 16 год при кімнатній температурі. Після цього, МЧ осаджували за допомогою магніту, відбирали супернатант та додавали 10 мл 0,05 М МЕС буферу. Процедуру повторювали ще раз. Для зупинки реакції кон'югації, додавали 10 мл 1 М розчину гліцину, рН 8. Перемішували та інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Кон'юговані із ОБМ МЧ (МЧ-ОБМ) осаджували, супернатант відбирали. Додавали 2 мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР), розмішували та осаджували. Супернатант відбирали. Процедуру повторювали 3 рази. Після останнього промивання, МЧ-ОБМ розсуспендовували у 2 мл ЗФР та зберігали при +4 °С.

Виділення специфічних аутоантитіл до основного білка мієліну.

50 мкл отриманої суспензії МЧ-ОБМ осаджували за допомогою магніту та розсуспендовували у 990 мкл 1 X трис-сольового буфера (ТСБ). До отриманої суспензії МЧ-ОБМ додавали 10 мкл досліджуваної сироватки та інкубували 1 год при кімнатній температурі. МЧ-ОБМ разом із зв'язаними антитілами (МЧ-ОБМ-АТ) осаджували за допомогою магніту та промивали 3 рази ТСБ. Після останнього осадження, МЧ-ОБМ-АТ розсуспендовували в 200 мкл 0,1 М гліцин-НСІ, рН 2,6 та інкубували 20 хв при кімнатній температурі. МЧ-ОБМ осаджували за допомогою магніту, а супернатант, який містив відділені антитіла (специфічні до ОБМ), переносили в чисту пробірку із 10 мкл 1 М Трис-НСІ рН 8,8.

2.2.3. Статистична обробка отриманих результатів

Первинні дані, що були отримані у ході виконання наукової роботи, опрацьовували з використанням програм Microsoft Excel, AtteStat, SPSS та Statistica. На основі первинних даних було сформовано варіаційні ряди, які перевіряли на нормальність розподілу, використовуючи критерій Шапіро-

Франсія. Оскільки даний критерій показав нормальний (гаусівський) характер розподілу даних, то для опису кожного варіаційного ряду було використано середню арифметичну та її стандартну похибку ($\bar{X} \pm m$).

Для визначення частоти аналізованих показників (наприклад, частка пацієнтів з ремітуючо рецидивуючим типом перебігу РС) нами було проведено розрахунок інтенсивних показників та їх похибок ($P \pm m$).

Відтак, при проведенні статистичної обробки отриманих даних було застосовано наступні методи: розрахунок відносних величин, аналіз варіаційних рядів, проведення оцінки вірогідності отриманих результатів у групах, які порівнювалися, розрахунок показників динаміки (темпу росту), проведення кореляційного аналізу. При аналізі середніх величин для проведення оцінки вірогідності різниці отриманих результатів у групах, які порівнювалися, використовували критерій Стюдента, а при малих кількостях обстежених у групах додатково здійснювали перевірку за допомогою критеріїв Манна-Уїтні та Вілкоксона. У випадку порівняння відносних величин розраховували критерії Стюдента та Фішера. З метою встановлення взаємозв'язку поміж отриманими даними переважно використовували критерій кореляції Пірсона. У випадках, коли первинні дані були представлені у напівкількісному вигляді, для розрахунків застосовували ранговий коефіцієнт кореляції Спірмена. Всі тести з використанням імуноферментного аналізу проводили у дублікатах, використовуючи 2 технічні копії для кожного аналізу, дані нормалізували між планшетами та корегували відповідно на фоновий сигнал вторинних антитіл, потім розраховували середні значення, яке представлено на графіках. 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 для парних зразків (Wilcoxon matched pairs test). Для кожного з параметрів визначали рівень достовірності, використовували 4 градації рівнів достовірності: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$, дані вважали достовірними якщо $p < 0,05$. Для отриманих даних визначали середні значення та стандартну похибку середнього ($M \pm m$), які вказані на рисунках і в таблицях, якщо не зазначено інше.

Висновки до розділу 2

У другому розділі власних досліджень показано, що дисертаційна робота виконана на достатньому клінічному матеріалі з використанням сучасних методик і методів, як клінічних так і імунобіологічних. Для формування висновків була використана достатня кількість (141) хворих на РС. На першому етапі - 77 пацієнтів, у яких було поєднання розсіяного склерозу та коморбідної патології. На другому етапі - 20 зразків сироватки крові хворих на розсіяний склероз, з них - 12 зразків ліквору пацієнтів із РС. На третьому етапі із 12-ти хворих описаних на другому етапі було відібрано та проаналізовано 7 пар зразків сироваток крові і цереброспінальної рідини. На четвертому етапі - 44 пацієнти із загальної групи.

Діагноз у всіх пацієнтів був підтверджений згідно критеріїв МакДональда 2010 року. Усі обстежені мали ремітуючо – рецидивуючий тип перебігу або перебували на стадії клінічно-ізолюваного синдрому РС (KIC) .

Коморбідні захворювання були підтверджені документально витягами із амбулаторних карт пацієнтів чи консультативних заключень суміжних спеціалістів. При аналізі поширеності класів коморбідних захворювань за МКХ-10 у хворих на РС найбільший рівень захворюваності становили хвороби органів травлення. При вивченні поширеності коморбідних захворювань у хворих на розсіяний склероз остеохондроз діагностували статистично значущо частіше, ніж решту коморбідних нозологій. При наявності коморбідних захворювань при РС, в одного пацієнта в середньому діагностувалось $1,73 \pm 0,14$ випадків супутніх захворювань.

Використовували відповідні методики імуноферментних аналізів: визначення загального вмісту імуноглобулінів IgG у зразках сироваток крові та ліквору, визначення загального вмісту імунних комплексів імуноглобулінів IgG-IgM у зразках сироваток крові та церебро-спінальної рідини, лектин-імуноферментний аналіз для визначення глікозилювання імуноглобулінів, визначення гліканів методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції, афінна очистка препаратів імуноглобулінів IgG, мас-спектрометричний аналіз, кон'югація антитіл із магнітними наноносіями, виділення специфічних аутоантитіл до основного білка мієліну.

Запропоновано модифікацію методу лектин-імуноферментного аналізу, де рівномірність аналізу імуноглобулінів забезпечувалася шляхом насичення антитіл-«уловлювачів» молекул імуноглобулінів IgG, що внесло нові уявлення про патогенетичні механізми розвитку РС.

Використали адекватні методи статистичного аналізу, зокрема критерій Стьюдента, Манна-Уїтні, Вілкоксона та Фішера які дали змогу зробити коректні висновки, представлені у нашому науковому дослідженні.

Ці методики дали змогу провести клініко-імунологічні кореляції, виділити вагомі закономірності та запропонувати для практичного застосування нові біомаркери, розкрити нові патогенетичні механізми розвитку РС.

РОЗДІЛ 3

КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСТЕЖЕНИХ ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ З КОМОРБІДНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ В АНАМНЕЗІ

Провели аналіз анамнестичних даних 77-ми хворих пацієнтів із розсіяним склерозом. Було проведено порівняння показників між групами та визначення кореляційного зв'язку між середнім балом за шкалою інвалідизації EDSS та віком пацієнтів на момент виникнення коморбідного захворювання.

Виявили 16 класів коморбідних захворювань згідно з Міжнародною класифікацією хвороб 10-го перегляду (МКХ-10) табл. 3.1.

Таблиця 3.1 – Поширеність класів коморбідних захворювань за МКХ-10 у хворих на РС (кількість випадків на 100 осіб)

№ п/п	Клас за МКХ-10	Поши- реність	порівняно з групою (K00-K93)		порівняно з групою (M00- M99)		порівняно з групою (J00-J99)	
			t	P	t	p	t	p
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Захворювання органів травлення (K00-K93)	32,47 ± 5,34	-	-	0,35	>0,05	0,89	>0,05
2	Хвороби сполучної тканини та кістково- м'язової системи (M00-M99)	29,87 ± 5,22	0,35	>0,05	-	-	0,54	>0,05
3	Захворювання органів дихання (J00- J99)	25,97 ± 5,00	0,89	>0,05	0,54	>0,05	-	-
4	Розлади харчування і порушення обміну речовин, захворювання ендокринної системи, (E00-E90)	18,18 ± 4,40	2,07	<0,05	1,71	>0,05	1,17	>0,05

1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	Захворювання системи кровообігу (I00-I99)	14,29 ± 3,99	2,50	<0,05	2,15	<0,05	1,60	>0,05
6	Захворювання сечостатевої системи (N00-N99)	14,29 ± 3,99	2,50	<0,05	2,15	<0,05	1,60	>0,05
7	Новоутвори (C00-D48)	11,69 ± 3,66	3,21	<0,01	2,85	<0,01	2,30	<0,05
8	Хвороби нервової системи (G00-G99)	9,09 ± 3,28	3,73	<0,01	3,37	<0,01	2,82	<0,01
9	Хвороби вуха і соскоподібного відростка (H60-H95)	5,19 ± 2,53	4,62	<0,01	4,25	<0,01	3,71	<0,01
10	Вроджені аномалії (вади розвитку), деформації та хромосомні порушення (Q00-Q99)	2,60 ± 1,81	5,30	<0,01	4,94	<0,01	4,39	<0,01
11	Отруєння, травми та деякі інші наслідки впливу зовнішніх причин (S00-T98)	2,60 ± 1,81	5,30	<0,01	4,94	<0,01	4,39	<0,01
12	Деякі інфекційні і паразитарні хвороби (A00-B99)	1,30 ± 1,29	5,67	<0,01	5,31	<0,01	4,78	<0,01
13	Хвороби кровотворних органів і крові та окремі порушення з залученням імунного механізму (D50-D89)	1,30 ± 1,29	5,67	<0,01	5,31	<0,01	4,78	<0,01
14	Психічні розлади і розлади поведінки (F00-F99)	1,30 ± 1,29	5,67	<0,01	5,31	<0,01	4,78	<0,01
15	Хвороби ока та його придаткового апарату (H00-H59)	1,30 ± 1,29	5,67	<0,01	5,31	<0,01	4,78	<0,01
16	Хвороби шкіри і підшкірної клітковини (L00-L99)	1,30 ± 1,29	5,67	<0,01	5,31	<0,01	4,78	<0,01

У пацієнтів було діагностовано 133 коморбідних нозологій, тобто в середньому в одного хворого – $1,73 \pm 0,14$ супутнього захворювання.

За середньою тривалістю РС та коморбідної патології, середнім балом за шкалою EDSS та середньою кількістю випадків коморбідних захворювань в одного хворого статистично значущих гендерних відмінностей не встановлено.

Встановлено найвищий рівень захворюваності на хвороби органів травлення (K00-K93). Цей показник статистично значущо ($p < 0,05$) був вищим порівняно з поширеністю інших класів хвороб, окрім захворювань органів дихання та хвороб кістково-м'язової системи.

Друге місце за поширеністю зайняли хвороби сполучної тканини та кістково-м'язової системи. Поширеність хвороб цього класу не відрізнялася від поширеності патології органів дихання та хвороб ендокринної системи, але вона була статистично значущо ($p < 0,05$) більшою порівняно із цим показником для інших аналізованих класів хвороб.

Захворювання органів дихання посідали третє місце. Їх поширеність була статистично значущо ($p < 0,05$) більшою порівняно з більшістю аналізованих класів хвороб, за винятком зазначених вище, а також хвороб системи кровообігу та сечостатевої системи.

Найнижчі ($p < 0,05$) рівні захворюваності виявлено для п'яти класів хвороб: інфекційні й паразитарні захворювання, хвороби кровотворних органів та крові і окремі порушення із залученням імунного механізму, психічні розлади і розлади поведінки, захворювання ока і його придаткового апарату, хвороби шкіри і підшкірної клітковини.

Поширення хвороб кістково-м'язової системи та сполучної тканини статистично значущо ($p < 0,01$) частіше зустрічалися у жінок, тоді як новоутворення виявлено лише у жінок (рис. 3.1).

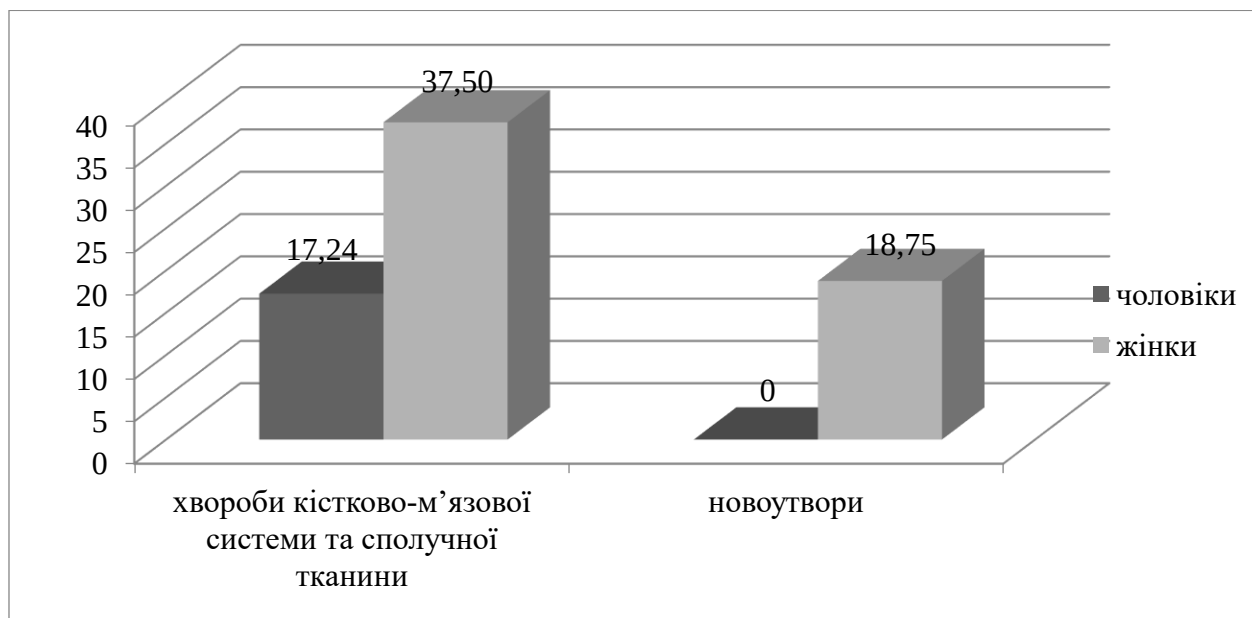


Рисунок 3.1 – Поширеність хвороб сполучної тканини та кістково-м'язової системи і новоутворів у хворих на РС чоловіків та жінок (випадки на 100 осіб відповідної статі).

Проведено аналіз структури класів коморбідних захворювань відповідно до МКХ-10 (рис.3.2).



Рисунок 3.2 – Структура коморбідної патології за класами у загальній групі хворих на РС

Найчастіше у хворих на РС реєстрували захворювання органів травлення (25 випадків).

Цей показник статистично значущо ($p < 0,05$) перевищував показники інших класів хвороб, окрім хвороб сполучної тканини та кістково-м'язової системи, ендокринної системи та органів дихання.

Хвороби сполучної тканини та кістково-м'язової системи виявлено у 23 випадках, що було статистично значущо ($p < 0,05$) більшим порівняно з показниками інших класів хвороб, окрім хвороб органів травлення, дихання та ендокринної системи.

Захворювання органів дихання діагностували у 20 випадках. Цей показник був статистично значущо ($p < 0,05$) вищим порівняно з показниками інших класів хвороб, окрім вище зазначених патологій, а також хвороб ендокринної системи, системи кровообігу та сечостатевої системи.

Рідко у загальній групі обстежених хворих на розсіяний склероз виявляли інфекційні хвороби, психічні розлади, хвороби крові, ока та його придаткового апарату, шкіри і підшкірної клітковини — по 1 випадку.

Проаналізовано поширення класів захворювань у чоловіків та жінок. (рис.3.3).



Рисунок 3.3 – Структура коморбідної патології за класами у хворих на РС чоловіків

У чоловіків (рис. 3.3) найчастіше спостерігали захворювання органів травлення. Цей показник статистично значущо ($p < 0,05$) був вищим порівняно з показниками інших класів хвороб, за винятком захворювань органів дихання, кістково-м'язової системи та сполучної тканини, сечостатевої системи, нервової та ендокринної системи.

Поширення захворювань органів дихання у чоловіків було статистично значущо ($p < 0,05$) більшим порівняно з поширенням інфекційних хвороб, хвороб ока і хвороб вуха та соскоподібного відростка

Найменше поміж хворих на розсіяний склероз чоловіків відмічали інфекційні захворювання, хвороби ока та його придаткового апарату, вуха і соскоподібного відростка.

У чоловіків із розсіяним склерозом не було виявлено новоутворень, хвороб крові, психічних розладів, хвороб шкіри і підшкірної клітковини та вроджених аномалій (вад розвитку).

У жінок хворих на розсіяний склероз частіше виявляли хвороби кістково-м'язової системи та сполучної тканини. Частка захворювань цього класу була статистично значущо ($p < 0,05$) більшою порівняно з показниками захворювань інших класів, окрім хвороб органів травлення, органів дихання, ендокринної системи, системи кровообігу та новоутворень (рис. 3.4).



Рисунок 3.4 – Структура коморбідної патології за класами у хворих на РС жінок

Частка захворювань органів травлення була статистично значущо ($p < 0,05$) вищою порівняно з показниками захворювань інших класів, окрім хвороб сполучної тканини та кістково-м'язової системи, органів дихання, ендокринної системи, системи кровообігу та новоутворень.

Поширення захворювань органів дихання було статистично значущо ($p < 0,05$) більшим порівняно з показниками захворювань вуха і соскоподібного відростка, нервової системи, вроджених аномалій, психічних розладів, хвороб крові та шкіри.

Найрідше у жінок із розсіяним склерозом виявляли хвороби крові, психічні розлади та хвороби шкіри і підшкірної клітковини. Жодного випадку інфекційних хвороб, хвороб ока та його придаткового апарату, травм не виявлено.

У оглянутих нами хворих на РС було діагностовано 61 вид нозологій: 26 у чоловіків та 48 у жінок. Проведено аналіз нозологій, які поєднувалися з РС (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Поширеність коморбідних захворювань у хворих на розсіяний склероз (кількість випадків на 100 осіб)

№ п/п	Нозологія	Код за МКХ- 10	Поширеність (випадків на 100 осіб)	Порівняно з остеохонд- розом		Порівняно з гастро- дуоденітом	
				t	p	t	P
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Остеохондроз	M42	15,58±4,13	-	-	0,70	>0,05
2	Гастродуоденіт	K29.9	11,69±3,66	0,70	>0,05	-	-
3	Киста гайморової пазухи	J34.1	9,09±3,28	1,23	>0,05	0,53	>0,05
4	Лейоміома матки	D25	9,09±3,28	1,23	>0,05	0,53	>0,05
5	Гастрит	K29	7,79±3,05	1,52	>0,05	0,82	>0,05
6	Гіпертонічна хвороба	I10	7,79±3,05	1,52	>0,05	0,82	>0,05
7	Протрузії міжхребцевих дисків	M51	7,79±3,05	1,52	>0,05	0,82	>0,05
8	Хронічний гайморит	J32	6,49±2,81	1,82	>0,05	1,13	>0,05

Закінчення табл. 3.2

1	2	3	4	5	6	7	8
9	Вузловий зоб	E01.1	6,49±2,81	1,82	>0,05	1,13	>0,05
10	Міжхребцеві кили	M51	3,90±2,21	2,49	<0,05	1,82	>0,05
11	Холецистит	K81	3,90±2,21	2,49	<0,05	1,82	>0,05
12	Сечокам'яна хвороба	N20	3,90±2,21	2,49	<0,05	1,82	>0,05
13	Аутоімунний тиреоїдит	E06.3	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
14	Синдром полікістозу яєчників	E28.2	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
15	Епілепсія	G40	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
16	Внутрішньочерепна гіпертензія	G93.2	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
17	Тубоотит	H66	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
18	Варикозне розширення вен нижніх кінцівок	I83	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
19	Хронічний фарингіт	J31	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
20	Хронічний тонзиліт	J35.0	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
21	Гастроезофагеальна рефлюксна хвороба	K21	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
22	Жовчнокам'яна хвороба	K80	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
23	Хронічний простатит	N41.1	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05
24	Киста яєчника	N83.2	2,60±1,81	2,88	<0,01	2,23	<0,05

У табл. 3.2, наведено дані щодо 24 найчастіших нозологій, решту діагностували значно рідше.

Остеохондроз діагностували статистично значущо ($p < 0,05$) частіше, ніж решту коморбідних нозологій. Друге місце за поширеністю посідав гастродуоденіт. Кісти гайморової пазухи та лейоміому матки виявляли з однаковою частотою ($p < 0,05$). Статистично значущих гендерних відмінностей щодо рівня захворюваності не виявлено.

До онкологічних захворювань відносили нозології з класу новоутворень (C00-D48) та окремі захворювання, що належали до інших класів, проте мали в основі доброякісний або злоякісний ріст. Діагностовано 34 (25,56 % від усіх коморбідних захворювань ($n = 133$)) онкологічних захворювання з поширеністю у середньому 44,16 випадку на 100 пацієнтів. У жінок виявлено 25 випадків ($p < 0,01$), у чоловіків – 9.

З онкологічних захворювань у чоловіків найчастіше діагностували кісту гайморової пазухи, а вузловий зоб, кісту верхньої щелепи, сфеноїдального синуса та аденогіпофізу – з однаковою частотою, але статистично значущої різниці щодо поширеності цих нозологічних одиниць не виявлено.

У жінок із РС частіше виявляли лейоміому матки, ніж інші нозологічні одиниці (кіста нирки, ліпома нирки, доброякісна дисплазія молочної залози, фіброаденоматоз молочних залоз, вузол щитоподібної залози, гліобластома правої тім'яно-скроневої ділянки, кіста епіфізу та кишені Ратке). Дещо рідше діагностували вузловий зоб. Киста яєчника, синдром полікістозу яєчників та кіста гайморової пазухи траплялися з однаковою частотою. Ще вісім патологій мали поширеність 2,08 випадку на 100 жінок: кіста нирки, ліпома нирки, доброякісна дисплазія молочної залози (фіброзно-кістозна мастопатія), фіброаденоматоз молочних залоз, вузол щитоподібної залози, гліобластома правої тім'яно-скроневої ділянки, кіста епіфізу та кишені Ратке. Інших статистично значущих відмінностей у рівнях захворюваності не виявлено.

Переважну більшість ($t=4,72$; $p<0,01$) випадків виникнення коморбідного захворювання ($63,91\pm4,16\%$) було відмічено після дебюту розсіяного склерозу, у той час, як до виникнення РС – $36,09\pm4,16\%$ випадків.

Для вивчення впливу коморбідних захворювань на перебіг РС нами було порівняно групи пацієнтів, у яких супутня патологія виникла до та відповідно після дебюту РС (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Порівняльна характеристика пацієнтів з коморбідною патологією, що виникла до та після дебюту РС

№ п/п	Ознака	Поява коморбідного захворювання		t-критерій	Р
		до дебюту РС (n=48)	після дебюту РС (n=85)		
	Чоловіки, % Жінки, %	31,25±6,69 68,75±6,69	36,47±5,22 63,53±5,22	0,62 0,62	>0,05 >0,05
2.	Вік:				
	18-32 роки, %	35,42±6,90	38,82±5,29	0,39	>0,05
	33-47 років, %	25,00±6,25	34,12±5,14	1,13	>0,05
	48-55 років, %	37,50±6,99	23,53±4,60	1,67	>0,05
	>56 років, %	2,08±2,06	3,53±2,00	0,50	>0,05
3.	Вік на момент дебюту РС, роки	32,85±1,81	27,18±1,17	2,63	<0,05
4.	Вік на момент виникнення коморбідного захворювання, роки	28,10±1,87	32,91±1,25	2,14	<0,05
5.	Інтервал між дебютом РС та появою супутнього захворювання, роки	5,60±1,14	5,87±0,58	0,21	>0,05
6.	Тривалість РС, роки	7,33±0,91	10,99±0,59	3,37	<0,01
7.	Тривалість коморбідного захворювання, роки	12,10±1,45	5,23±0,35	4,61	<0,01
8.	Сума балів за шкалою EDSS:				
	чоловіки	2,96±0,19	3,49±0,14	2,25	<0,05
	жінки	2,55±0,31	3,19±0,21	1,71	>0,05
		3,02±0,22	3,65±0,18	2,22	<0,05

Встановили достовірні відмінності між віком на момент дебюту розсіяного склерозу ($t = 2,63$; $p < 0,05$), віком на період виникнення коморбідної патології ($t = 2,14$; $p < 0,05$), тривалістю розсіяного склерозу ($t = 3,37$; $p < 0,01$), тривалістю супутньої патології ($t = 4,61$; $p < 0,01$) поміж пацієнтами, у яких коморбідне захворювання виникло до дебюту РС та пацієнтами, у яких супутня патологія

була констатована через деякий час після появи перших ознак цього захворювання. На нашу думку, виявлені зміни зумовлені, передовсім, поділом на аналізовані підгрупи, оскільки природно, що у випадку появи супутнього захворювання до розсіяного склерозу, його перебіг буде тривалішим у порівнянні з терміном патології, яка виникла після перших проявів розсіяного склерозу. Одночасно, якщо розсіяний склероз виникав у старшому віці, то виникає велика ймовірність, що у пацієнта буде більше супутніх захворювань до появи РС, ніж після.

Зате, привокуює увагу достовірна різниця між показниками інвалідизації за шкалою EDSS між цими двома групами пацієнтів. Так, у пацієнтів, у яких супутня патологія виникла після дебюту РС, середній бал за шкалою інвалідизації EDSS є вищим на 17,9% ($t = 2,25$; $p < 0,05$). У випадку виникнення коморбідної патології після діагностованого РС сума балів за шкалою EDSS є також достовірно ($t = 2,22$; $p < 0,05$) на 20,9% більшою у жінок, тоді як у чоловіків аналогічна різниця існує, проте вона недостовірна.

Було зроблено кореляційний аналіз щодо взаємозв'язку балу EDSS з іншими важливими клінічними показниками цього захворювання.

Виявили прямий зв'язок середньої сили між балом за шкалою EDSS та віком пацієнтів на момент дебюту РС ($r = 0,36$; $p < 0,05$). Що свідчить про те, чим пізніше виникало захворювання, тим важчим був клінічний стан пацієнтів, що виражалося у наростанні їх інвалідизації.

Встановили прямий зв'язок середньої сили між середнім балом інвалідизації за шкалою EDSS та віком пацієнтів на момент виникнення коморбідного захворювання ($r = 0,44$; $p < 0,05$) (рис. 3.5). Це свідчить про те, що поява супутньої патології у більш старшому віці призводить до більш значимої інвалідизації хворих на розсіяний склероз.

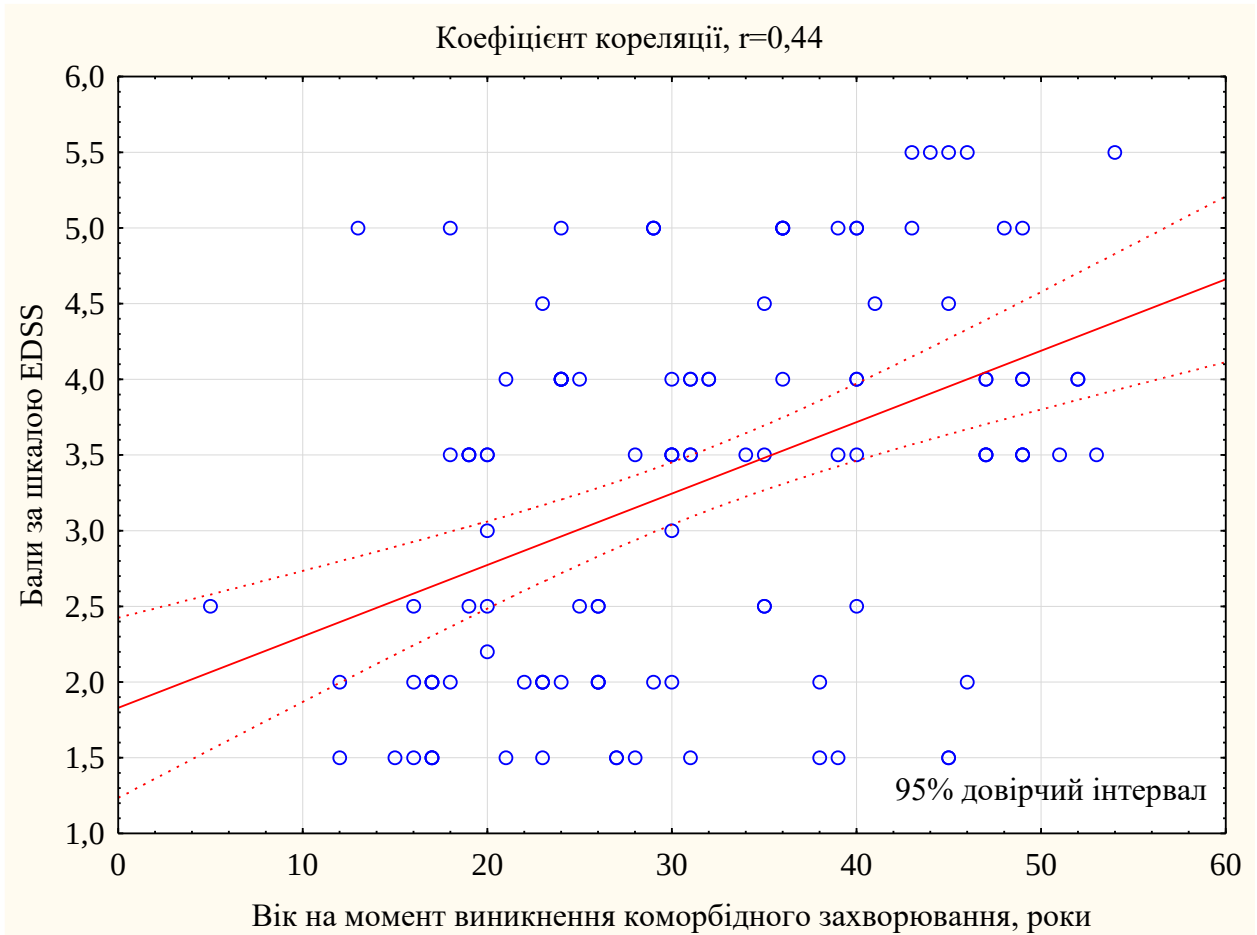


Рисунок 3.5 – Кореляційний зв'язок між середнім балом за шкалою EDSS та віком пацієнтів на момент виникнення супутньої патології

Також, було виявлено слабкий прямий кореляційний зв'язок між балом шкали EDSS та тривалістю РС ($r=0,26$; $p<0,05$), що говорить про те, що зі збільшенням тривалості перебігу розсіяного склерозу підвищується і середній бал за шкалою EDSS, а, відповідно, і ступінь інвалідизації пацієнтів.

Одержали слабкий прямий зв'язок між кількістю супутніх захворювань та оцінкою за шкалою EDSS ($r=0,26$; $p<0,05$). Отже, зростання кількості коморбідних соматичних захворювань негативно впливало на перебіг розсіяного склерозу у обстеженої групи пацієнтів.

Звернемо увагу, що інтервал між виникненням супутньої патології та дебютом розсіяного склерозу в двох групах був практично однаковим – у середньому через $5,60 \pm 1,14$ років у пацієнтів після діагностики супутньої патології констатували дебют розсіяного склерозу. Водночас, якщо спочатку діагностували РС, то супутню патологію виявляли в середньому через $5,87 \pm 0,58$

років після дебюту розсіяного склерозу.

Виявили, що до дебюту РС у оглянутих пацієнтів було діагностовано 30 нозологій, які об'єднуються переважно у сім класів (табл. 3.4). Водночас, класи захворювань з частотою один випадок в аналіз не включалися.

Таблиця 3.4 – Терміни діагностики супутніх захворювань, що виникли до дебюту РС

№ п/п	Клас	Код за МКХ-10	Інтервал до дебюту РС, роки	Порівняно з класом (E00- E90)	
				t	p
1	Захворювання системи кровообігу	(I00-I99)	1,25±0,25	2,91	<0,01
2	Захворювання органів дихання	(J00-J99)	1,88±0,64	2,71	<0,05
3	Хвороби сполучної тканини та кістково-м'язової системи	(M00-M99)	3,64±1,33	2,15	<0,05
4	Вроджені аномалії (вади розвитку), деформації та хромосомні порушення	(Q00-Q99)	5,00±3,00	1,50	>0,05
5	Захворювання органів травлення	(K00-K93)	6,25±3,01	1,23	>0,05
6	Захворювання сечостатевої системи	(N00-N99)	9,00±8,00	0,36	>0,05
7	Захворювання ендокринної системи, розлади харчування і порушення обміну речовин	(E00-E90)	12,17±3,74	-	-

Найбільший інтервал (12,17±3,74 років) між моментом виникнення супутньої патології та дебютом розсіяного склерозу був у пацієнтів із захворюваннями ендокринної системи, розладами харчування і порушенням обміну речовин та достовірно ($p<0,05$) перевищував такий термін у пацієнтів із захворюваннями системи дихання, кровообігу, сполучної тканини та кістково-м'язової системи.

Встановили, що після дебюту РС у пацієнтів було діагностовано 45 нозологій, які об'єднуються, у більшості випадків, у дев'ять класів (табл. 3.5). Водночас, класи захворювань з частотою один випадок в аналіз не включалися.

Таблиця 3.5 – Терміни діагностики коморбідних захворювань, що виникли після дебюту РС

№ п/п	Клас	Код за МКХ-10	Інтервал до виникнення коморбідного захворювання, роки	Порівняно з класом N00-N99	
				t	p
1	Хвороби сполучної тканини та кістково-м'язової системи	(M00-M99)	3,17±0,89	2,93	<0,01
2	Хвороби нервової системи	(G00-G99)	3,83±1,66	2,38	<0,05
3	Новоутвори	(C00-D48)	3,88±0,85	2,68	<0,05
4	Захворювання ендокринної системи, розлади харчування і порушення обміну речовин	(E00-E90)	5,50±0,89	2,06	<0,05
5	Хвороби вуха і соскоподібного відростка	(H60-H95)	5,67±4,18	1,09	>0,05
6	Захворювання органів травлення	(K00-K93)	5,90±1,15	1,84	>0,05
7	Захворювання органів дихання	(J00-J99)	6,08±1,13	1,78	>0,05
8	Захворювання системи кровообігу	(I00-I99)	6,75±2,49	1,20	>0,05
9	Захворювання сечостатевої системи	(N00-N99)	11,00±2,52	-	-

Як видно з табл. 3.5, найбільший інтервал до виникнення супутнього захворювання після дебюту РС відмічається у пацієнтів, яким діагностували захворювання сечостатевої системи (11,00±2,52 років), що є достовірно ($p < 0,05$) вище ніж при діагностиці хвороб сполучної тканини та кістково-м'язової системи, нервової системи, ендокринної системи, розладів харчування і порушення обміну речовин, а також новоутворів. Також встановили, що хвороби сполучної тканини та кістково-м'язової системи діагностуються після дебюту РС достовірно ($t=2,02$; $p < 0,05$) швидше порівняно з захворюваннями органів травлення.

Виявили, що після дебюту РС вузловий зоб діагностувався у чоловіків достовірно ($t=5,0$; $p<0,01$) швидше, ніж у жінок ($3,00\pm0,00$ та $8,00\pm1,00$ роки відповідно). Такий самий висновок можна зробити і щодо появи артеріальної гіпертензії. Терміни діагностики цієї нозологічної одиниці є також достовірно ($t=3,0$; $p<0,05$) коротшими після встановлення діагнозу РС у чоловіків ($5,00\pm4,00$), порівняно з жінками ($17,00\pm0,00$).

Висновки до розділу 3

Встановлено, що при наявності коморбідних захворювань при РС, в одного пацієнта в середньому діагностувалось $1,73\pm0,14$ випадків супутніх захворювань.

Переважну більшість ($t=4,72$; $p<0,01$) випадків виникнення коморбідного захворювання ($63,91\pm4,16$ %) було відзначено після дебюту РС, у той час, як до виникнення РС – $36,09\pm4,16$ % випадків. Середній вік дебюту РС становив $28,26\pm1,17$ років, а коморбідні захворювання в середньому виникали у віці $31,26\pm1,06$ років.

Загалом в аналізованих пацієнтів 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 з РС діагностували захворювання органів травлення – $18,80\pm3,39\%$, хвороби кістково-м'язової системи та сполучної тканини – $17,29\pm3,28\%$ та захворювання органів дихання – $15,04\pm3,10\%$.

Перші три рейтингові місця у поширеності коморбідної патології в пацієнтів з РС становлять: остеохондроз (M42) – $15,58\pm4,13$ випадків на 100 пацієнтів, гастродуоденіт (K29.9) – $11,69\pm3,66$ випадків на 100 пацієнтів та кисти гайморової пазухи (J34.1) – $9,09\pm3,28$ випадків на 100 пацієнтів.

Згідно до клінічної класифікації поширеність онкологічних захворювань становить $44,16\pm5,66$ випадків на 100 пацієнтів або $25,56\%$ з-поміж усіх коморбідних захворювань. З онкологічних захворювань у чоловіків найчастіше діагностувалася киста гайморової пазухи – $17,24\pm7,01$ випадків на 100 чоловіків;

а у жінок лейоміома матки – $14,58 \pm 5,09$ випадків на 100 жінок, поширеність якої є достовірно ($t=2,27$, $p<0,05$) вищою, ніж восьми інших діагностованих нозологічних одиниць.

У пацієнтів, в яких супутня патологія виникала після дебюту РС, оцінка за шкалою EDSS становить в середньому $3,49 \pm 0,14$ балів та є більшою ($t = 2,25$; $p<0,05$) на 17,9% порівняно з групою пацієнтів, в яких супутня патологія виникала до дебюту РС, де даний показник становить $2,96 \pm 0,19$ балів.

Найвищий інтервал ($12,17 \pm 3,74$ років) між моментом виникнення супутньої патології та дебютом розсіяного склерозу був у пацієнтів з захворюваннями ендокринної системи, розладів харчування і порушенням обміну речовин. Після дебюту розсіяного склерозу найдовший інтервал до виникнення супутнього захворювання відмічається у пацієнтів, яким діагностували захворювання сечостатевої системи - $11,00 \pm 2,52$ років.

Результати власних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Негрич ТІ, Гичка КМ. Аналіз коморбідних захворювань у хворих на розсіяний склероз. Український неврологічний журнал. 2017;(4):11–18. (Особистий внесок – брала участь у формулюванні мети роботи, проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).
2. Гичка КМ. Характеристика коморбідних захворювань у пацієнтів із розсіяним склерозом залежно від його дебюту. Міжнародний неврологічний журнал. 2018;2(96):63-68.

РОЗДІЛ 4

ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЗМІН ГЛІКОЗИЛЬНИХ ДЕТЕРМІНАНТ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА ЦЕРЕБРО-СПІНАЛЬНІЙ РІДИНІ ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ ЯК МАРКЕРА ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ ЦЬОМУ ЗАХВОРЮВАННІ

Патогенез розсіяного склерозу, незважаючи на значні досягнення в його вивченні, залишається до кінця не з'ясованим. Неухильне прогресування інвалідизації пацієнтів, у комплексі з недосконалим розумінням механізмів розвитку та виникнення розсіяного склерозу, складною діагностикою, лікуванням і прогнозуванням перебігу захворювання, доводять необхідність пошуку біомаркерів цього захворювання [10-13]. Мета біомаркерів полягає у тому, щоб полегшити практикуючому неврологу як саму діагностику розсіяного склерозу, так і у визначенні його окремих клінічних властивостей, а також у прогнозуванні подальшого розвитку хвороби і оцінці ефективності проведеного лікування [10-12].

Протягом останнього часу виявлено багато потенційних біомаркерів при розсіяному склерозі, проте лише декотрі з них мають підтверджену діагностично-прогностичну цінність [11, 12]. Більшість із них є маркерами загального запалення, тобто не є специфічними для РС [10, 172]. Беручи до уваги, що в патогенезі РС одна з ключових ролей відводиться імунним розладам, ймовірно, що ці зміни можна підтвердити чи спростувати за допомогою лабораторних тестів. Більше того, за причинно-наслідковим зв'язком, вказані порушення в лабораторних показниках повинні передувати виявленню наслідків процесу демієлінізації – вогнищам на магнітно-резонансній томографії (МРТ). Саме тому, проблемою сучасної неврології є пошук, валідація та широке впровадження в клінічну практику лабораторних біомаркерів РС [11, 13, 172].

Оскільки попередніми нашими дослідженнями було показано, що при РС відбуваються достовірні зміни глікозилювання імуноглобулінів крові хворих, а також зважаючи на той факт, що імуноглобуліни присутні в цереброспинальній рідині [173], яка використовується як джерело для пошуку патологічних антитіл

— олігоклональних антитіл при постановці остаточного діагнозу розсіяного склерозу, ми припустили, що ЦСР пацієнтів із РС містить імуноглобуліни класу IgG чи їх комплекси із зміненим спектром глікозилювання.

4.1. Дослідження глікозилювання імуноглобулінів у зразках сироватки кові та цереброспінальної рідини хворих на розсіяний склероз

Було здійснено аналіз експонування гліканів у цереброспінальній рідині (ЦСР) та сироватці крові у хворих на розсіяний склероз. Провели аналіз 18 зразків сироватки крові здорових донорів та 20 зразків сироватки крові хворих на розсіяний склероз, з них 12 зразків ліквору хворих на РС.

Усі зразки отримали за добровільної згоди пацієнтів, які перебували на комплексному амбулаторному або стаціонарному лікуванні на клінічній базі кафедри неврології (неврологічне відділення КЗ ЛОР Львівської обласної клінічної лікарні) у період з 2016 по 2019 рр.

При проведенні аналізу імунологічних показників також детально вивчалися клінічні показники 20-ти хворих на РС віком від 23 до 49 років. Середній вік досліджуваних становив $35,0 \pm 7,1$ років, з-поміж них було 17 осіб (85,0%) молодого віку згідно класифікації ВООЗ та 3 особи (15,0%) середнього віку.

Серед аналізованих хворих було 15 жінок (75,0%) та 5 чоловіків (25,0%).

У 8 пацієнтів (40,0%) діагностували КІС, а у 12-ти (60,0%) – РС, що відображено на рис. 4.1.

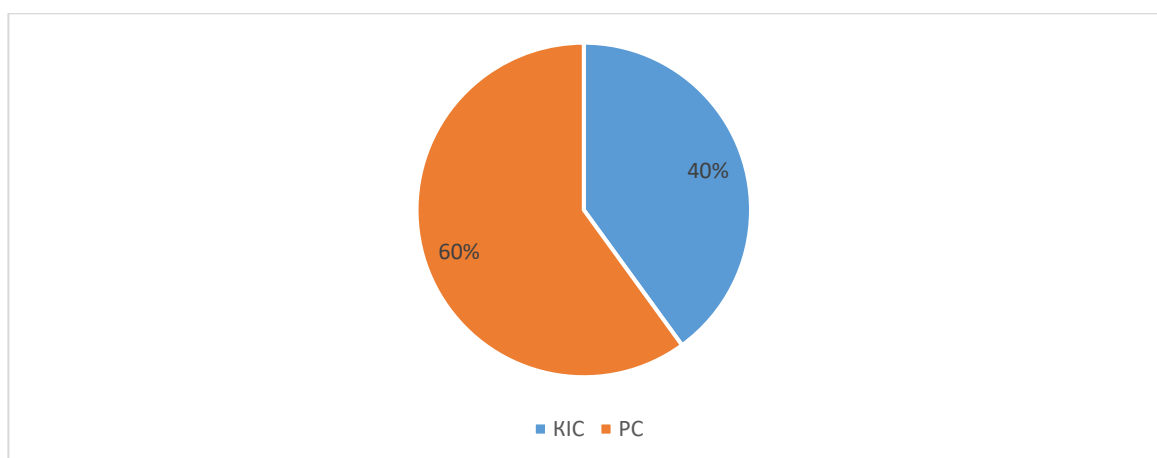


Рисунок 4.1 – Розподіл (%) пацієнтів досліджуваної групи (n=20) згідно клінічного діагнозу

З'ясовано, що тривалість хвороби у цих пацієнтів перебувала в межах від 1 до 13 років, з середнім (медіанним) значенням 1 [1; 5,3] років. Бал EDSS в обстежених знаходився у діапазоні від 1,5 до 4,5 балів, з середнім значенням 2,3 [2,0; 3,1] бали. З поміж зазначених пацієнтів 15 (75,0%) мали бал EDSS в інтервалі від 1,5 до 3,0 балів, що відповідало легкому перебігу РС, а 5 (25,0%) – в інтервалі від 3,5 до 4,5 балів, що відповідало середній тяжкості хвороби (рис. 4.2).

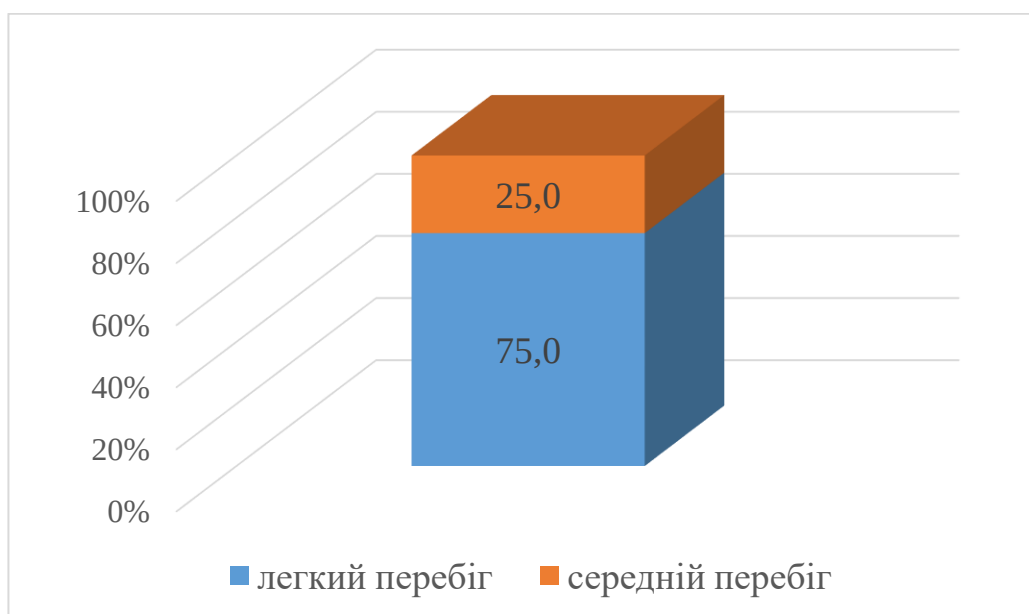


Рисунок 4.2 – Розподіл (%) хворих на РС досліджуваної групи (n=20) за тяжкістю хвороби згідно балу EDSS

У досліджуваній групі 13 пацієнтів (65,0%) були в стадії загострення та приймали лікування солу-медролом, а 7 (35,0%) на момент обстеження не отримували жодного лікування на момент забору лабораторних зразків.

Після проведених МРТ-досліджень у 17-ти (85,0%) спостерігалися зміни, що відповідають критеріям для встановлення достовірного діагнозу РС, а у трьох пацієнтів (15,0%) були зміни, що відповідають критеріям клінічно ізольованого синдрому РС (рис. 4.3).

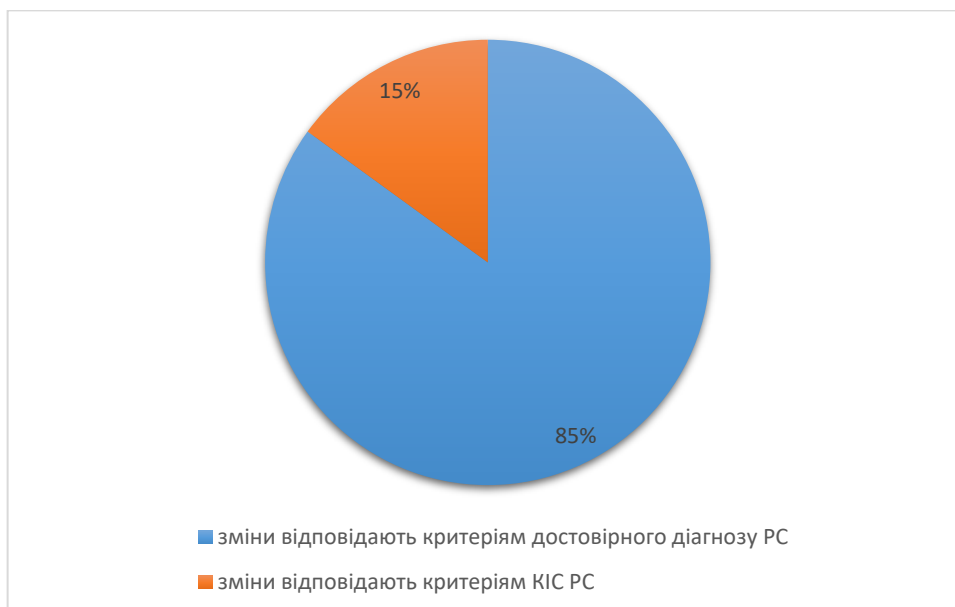


Рисунок 4.3 – Розподіл (%) пацієнтів досліджуваної групи (n=20) в залежності від змін, виявлених на МРТ

Дослідження олігоклональних антитіл в лікворі було проведено 12-ьом пацієнтам (60,0%) цієї групи. Позитивні результати отримали у 8 пацієнтів (66,7%). Негативні результати - у 4 пацієнтів (33,3%).

Оскільки вміст імуноглобулінів у сироватці крові та ЦСР суттєво різняться, для порівняння оцінки експонування гліканів на молекулах імуноглобулінів нами було запропоновано модифікацію методу лектин-імуноферментного аналізу [168], де рівномірність аналізу імуноглобулінів забезпечувалася шляхом насичення антитіл-«уловлювачів» молекул імуноглобінів IgG. Схема аналізу представлена на рис. 4.4. Для забезпечення насичення, використовували розведення сироваток 1:1000 та ЦСР – 1:10.

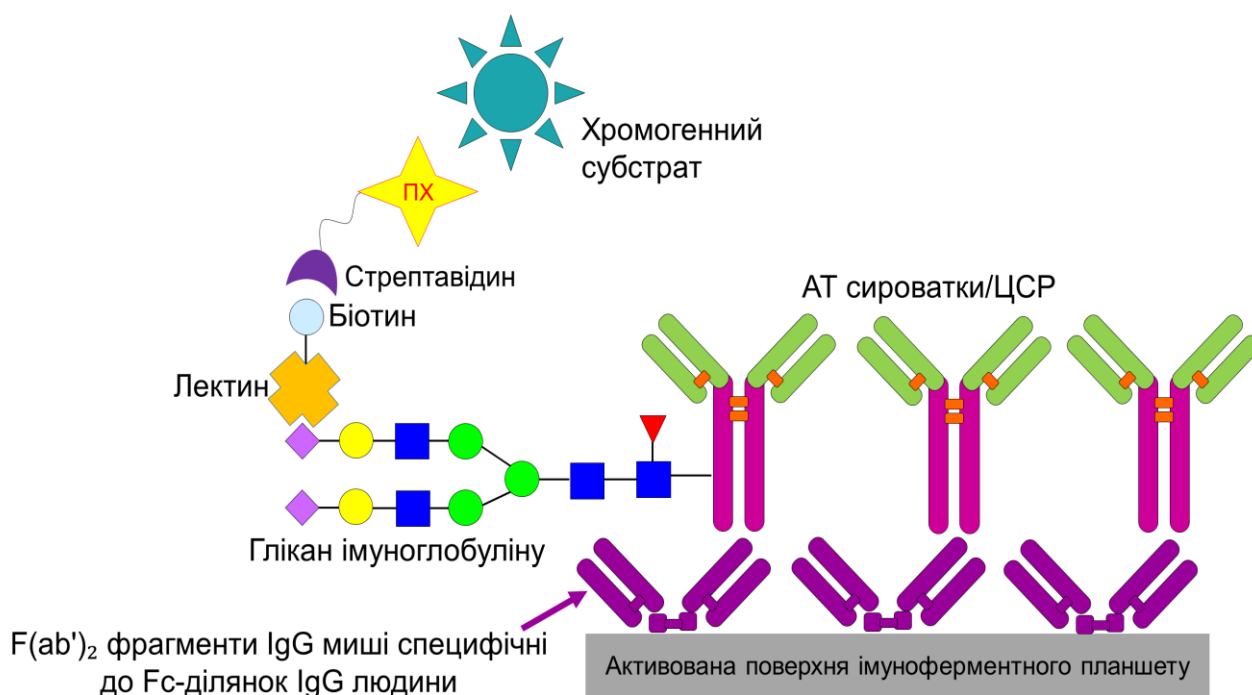
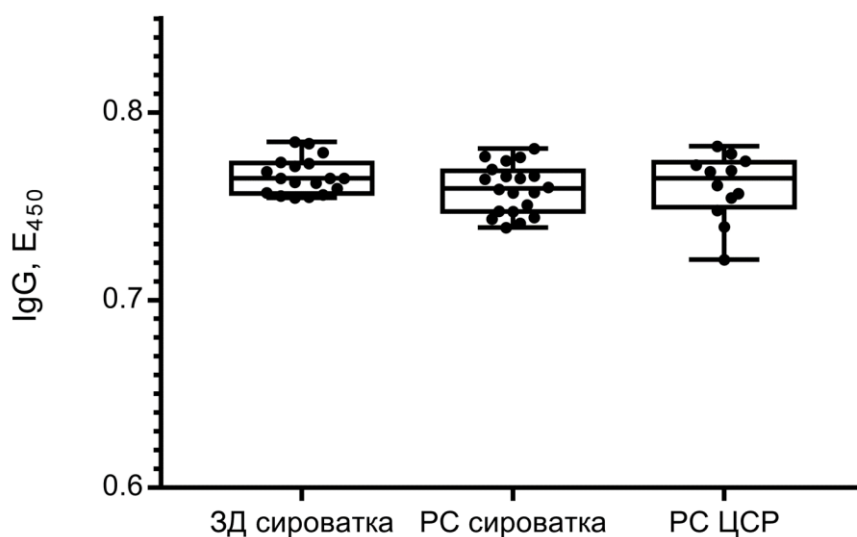


Рисунок 4.4 – Схема імуноферментного аналізу для виявлення експонування гліканів на молекулах IgG сироватки крові та ЦСР. Однакова кількість молекул IgG, що піддається аналізу досягається за рахунок насичення поверхні імуноферментної планшети «вловлюючими» фрагментами антитіл з наступною інкубацією із надлишком сироватки/ЦСР.

Для перевірки рівномірності зв'язування імуноглобулінів IgG у використаній системі було проведено визначення вмісту зв'язаних антитіл, використовуючи детектуючі антитіла, специфічні проти імуноглобуліну IgG людини, мічені пероксидазою.

Як видно з рис. 4.5., вміст зв'язаних антитіл, що піддавався аналізу, був однаковим (статистично не відрізнявся) з-поміж зразків сироватки крові здорових донорів (ЗД) та хворих на розсіяний склероз, а також зразків ліквору хворих на РС.



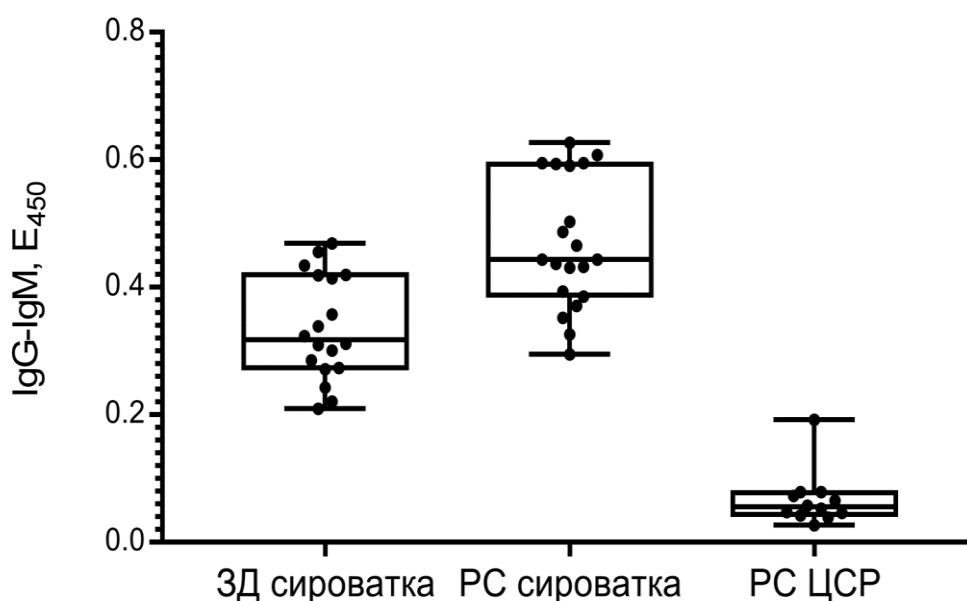
Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
3Д сироватка vs. РС сироватка	0.006851	-0.003475 до 0.01718	Ні	нд	0.2533
3Д сироватка vs. РС ЦСР	0.005713	-0.006131 до 0.01756	Ні	нд	0.4783
РС сироватка vs. РС ЦСР	-0.001138	-0.01274 до 0.01047	Ні	нд	0.9694

Рисунок 4.5 – Порівняння вмісту досліджуваних імуноглобулінів IgG у зразках сироватки 3Д та хворих на РС, а також ЦСР хворих на РС свідчить про однакову кількість імуноглобулінів, що піддавались подальшому аналізу запропонованим методом

Відомо, що вміст імунних комплексів, зокрема тих, які містять молекули IgG, може змінюватись при РС. Оскільки молекули імуноглобулінів у складі комплексів також експонують сайти глікозилювання, нами було проведено аналіз вмісту імунних комплексів IgG-IgM у досліджуваних зразках. Для цього «вловлювали» імуноглобуліни IgG на поверхні імуноферментних планшетів за допомогою сорбованих F(ab)₂ фрагментів специфічних до Fc ділянки імуноглобулінів IgG людини, а детекцію комплексів проводили за допомогою антитіл, специфічних до імуноглобулінів IgM людини, мічених пероксидазою. Таким чином, позитивний сигнал реакції забезпечувався лише коли в суміші були комплекси IgG-IgM.

Аналіз імунних комплексів молекул IgM, зв'язаних із молекулами IgG, продемонстрував значну різницю у їх вмісті між сироваткою здорових донорів

та сироваткою крові хворих на РС. Відмічався достовірно вищий вміст імунних комплексів IgG-IgM у здорових донорів $p < 0.0001$. Водночас, у ЦСР хворих на РС виявлялась набагато менша кількість імунних комплексів ($p < 0.0001$), яка була близькою до нижньої межі інструментальних методів детекції (рис. 4.6). Це свідчить про цілісність гематоенцефалічного бар'єру, та той факт, що імуноглобуліни сироватки та ЦСР є різними за генезом молекулами, які вільно не переміщуються через гематоенцефалічний бар'єр.

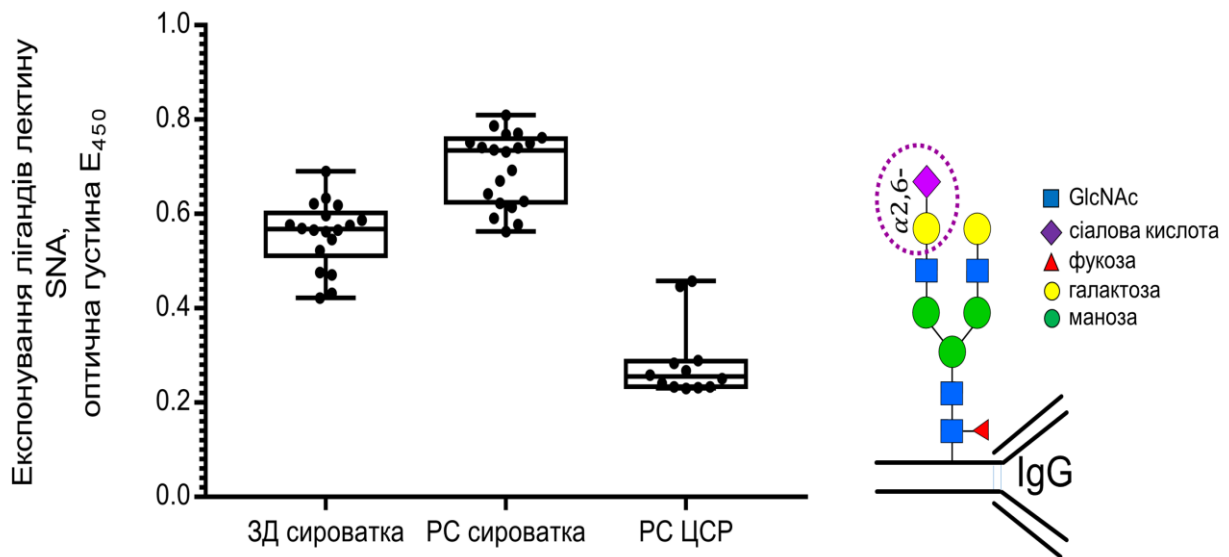


Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
3Д сироватка vs. РС сироватка	-0.1321	-0.1982 до -0.066	Так	****	<0.0001
3Д сироватка vs. РС ЦСР	0.2697	0.1939 до 0.3456	Так	****	<0.0001
РС сироватка vs. РС ЦСР	0.4018	0.3275 до 0.4761	Так	****	<0.0001

Рисунок 4.6 – Порівняння вмісту досліджуваних імунних комплексів IgG-IgM у зразках сироватки 3Д та хворих на РС, а також ЦСР хворих на РС

Термінальні залишки сіалових кислот визначають антизапальні властивості молекул імуноглобулінів IgG [174]. Для виявлення їх експонування (рис. 4.7) використовували лектини SNA (специфічний до термінальних сіалових кислот приєднаних $\alpha 2.6$ -зв'язком до галактози) та PSqL (специфічний до термінальних

сіалових кислот приєднаних $\alpha 2,6$ -зв'язком до галактози в складі біантенних N-гліканів) [168, 175].



Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
3Д сироватка vs. PC сироватка	-0.1401	-0.1995 до -0.08073	Так	****	<0.0001
3Д сироватка vs. PC ЦСР	0.2719	0.2039 до 0.34	Так	****	<0.0001
PC сироватка vs. PC ЦСР	0.412	0.3453 до 0.4788	Так	****	<0.0001

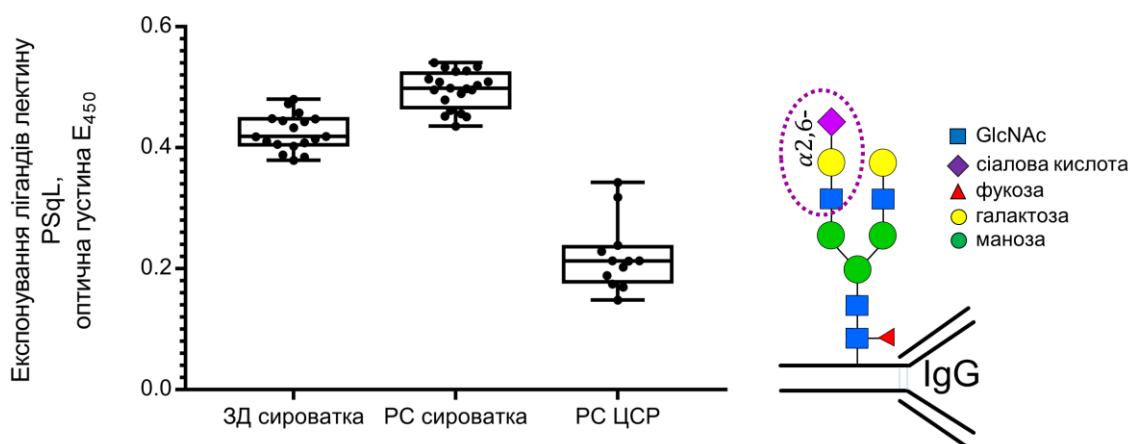
Рисунок 4.7 – Рівень зв'язування лектину SNA із сіаловмісними гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток та ЦСР. Вставка ілюструє ділянку молекули глікану імуноглобуліну IgG, що розпізнається лектином (пунктирна лінія)

Лектин-імуноферментний аналіз досліджуваних зразків сироваток крові показав, що рівень експонування сіалових залишків, виявлений з лектином SNA, є достовірно вищим у сироватках крові пацієнтів із PC у порівнянні зі здоровими донорами, що добре узгоджується із раніше виявленими нами особливостями імуноглобулінів при PC [176], та є достовірно нижчим у зразках ЦСР. При цьому, рівень зв'язування лектину SNA із лігандами на імуноглобулінах IgG у зразках ЦСР є достовірно нижчим за такий у зразках сироваток здорових донорів (рис. 4.7).

Лектин SNA виявляє експонування $\alpha 2.6$ -зв'язаних залишків сіалової кислоти, які здебільшого присутні на імуноглобулінах у формі біантенних розгалужених гліканів. Проте, щоб виключити можливе інше джерело приєднання вказаних сіалільних залишків, наприклад, у складі О-гліканів, нами додатково був використаний лектин *Polyporus squamosus*, люб'язно наданий професором Г.-Й. Габіусом, що виявляє специфічність до $\alpha 2.6$ -сіалільних залишків лише у складі N-гліканів [177].

Передбачувано, ми спостерігали подібну залежність (рис. 4.8). Так, рівень експонування сіалільних залишків був вищим у сироватках хворих на РС та набагато нижчим у лікворі пацієнтів із РС.

З отриманих даних зробили висновок, що склад гліканів за рівнем сіалювання суттєво різниться у сироватці крові та цереброспінальній рідині хворих на РС, а також про те, що в досліджуваному випадку спостерігаємо зміну експонування залишків сіалових кислот на біантенному N-глікані молекул імуноглобулінів.

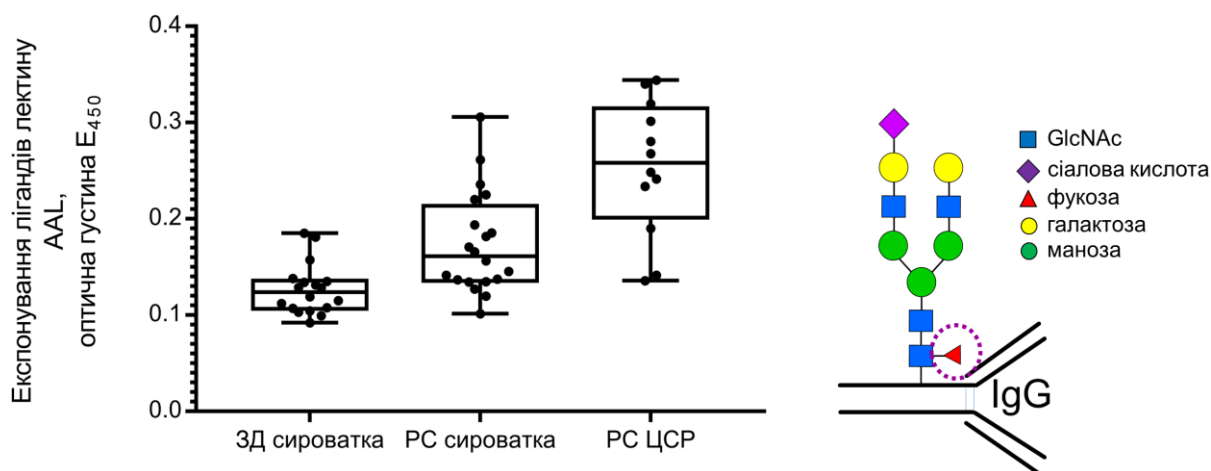


Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
ЗД сироватка vs. РС сироватка	-0.07004	-0.1002 до -0.03987	Так	****	<0.0001
ЗД сироватка vs. РС ЦСР	0.2045	0.1699 до 0.2391	Так	****	<0.0001
РС сироватка vs. РС ЦСР	0.2746	0.2407 до 0.3085	Так	****	<0.0001

Рисунок 4.8 – Рівень зв'язування лектину PSqL із сіаловмісними гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток та ЦСР. Вставка ілюструє ділянку глікану, що розпізнається лектином (пунктирна лінія)

У попередніх дослідженнях було описане достовірне зростання експонування рівня фукозовмісних залишків на молекулах імуноглобулінів при індукції запалення індукованого різними антигенами [178]. Воно спостерігалось при хронічних аутоімунних захворюваннях на зразок СЧВ, а рівень експонування корелював із рівнем активності захворювання [179]. Проте, експонування фукозильних залишків, специфічних до лектину AAL, на молекулах імуноглобулінів IgG у ЦСР досі не визначали.

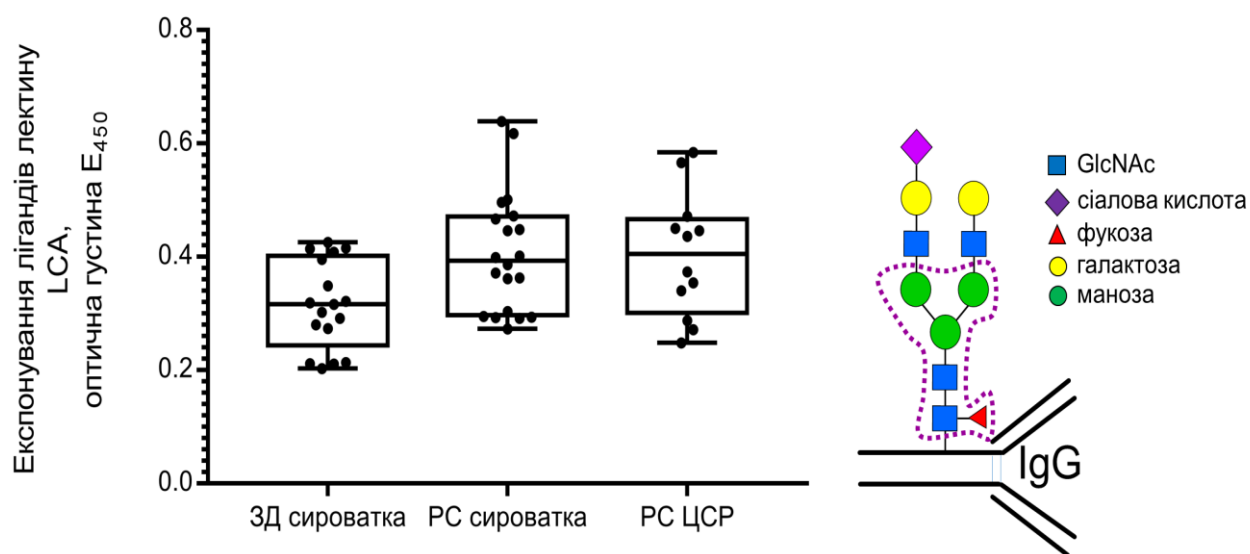
Ми дослідили експонування фукозильних залишків на молекулах імуноглобулінів сироватки та ЦСР хворих на розсіяний склероз. Лектин-імуноферментний аналіз показав підвищення рівня експонування залишків фукози на імуноглобулінах як сироватки, так і ліквору у пацієнтів із РС у порівнянні зі здоровими донорами. При цьому, рівень їх експонування на імуноглобулінах ліквору був достовірно вищим за такий в імуноглобулінах сироватки крові (рис. 4.9).



Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
ЗД сироватка vs. РС сироватка	-0.04739	-0.08688 до -0.007889	Так	*	0.0152
ЗД сироватка vs. РС ЦСР	-0.1271	-0.1724 до -0.08175	Так	****	<0.0001
РС сироватка vs. РС ЦСР	-0.07967	-0.1241 до -0.03528	Так	***	0.0002

Рисунок 4.9 – Рівень зв'язування лектину AAL із фукозовмісними гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток та ЦСР. Вставка ілюструє ділянку глікану, що розпізнається лектином (пунктирна лінія)

Рівень експонування лігандів лектину AAL також пов'язаний із рівнем експонування фукозильованого триманозного кору (ядра), що виявляється за зв'язуванням лектину LCA. Як показано в роботі [180], експонування цих глікозильних залишків на імуноглобулінах при аутоімунних формах ревматоїдного артрити (РА) дозволяло передбачити період загострення хвороби. Оскільки, як і РА, так і РС є антитіло-залежними хронічними захворюваннями, що характеризуються періодами загострення та ремісії, ми звернули увагу на експонування лігандів лектину LCA у зразках сироватки і ЦСР при РС. Результати лектин-імуноферментного аналізу, представленого на рис. 4.10, свідчать про підвищений рівень експонування кору N-гліканів при РС як в зразках сироватки, так і в зразках ЦСР. Зростання значень експонування гліканів у групах сироваток крові здорових донорів та хворих на РС було достовірно значущим (рис. 4.10).



Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
ЗД сироватка vs. РС сироватка	-0.09115	-0.1692 до -0.01306	Так	*	0.0187
ЗД сироватка vs. РС ЦСР	-0.08767	-0.1769 до 0.001572	Ні	нд	0.0551
РС сироватка vs. РС ЦСР	0.003473	-0.08296 до 0.0899	Ні	нд	0.9948

Рисунок 4.10 – Рівень зв'язування лектину LCA із триманозним кором N-гліканів імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток крові та ліквору. Вставка ілюструє ділянку глікану, що розпізнається лектином (пунктирна лінія)

Таким чином, рівень експонування фукозильних та сіалільних залишків у сироватці крові та лікворі у пацієнтів із РС достовірно різниться. Кількість детектованих молекул імуноглобулінів в усіх випадках була однаковою (рис. 4.5).

В такий спосіб нами було продемонстровано, що в досліджуваних зразках сироваток крові та ліквору пацієнтів зі РС відбуваються значні зміни експонування термінальних сіалових кислот та корових фукозильних залишків, які не пов'язані із зміною кількості самих N-гліканів чи появою додаткових сайтів глікозилювання на молекулах імуноглобулінів.

Зважаючи на численні дані літератури про вагомий вплив виявлених глікозильних залишків на модулювання процесів запалення, логічним постало питання – чи відбуваються спостережувані зміни глікозилювання в організмі одного пацієнта (тобто чи різниться глікозилювання імуноглобулінів у сироватці та ЦСР)? Щоб відповісти на це запитання нами було зібрано зразки сироватки та ЦСР окремих пацієнтів (парні), які перебували на комплексному амбулаторному або стаціонарному лікуванні на клінічній базі кафедри неврології (неврологічне відділення КЗ ЛОР Львівської обласної клінічної лікарні) у період з 2016 по 2019 рр., та здійснено порівняльний аналіз глікозилювання їх імуноглобулінів щодо процесів глікозилювання.

4.2. Дослідження парних зразків сироватки крові та цереброспінальної рідини хворих на розсіяний склероз щодо змін глікозилювання імуноглобулінів

Для досліджень парних зразків сироватки крові та ЦСР пацієнтів із РС здійснювали забір лабораторних зразків у хворих під час відбору ЦСР при аналізі вмісту олігоклональних антитіл з метою постановки діагнозу «розсіяний склероз». Із групи з 12-ти пацієнтів, описаних в розділі 4.1.1, було відібрано та проаналізовано 7 пар зразків сироваток і цереброспінальної рідини. Обстежені пацієнти були у віці від 25 до 41 років – тобто усі особи молодого віку згідно

класифікації ВООЗ. Середній вік досліджуваних становив $33,0 \pm 5,8$ років, з поміж них було 6 жінок (85,7%) та 1 чоловік (14,3%).

У 4-х пацієнтів (57,2 %) діагностували КІС, а у трьох (42,8 %) – РС, що відображено на рис. 4.11.

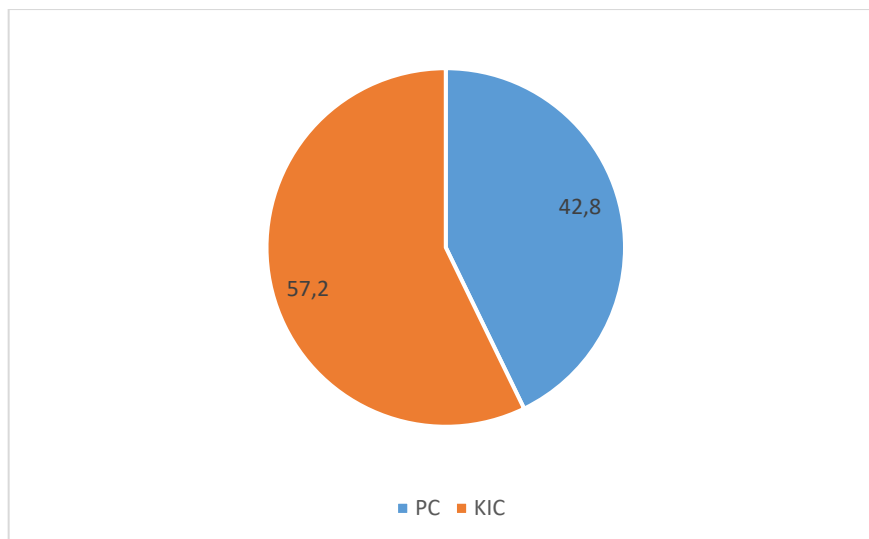


Рисунок 4.11 – Розподіл (%) пацієнтів досліджуваної групи (n=7) згідно клінічного діагнозу

Тривалість хвороби у цих пацієнтів перебувала в межах від 1 до 13 років, з серединним (медіанним) значенням 1 [1; 1] років. Бал EDSS у цих хворих знаходився у діапазоні від 1,5 до 2 балів (у всіх пацієнтів був легкий перебіг патологічного процесу), з середнім значенням $1,8 \pm 0,3$ бали.

В аналізованій групі лише один пацієнт (14,3%) перебував у стадії загострення та приймав лікування солу-медролом, а інші 6 (85,7%) – не отримували жодної терапії на момент забору лабораторних зразків.

Дослідження олігоклональних АТ засвідчило, що позитивні результати були у трьох (42,9%) обстежених, а негативні результати - в 4-х пацієнтів (57,1%).

Після проведених МРТ обстежень у 4 (57,1%) спостерігалися зміни, що відповідають критеріям для встановлення достовірного діагнозу РС, а у 3-х пацієнтів (42,9%), були зміни, що не відповідають критеріям для підтвердження достовірного діагнозу (рис. 4.12).

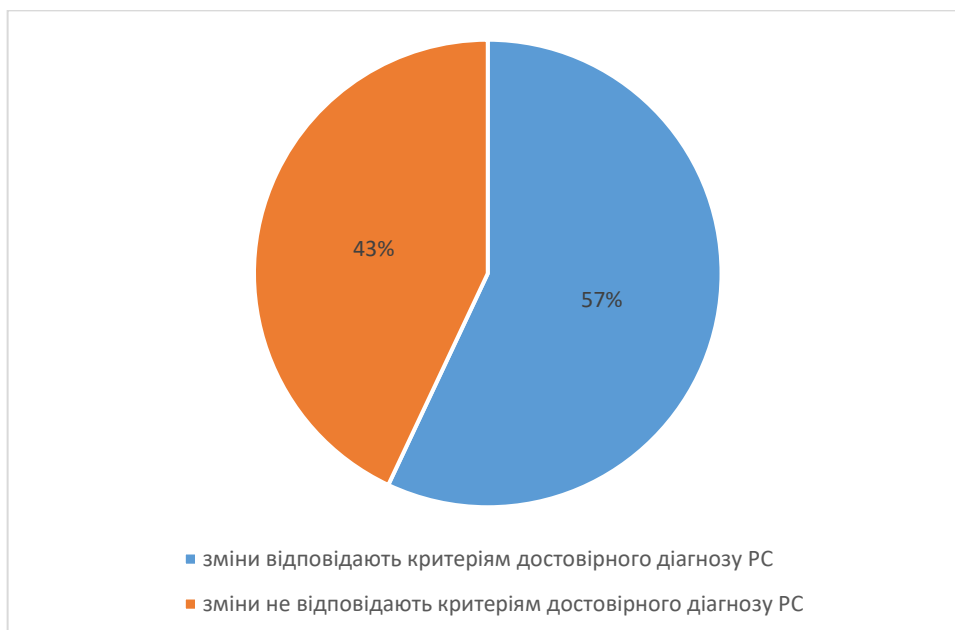


Рисунок 4.12 – Розподіл (%) пацієнтів досліджуваної групи (n=7) в залежності від змін, виявлених на МРТ

Для нас було важливим проаналізувати клінічний перебіг РС у цих пацієнтів з метою виявлення можливих клінічних закономірностей і прогностичних факторів переходу КІС в клінічно достовірний РС. Тому було детально проаналізовано історії хвороб 7-ми пацієнтів, в яких провели забір сироватки крові та цереброспінальної рідини для імунологічних досліджень, представлених у цьому розділі. Нижче наведені клінічні випадки цих пацієнтів.

Пацієнтка №1, жінка 26-ти років, знаходилась на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні КЗ ЛОР «ЛОКЛ» з 22.10.2018р. по 26.10.2018р.

При огляді – скарги на біль голови стискаючого характеру, періодичне затерпання нижніх кінцівок.

Анамнез захворювання: хворіє протягом двох тижнів.

Неврологічний статус: свідомість збережена, орієнтована у просторі та часі. Зіниці D=S, очні щілини D=S. Обличчя симетричне, ковтання та мова не порушені. Язик по середній лінії. Тонус м'язів збережений. Сухожилкові та періостальні рефлексі поживлені D=S. Патологічні рефлексі відсутні. У позі Ромберга похитування. Координаторні проби виконує задовільно. Під час огляду бал за шкалою EDSS складав 1,5.

На МРТ головного мозку: дрібні поодинокі вогнищеві зміни білої речовини головного мозку (рис. 4.13). МРТ ознаки не є достатніми для постановки достовірного діагнозу РС.

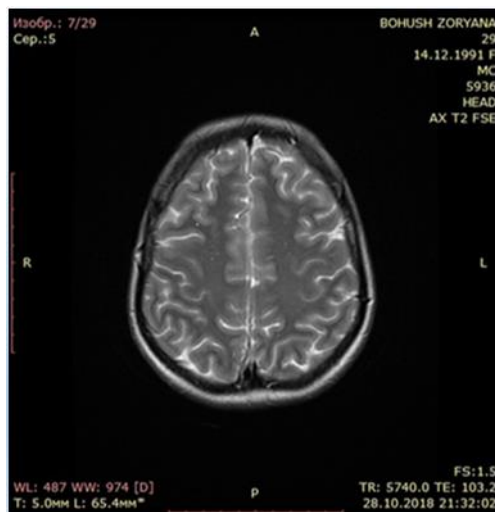


Рисунок 4.13

Аналіз ліквору на олігоклональні антитіла: олігоклональні смуги негативні.

Клінічний діагноз: КІС РС у вигляді цефалгічного синдрому, мала ймовірність трансформації в достовірний РС.

Пацієнтка №2, жінка 23-х років, знаходилась на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні КЗ ЛОР «ЛОКЛ» з 30.05.2018р. по 04.06.2018р.

При огляді – скарги на порушення зору, випадіння поля зору справа.

Анамнез захворювання: хворіє протягом місяця.

Неврологічний статус: свідомість збережена, орієнтована у просторі та часі. Зіниці D=S, очні щілини D=S. Правобічна квадрантна геміанопсія. Обличчя симетричне, ковтання та мова не порушені. Язик по середній лінії. Тонус м'язів збережений. Сухожилкові та періостальні рефлекси D>S. Патологічні рефлекси відсутні. У позі Ромберга похитування. Координаторні проби виконує задовільно. Чутливість не порушена.

Під час огляду бал за шкалою EDSS складав 2,0.

На МРТ головного мозку: множинні вогнищеві зміни білої речовини головного мозку (рис. 4.14). МРТ ознаки типові для розсіяного склерозу.

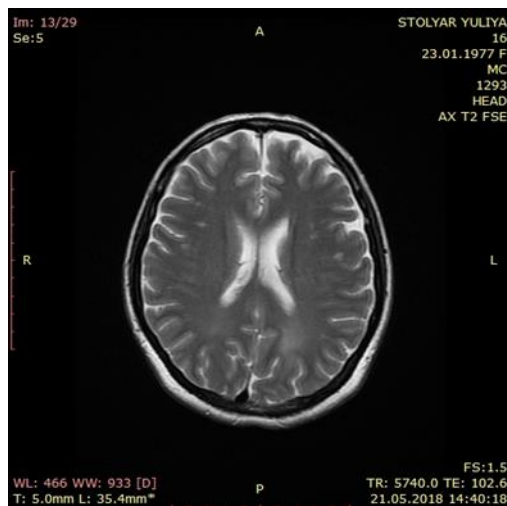


Рисунок 4.14

Аналіз ліквору на олігоклональні антитіла: олігоклональні смуги позитивні.

Клінічний діагноз: Розсіяний склероз, ремітуючо-рецидивуючий тип перебігу.

Пацієнтка №3, жінка 38-ми років, знаходилась на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні КЗ ЛОР «ЛОКЛ» з 02.11.2018р. по 19.11.2018р.

При огляді – скарги на слабкість в правих кінцівках, порушення ходи, похитування при ході.

Анамнез захворювання: хворіє з 2006 року відколи почала турбувати слабкість в лівій нозі. Зі слів пацієнтки періодично лікувалася в ЛОКЛ, медична документація відсутня.

Неврологічний статус: свідомість збережена, орієнтована у просторі та часі. Зіниці D=S, очні щілини D=S. Обличчя симетричне, ковтання не порушене. Дизартрія. Язик по середній лінії. Сухожилкові та періостальні рефлекси D>S високі. Патологічні рефлекси відсутні. Тонус м'язів підвищений в правих кінцівках, м'язова сила знижена в правих кінцівках. У позі Ромберга похитування. Координаторні проби виконує не чітко. Знижена вібраційна чутливість.

Під час огляду бал за шкалою EDSS складав 2,0.

На МРТ головного мозку: множинні вогнищеві зміни білої речовини головного мозку (рис. 4.15). МРТ ознаки типові для РС.

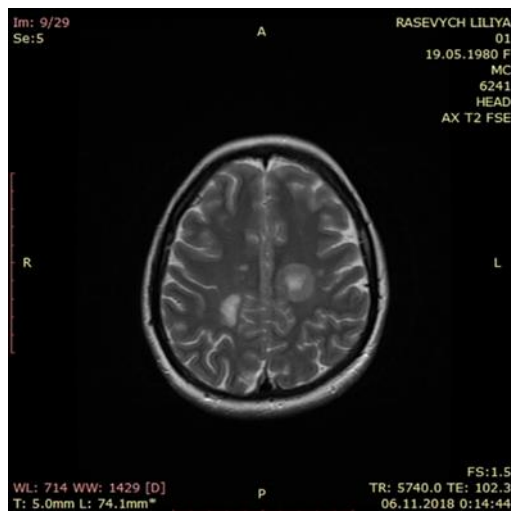


Рисунок 4.15

Аналіз ліквору на олігоклональні антитіла: олігоклональні смуги позитивні.

Клінічний діагноз: Розсіяний склероз, ремітуючо-рецидивуючий тип перебігу.

Пацієнтка №4, жінка 33-х років, знаходилась на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні КЗ ЛОР «ЛОКЛ» з 03.12.2018р. по 07.12.2018р.

При огляді – скарги на частий інтенсивний біль голови, слабкість в кінцівках, виражену загальну слабкість, порушення ходи.

Анамнез захворювання: Зі слів пацієнтки вважає себе хворою з народження, біль голови турбує протягом трьох років, за медичною допомогою не зверталася, погіршення загального стану протягом місяця.

Неврологічний статус: свідомість збережена, орієнтована у просторі та часі. Зіниці D=S, очні щілини D=S. Обличчя симетричне, ковтання не порушене. Язик по середній лінії. Мова не порушена. Сухожилкові та періостальні рефлексі D=S. Патологічні рефлексі Марінеску-Родовичі. М'язова сила знижена в нижніх кінцівках. У позі Ромберга стійка. Координаторні проби виконує задовільно. Функція тазових органів не порушена.

Під час огляду бал за шкалою EDSS складав 2,0.

На МРТ головного мозку: вогнищеві зміни паренхіми головного мозку (рис. 4.16). МРТ ознаки не є достатніми для постановки достовірного діагнозу РС.

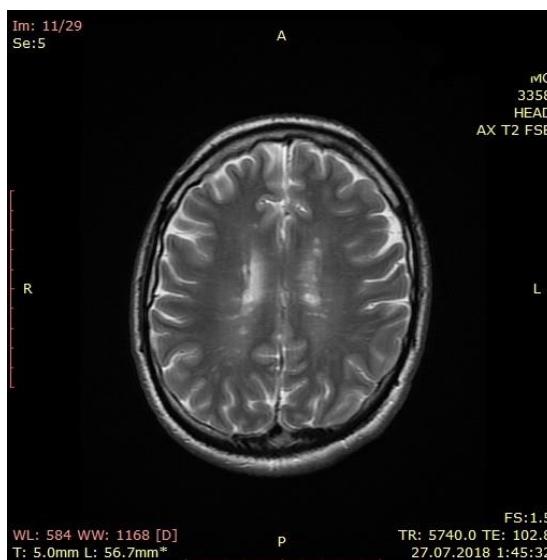


Рисунок 4.16

Аналіз ліквору на олігоклональні антитіла: олігоклональні смуги негативні.

Клінічний діагноз: КІС РС у вигляді цефалгічного синдрому, мала ймовірність трансформації в достовірний РС.

Пацієнтка №5, жінка 25-ти років, знаходилась на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні КЗ ЛОР «ЛОКЛ» з 25.06.2018р. по 03.07.2018р.

При огляді – скарги на затерпання лівих кінцівок, обличчя, головокружіння.

Анамнез захворювання: хворіє протягом шести місяців, коли після психо-емоційного перенавантаження виникло серцебиття, затерпання та біль голови. За медичною допомогою не зверталася.

Неврологічний статус: свідомість збережена, орієнтована у просторі та часі. Зіниці D=S, очні щілини D=S. Обличчя симетричне, ковтання не порушене. Мова не порушена. Язик по середній лінії. Сухожилкові та періостальні рефлексі D=S пожвавлені. Патологічні рефлексі відсутні. Тонус м'язів та м'язова сила збережені. У позі Ромберга похитування. Координаторні проби виконує задовільно. Чутливість не порушена. Менінгеальні знаки відсутні.

Під час огляду бал за шкалою EDSS складав 1,5.

На МРТ головного мозку: неспецифічні дрібновогнищеві зміни головного мозку судинного генезу (рис. 4.17). МРТ не відповідає критеріям постановки достовірного діагнозу РС.

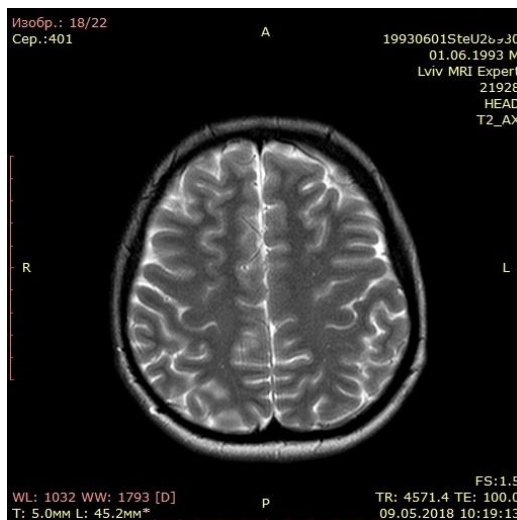


Рисунок 4.17

Аналіз ліквору на олігоклональні антитіла: олігоклональні смуги негативні.

Клінічний діагноз: КІС РС у вигляді мозочкового синдрому, мала ймовірність трансформації в достовірний РС.

Пацієнт №6, чоловік 35-ти років, перебував на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні КЗ ЛОР «ЛОКЛ» з 02.01.2019р. по 03.01.2019р.

При огляді – скарги на затерпання язика, верхньої та нижньої губи, запаморочення, загальну слабкість.

Анамнез захворювання: хворіє протягом двох місяців.

Неврологічний статус: свідомість збережена, орієнтований у просторі та часі. Зіниці D=S, очні щілини D=S. Обличчя симетричне, ковтання не порушене. Мова не порушена. Язик по середній лінії. Тонус м'язів збережений. Сухожилкові та періостальні рефлексивні D=S. Патологічні рефлексивні відсутні. У позі Ромберга похитування. Координаторні проби виконує не чітко. Гіпестезія язика та нижньої третини обличчя.

Під час огляду бал за шкалою EDSS складав 1,5.

На МРТ головного мозку: МРТ ознаки багатовогнищового ураження білої речовини півкуль головного мозку (рис. 4.18). МРТ ознаки є типовими для РС.

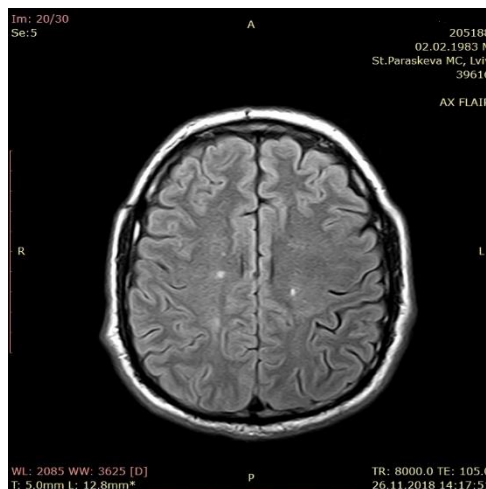


Рисунок 4.18

Аналіз ліквору на олігоклональні антитіла: олігоклональні смуги негативні.

Клінічний діагноз: КІС РС у вигляді мозочкового синдрому та чутливих розладів язика і обличчя, висока ймовірність трансформації в достовірний РС.

Пацієнтка №7, жінка 31-го року, знаходилась на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні КЗ ЛОР «ЛОКЛ» з 03.12.2018р. по 06.12.2018р.

При огляді – скарги на порушення зору на праве око.

Анамнез захворювання: вважає себе хворою з 2017р., коли виникли скарги на погіршення зору, що самостійно регресували. За медичною допомогою не зверталася.

Неврологічний статус: свідомість збережена, орієнтована у просторі та часі. Зіниці D=S, очні щілини D=S. Обличчя симетричне, ковтання не порушене. Мова не порушена. Язик по середній лінії. Сухожилкові та періостальні рефлекси D=S. Патологічні рефлекси відсутні. Тонус м'язів та м'язова сила збережені. У позі Ромберга стійка. Координаторні проби виконує задовільно. Чутливість не порушена.

Під час огляду бал за шкалою EDSS складав 2,0.

На МРТ головного мозку: дрібні субкортикальні вогнища в лобних частках головного мозку (рис. 4.19). Дані МРТ є типовими для РС.



Рисунок 4.19

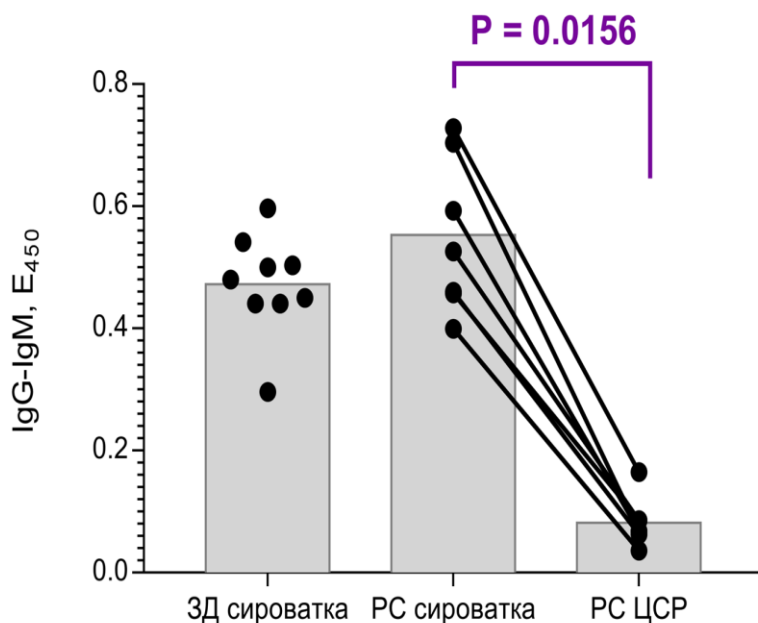
Аналіз ліквору на олігоклональні антитіла: олігоклональні смуги позитивні.

Клінічний діагноз: Розсіяний склероз, ремітуючо-рецидивуючий тип перебігу

На першому етапі цього розділу нашої роботи перевірили вміст імунних комплексів, що містили імуноглобуліни IgG та IgM. Як і у випадку з попередніми даними, отриманими щодо досліджуваних груп пацієнтів, вміст імунних комплексів IgG-IgM у зразках ЦСР є значно нижчим у всіх досліджуваних пацієнтів у порівнянні із таким же вмістом у їхніх сироватках, також вміст імунних комплексів є нижчим у сироватках здорових донорів (рис. 4.20). Як групу порівняння використовували сироватки 9-ти здорових одноразових донорів крові Львівського обласного центру служби крові, відповідного віку та статі, отримані за добровільної інформованої згоди вказаних осіб.

У дослідженнях цього розділу, окрім порівняння груп пацієнтів аналізом ANOVA, здійснювався додатковий аналіз - парний аналіз досліджуваних груп сироватка-ЦСР за допомогою тесту Вілкоксона. Достовірнісі зміни парних показників показано фіолетовим кольором як значення достовірності між порівнюваними парними групами.

Отримані дані свідчать про відсутність імунних комплексів у зразках ЦСР досліджуваних пацієнтів, оскільки отримані значення близькі до рівня інструментальної межі детекції.



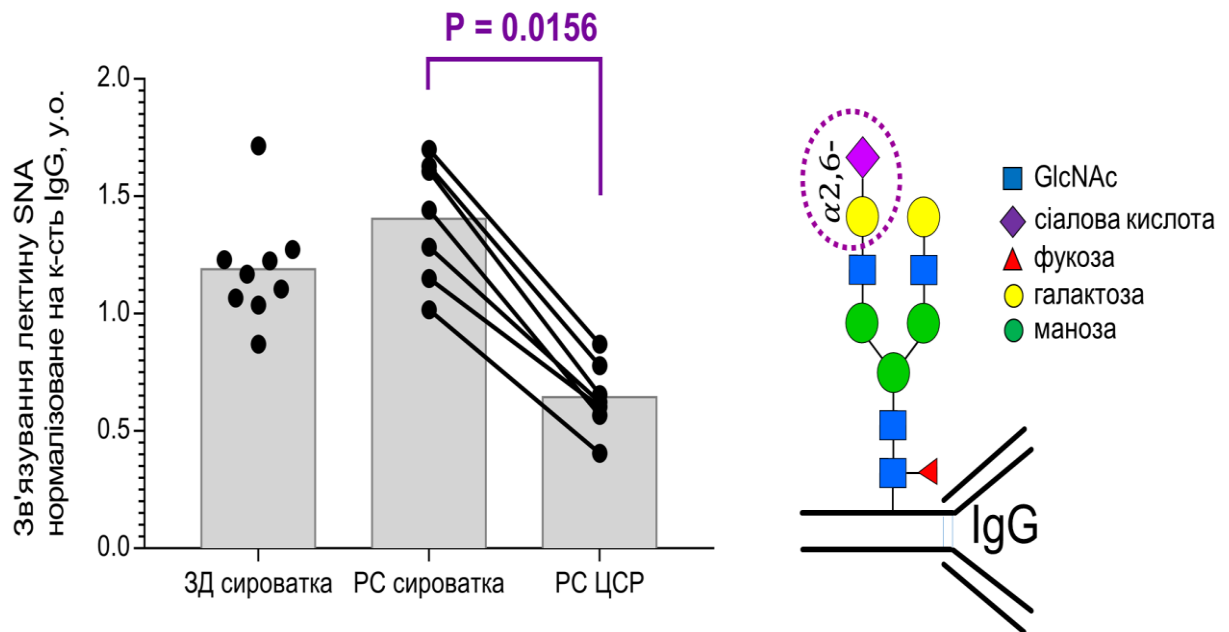
Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
ЗД сироватка vs. РС сироватка	-0.08058	-0.1955 до 0.0343	Ні	нд	0.2035
ЗД сироватка vs. РС ЦСР	0.3906	0.2758 до 0.5055	Так	****	<0.0001
РС сироватка vs. РС ЦСР	0.4712	0.3494 до 0.5931	Так	****	<0.0001

Рисунок 4.20 – Порівняння вмісту досліджуваних імунних комплексів IgG-IgM у зразках сироватки ЗД та хворих на РС, а також ЦСР хворих на РС

На наступному етапі здійснили аналіз вмісту термінальних залишків сіалових кислот на молекулах імуноглобулінів IgG. Для більш точного представлення результатів щодо різного вмісту імуноглобулінів IgG у описаному підрозділі використовувався аналіз із рівномірним насиченням поверхні імунологічних планшетів, як описано у попередньому підрозділі. Також отримані значення оптичної густини експонування лектинів нормалізувались на оптичні значення детектованого вмісту імуноглобулінів класу IgG, як це описано в літературі [181].

Аналіз інтенсивності зв'язування молекул лектину SNA (специфічний до термінальних сіалових кислот приєднаних $\alpha 2.6$ -зв'язком до галактози) із молекулами імуноглобулінів IgG (нормалізовані значення) представлений на рис. 4.21. Отримані дані свідчать, що у досліджуваних пацієнтів достовірно різниться рівень сіалування імуноглобулінів присутніх у ЦСР та в сироватці.

Зокрема, у ЦСР рівень сіалування є набагато нижчим ніж у сироватці тих же пацієнтів ($p < 0.001$) чи в сироватці здорових донорів ($p < 0.0001$).

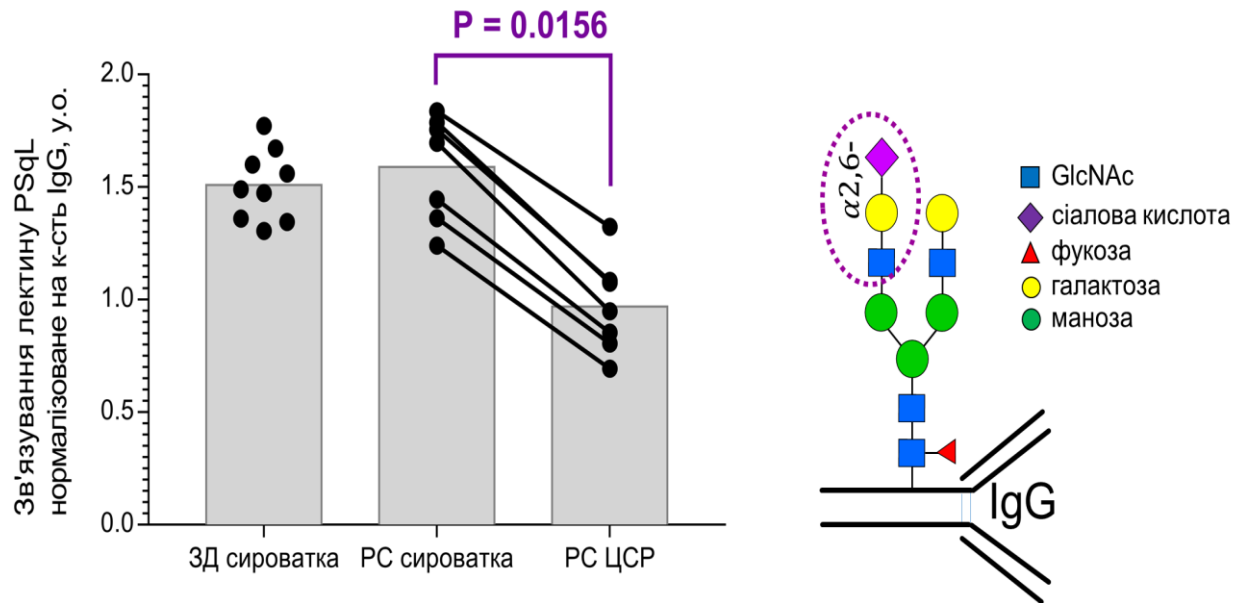


Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
ЗД сироватка vs. PC сироватка	-0.2157	-0.4978 to 0.06632	Ні	нд	0.1549
ЗД сироватка vs. PC ЦСР	0.5451	0.263 to 0.8271	Так	***	0.0003
PC сироватка vs. PC ЦСР	0.7608	0.4616 to 1.06	Так	****	<0.0001

Рисунок 4.21 – Рівень зв'язування лектину SNA із сіаловмісними гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток та ЦСР, значення нормалізовані щодо вмісту імуноглобулінів IgG. Вставка ілюструє ділянку молекули глікану імуноглобуліну IgG, що розпізнається лектином (пунктирна лінія)

Аналіз зв'язування лектину PSqL (специфічний до термінальних сіалових кислот приєднаних $\alpha 2.6$ -зв'язком до галактози в складі біантенних N-гліканів) [182, 183] із молекулами імуноглобулінів IgG представлений на рис. 4.22. Аналіз зв'язування також показав достовірно меншу спорідненість імуноглобулінів у ЦСР до лектину PSqL у порівнянні з імуноглобулінами сироватки пацієнтів із PC в усіх 7 досліджуваних парах зразків, а також продемонстрував зменшення

вмісту сіалільних детермінант на імуноглобулінах у ЦСР у порівнянні із їх вмістом у сироватці здорових донорів та пацієнтів із РС.

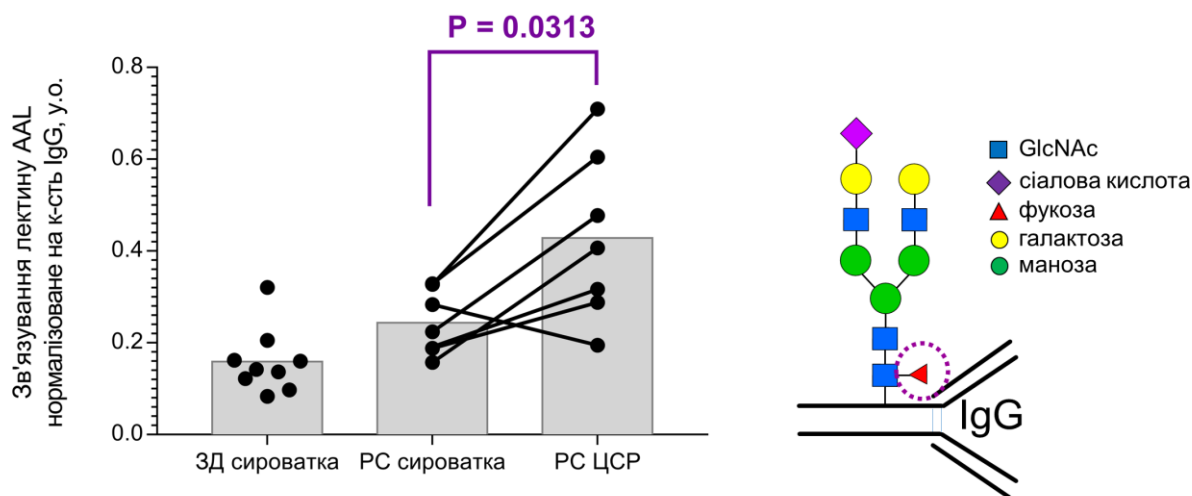


Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
ЗД сироватка vs. РС сироватка	-0.08041	-0.3353 to 0.1745	Ні	нд	0.7084
ЗД сироватка vs. РС ЦСР	0.5399	0.2851 to 0.7948	Так	****	<0.0001
РС сироватка vs. РС ЦСР	0.6204	0.35 to 0.8907	Так	****	<0.0001

Рисунок 4.22 – Рівень зв’язування лектину PSqL із сіаловмісними гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток та ЦСР, значення нормалізовані щодо вмісту імуноглобулінів IgG. Вставка ілюструє ділянку молекули глікану імуноглобуліну IgG, що розпізнається лектином (пунктирна лінія)

Аналіз зв’язування фукозоспецифічного лектину AAL продемонстрував попарне зростання у 6 з 7 досліджуваних пар ЦСР-сироватка у зразках ЦСР, при цьому рівень зв’язування лектину SNA із лігандами на імуноглобулінах IgG у зразках ЦСР є достовірно нижчим за такий у зразках сироваток здорових донорів (рис. 4.23). Аналіз груп даних у парах виявив достовірну значущість отриманих значень ($p < 0.05$). Таким чином, ми спостерігали зростання експонування

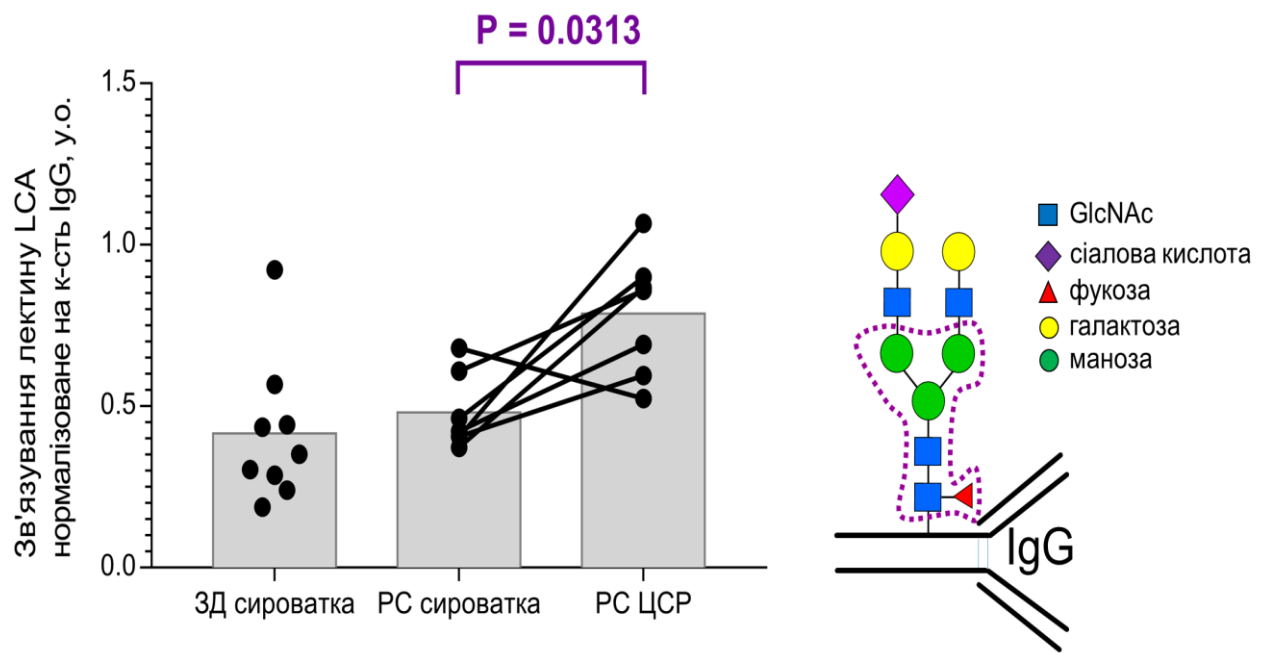
фукозильних залишків в складі молекул IgG у ЦСР хворих у порівнянні з їх сироваткою.



Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
ЗД сироватка vs. PC сироватка	-0.08416	-0.2321 to 0.06379	Ні	нд	0.3406
ЗД сироватка vs. PC ЦСР	-0.2694	-0.4173 to -0.1214	Так	***	0.0005
PC сироватка vs. PC ЦСР	-0.1852	-0.3421 to -0.02827	Так	*	0.0191

Рисунок 4.23 – Рівень зв'язування лектину AAL із сіаловмісними гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток та ЦСР, значення нормалізовані щодо вмісту імуноглобулінів IgG. Вставка ілюструє ділянку молекули глікану імуноглобуліну IgG, що розпізнається лектином (пунктирна лінія)

Також аналіз зв'язування лектину LCA із фукозильованим триманозним кором N-гліканів показав зростання спорідненості лектину до зазначеної структури імуноглобуліну у зразках сироватки пацієнтів (6 з 7 досліджуваних пар ЦСР-сироватка) (рис. 4.24). Спорідненість вказаного лектину може залежати від таких факторів, як поява бісектуючих форм N-гліканів, утворених внаслідок приєднання залишку GlcNAc до корової структури. Бісектуючі глікани відіграють важливу імуномодулюючу роль [184, 185, 186], тому для їх детального дослідження і з'ясування чи зміна зв'язування лектину LCA пов'язана із появою бісектуючих форм гліканів нами було проведено додатковий аналіз методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції.



Групи порівняння	Різниця між середніми зн.	Довірчий інтервал	Достовірно відмінні?	Рівень достовірності	P
3Д сироватка vs. PC сироватка	-0.06456	-0.3028 до 0.1737	Ні	нд	0.7745
3Д сироватка vs. PC ЦСР	-0.371	-0.6092 до -0.1328	Так	**	0.0022
PC сироватка vs. PC ЦСР	-0.3064	-0.5591 до -0.05375	Так	*	0.0160

Рисунок 4.24 – Рівень зв'язування лектину LCA із триманозним кором N-гліканів імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток та ЦСР, значення нормалізовані щодо вмісту імуноглобулінів IgG. Вставка ілюструє ділянку молекули глікану імуноглобуліну IgG, що розпізнається лектином (пунктирна лінія)

Таким чином, у результаті проведених досліджень, ми спостерігали абсолютно відмінні спектри глікозилювання імуноглобулінів у сироватці та цереброспінальній рідині досліджуваних хворих із високим вмістом фукозильованих форм та підвищеним експонуванням частин фукозильованого триманозного кору, зменшенням рівня сіалованих форм гліканів імуноглобулінів у ЦСР.

4.3. Аналіз вмісту глікоформ IgG при розсіяному склерозі методом капілярного-електрофореzu-індукованої лазером флуоресценції

Використаний в попередніх розділах метод лектин-імуноферментного аналізу дозволяє кількісно оцінити експонування окремих глікоформ на молекулах імуноглобулінів, цей параметр є вкрай важливий, оскільки така ж оцінка експонування здійснюється імунними клітинами через взаємодію із відповідними рецепторами і визначає тип відповіді імунних та інших оточуючих клітин організму на експонування окремих гліканів. Проте, даний метод не здатний оцінити кількісний вміст окремих глікоформ імуноглобулінів, яких може бути близько 30 різних типів, зокрема, із різним вмістом сіалових кислот, галактози, бісектуючих гліканів чи утворених внаслідок галактозилювання/сіалування різних (3 та 6-зв'язаних) гілок N-гліканів. Вирішити вказані обмеження може використання оцінки вмісту глікоформ за допомогою капілярного електрофореzu-індукованої лазером флуоресценції. Для цього із зразків сироватки крові проводять виділення імуноглобулінів (завдяки афінній сорбції на білок-A). Після цього вловлені молекули імуноглобулінів піддаються дії ензиму PNGази F, яка відщеплює N-глікани, руйнуючи зв'язок N-ацетилгалактозаміну з аспарагіном у складі білка. Утворена суміш гліканів мітиться флуоресцентною міткою і розділяється хроматографічно у тонкому капілярі, де індукція флуоресценції лазером дозволяє кількісно оцінити вміст кожної з форм гліканів за часом проходження через капілярну хроматографічну колонку (адже глікоформи розділяються за хроматографічним принципом) [187]. Перевагою вказаного методу є можливість оцінити відносний вміст окремих форм гліканів у їх сукупності. Обмеженням щодо використання в аналізі зразків у хворих із розсіяним склерозом є той факт, що про зміни окремих глікоформ при РС майже нічого не відомо. Проте, є відомості щодо вказаних змін при інших аутоімунних захворюваннях як от ревматоїдний артрит чи СЧВ.

Тому, ми порівняли зразки сироватки здорових донорів, хворих на РС, проаналізованих щодо вмісту окремих глікоформ методом КЕ-ЛІФ із значеннями глікоформ для комерційно-доступного внутрішньовенного

імуноглобуліну IgG, а також групою сироваток, у яких спостерігали антитіло-залежні аутоімунні захворювання (на прикладі серопозитивного РА) та антитіло-незалежні аутоімунні захворювання (на прикладі серонегативного РА), адже для даних груп описані зміни окремих глікоформ в ході розвитку захворювання [188, 189]. Так ми планували в непрямий спосіб оцінити, чи зміни які ми спостерігали в глікоформах імуноглобулінів, корелюють з описаними в літературі змінами, тобто встановити, які форми є «нормальними», а які «патологічними».

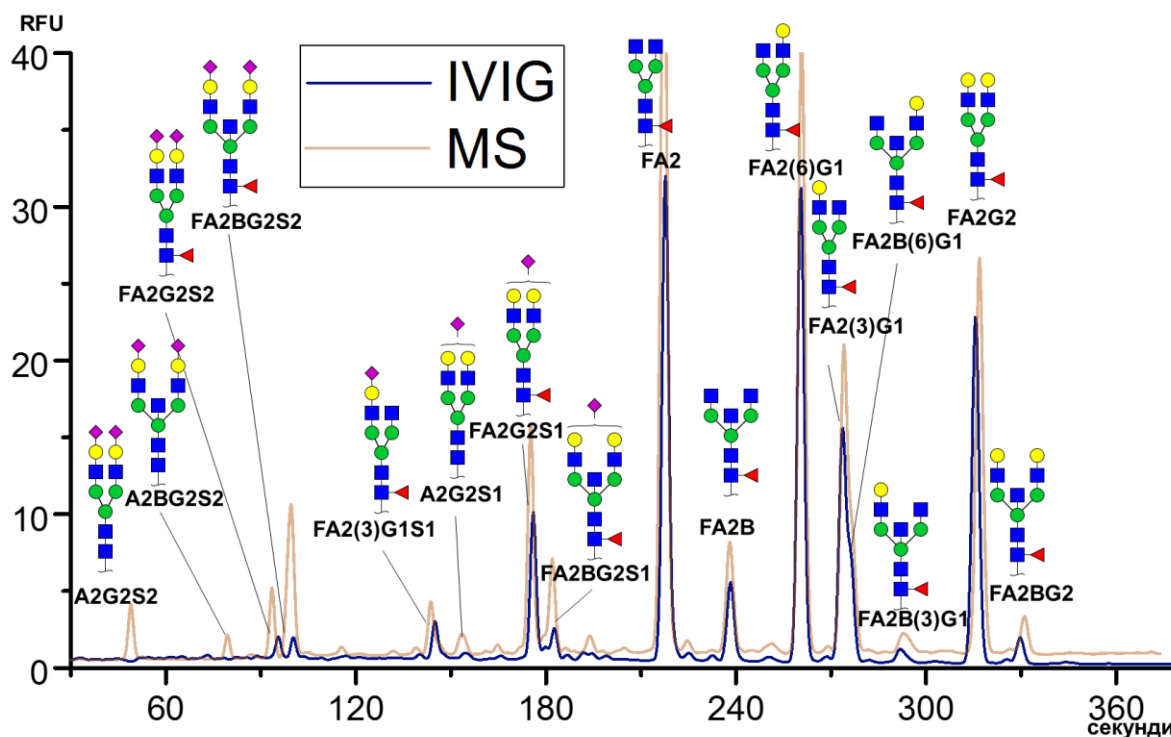
Для здійснення аналізу ми використовували зразки доведеного імуноглобуліну людини (IVIG), який є сумарною фракцією імуноглобулінів, осаджених із сироватки ~2000 донорів, та використовується терапевтично. Ми також використовували зразки здорових донорів (n=9), які були одноразовими донорами крові Львівського обласного центру служби крові. Робота із цією групою осіб здійснювалася на підставі підписаного договору про науково-медичну співпрацю. Зразки крові, n=9 було змішано в рівних кількостях та осаджено (тобто створено пул здорових донорів), як і зразки пацієнтів із РС (описані в розділі 4.1.2., n=7), які були змішані аналогічним чином і отримано пул імуноглобулінів пацієнтів із РС. Дослідження пулу пацієнтів дозволило подолати труднощі із технічною складністю аналізу, водночас, воно дозволило уникнути індивідуальної мінливості притаманної окремим пацієнтам, і проаналізувати досліджувані групи пацієнтів альтернативним методом. У доступних зразках ЦСР була недостатня кількість імуноглобулінів для забезпечення аналізу методом КЕ-ЛІФ. Для порівняння використовували зразки сироватки хворих із антитіло-залежними аутоімунними захворюванням (серопозитивний ревматоїдний артрит, n=15) (антитіло-залежні АІЗ) та антитіло-незалежними аутоімунними захворюваннями (серонегативний ревматоїдний артрит, n=12) (антитіло-незалежні АІЗ). Для вказаних груп проводили аналіз окремих глікоформ для кожного пацієнта в рамках спільного дослідження з Дослідним центром молекулярної медицини Університету Дебрецену, Угорщина.

Результати аналізу підсумовано на рис. 4.25. Представлено типовий хроматографічний профіль розділення досліджуваних глікоформ

імуноглобулінів доведеного імуноглобуліну IVIG та пулу пацієнтів із РС, проаналізований методом КЕ-ЛПФ. У таблиці до рис. 4.25. наведено кількісний вміст окремих фракцій гліканів у складі зразків імуноглобулінів. Кольором виділено глікоформи, вміст яких достовірно різнився (достовірність наведена в стовпці Р (A3/An3 AI3)) у пацієнтів із антитіло залежними та антитіло-незалежними АІЗ. Такими глікоформами виявились A2BG2S2 ($p = 0,052$, це значення близьке до обраних критеріїв достовірності), FA2BG2S1 ($p=0,008$), FA2(6)G1 ($p=0,040$) та FA2BG2 ($p=0,030$). Дві з цих форм містять бісектуючі глікани – FA2BGS1 та FA2BG2, і вміст їх зростав при антитіло-залежних імунних патологіях. Водночас, аналізуючи досліджувані фракції, ми спостерігали, що вміст зазначених глікоформ у фракції 3Д був близьким (FA2BGS1 = 3,13%, FA2BG2 = 1,33%) до такого у пацієнтів із антитіло незалежними аутоімунними патологіями (FA2BGS1 = 3,68%, FA2BG2 = 1,19%), а їх вміст у пацієнтів із РС (FA2BGS1 = 4,11%, FA2BG2 = 1,56%) наближався до такого у пацієнтів з антитіло-залежними АІЗ (FA2BGS1 = 4,92%, FA2BG2 = 1,62%) (рис. 4.25).

Паралельно ми спостерігали зменшення вмісту сіалованих форм A2BG2S2, FA2(3)G1S1, FA2BG2S1 як у пацієнтів із антитіло-залежними АІЗ, що є добре відомим фактом [190, 191], так і у пацієнтів із РС. Тобто профіль пацієнтів з РС наближався до того, що відомий при антитіло-залежних аутоімунних захворюваннях.

На основі отриманих даних, ми зрозуміли, що при РС спостерігається зростання вмісту фракцій гліканів імуноглобулінів IgG, що містять бісектуючий залишок глюкозаміну. Цей залишок може впливати на стехіометрію зв'язування лектину LCA, як показано нами в роботі [192]. Водночас, зміни у вмісті сіалованих фракцій, що отримали при РС, збігаються із такими ж змінами, описаними в літературі для інших антитіло-залежних АІЗ.



	IVIG	ЗД	РС	Антитіло- незалежні АІЗ		Антитіло- залежні АІЗ		Р (АЗ/АнЗ АІЗ)
				М	м	М	м	
A2G2S2	сліди	2.62	0.87	2.48	0.45	1.69	0.17	0.128
A2BG2S2	сліди	0.83	0.45	0.68	0.11	0.42	0.05	0.052
FA2G2S2	0.87	2.29	4.64	2.12	0.15	2.20	0.20	0.741
FA2BG2S2	0.78	1.47	2.95	2.19	0.19	2.35	0.14	0.508
FA2(3)G1S1	1.50	1.42	1.11	1.37	0.08	1.18	0.06	0.076
A2G2S1	0.40	1.59	1.19	1.78	0.13	1.77	0.14	0.951
FA2G2S1	6.43	8.76	7.15	6.89	0.53	7.87	0.65	0.251
FA2BG2S1	1.30	3.13	4.11	3.68	0.31	4.92	0.29	0.008
FA2	23.84	21.24	25.99	27.99	1.53	25.79	2.07	0.403
FA2B	4.13	2.74	3.95	4.43	0.34	4.25	0.42	0.749
FA2(6)G1	23.10	22.53	18.95	21.03	0.54	19.49	0.46	0.040
FA2(3)G1	11.66	7.8	9.44	7.78	0.32	7.75	0.48	0.960
FA2B(6)G1	4.61	3.68	4.14	4.16	0.23	4.22	0.19	0.837
FA2B(3)G1	0.95	0.81	0.91	1.04	0.07	1.02	0.05	0.801
FA2G2	17.77	17.05	12.28	10.81	0.75	12.78	1.35	0.216
FA2BG2	1.27	1.33	1.56	1.19	0.10	1.62	0.08	0.003

Рисунок 4.25 – Визначення вмісту окремих гліканів на молекулах імуноглобулінів IgG сироватки методом КЕ-ЛІФ. Вгорі - типова хроматограма гліканів IgG доведеного імуноглобуліну (лікарського препарату IVIG) та пулу імуноглобулінів хворих на РС, отримана методом КЕ-ЛІФ. Внизу – таблиця із вмістом окремих глікоформ в досліджуваних групах (ЗД, РС, антитіло-залежні АІЗ та антитіло-незалежні АІЗ)

Щоб краще дискримінувати отримані зміни у вмісті досліджуваних фракцій, ми провели попарний аналіз вмісту сіалованих та бісектуючих фракцій, шляхом побудови двомірних діаграм, де вміст кожної фракції визначає її положення на діаграмі. Найкращі дискримінаційні результати отримано для пари глікоформ FA2(3)G1S1 та FA2BG2 (рис. 4.26). На діаграмі видно чітке групування значень отриманих для груп антитіло-залежних та антитіло-незалежних патологій у дві окремі популяції. При цьому, значення, отримані для пулу імуноглобулінів 3Д та препарату IVIG, знаходяться в популяції антитіло-незалежних АІЗ (або пацієнтів із незміненим чи «нормальним» спектром гліканів IgG), а значення, отримані для пулу зразків хворих із РС, знаходяться у популяції із антитіло-залежними АІЗ.

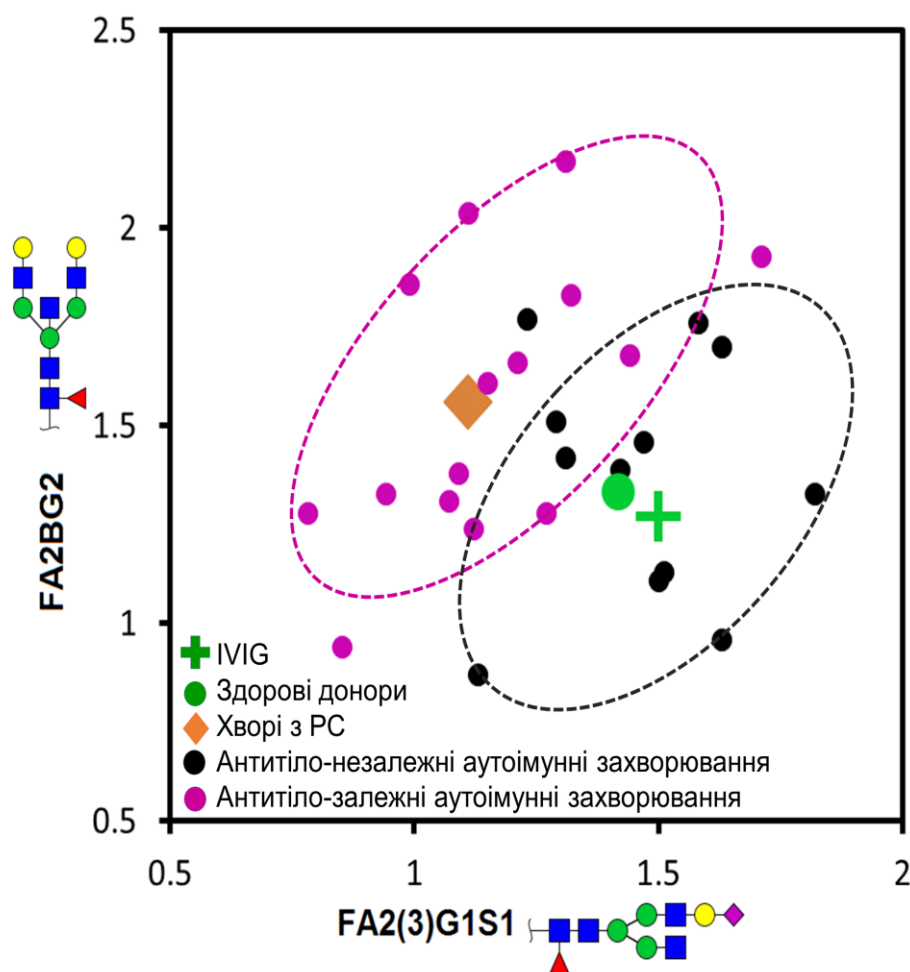


Рисунок 4.26 – Вміст сіалованого глікану FA2(3)G1S1 та бісектуючого глікану FA2BG2 у досліджуваних зразках імуноглобулінів. Аналіз методом КЕ-ЛФІ, розмірність осей – відсотки від загального вмісту гліканів. Пунктиром позначено популяції, утворені групами окремих зразків

Отримані дані свідчать, 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 раніше описане зростання зв'язування лектину LCA та, можливо, AAL.

4.4. Зміни гліканів імуноглобулінів у ЦСР та сироватці крові хворих на розсіяний склероз

Виявивши значну різницю у глікозилюванні імуноглобулінів у лікворі та сироватці крові пацієнтів із РС, ми вирішили дослідити наступне: чи зміна глікоформ у ЦСР є притаманною запальним процесам в загальному чи лише РС, чи можливо пов'язана із якимось загальними особливостями транспорту окремих глікоформ IgG із сироватки в ЦСР? Також, ми хотіли визначити чи спостережувані зміни стосуються якогось конкретного субкласу імуноглобулінів IgG (IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4), чи усіх субкласів загалом? А також визначити окремі глікоформи, які змінюються у складі між ЦСР та сироваткою.

Для відповідей на поставлені запитання нами було проведено дослідження у партнерстві з Університетською клінікою м. Ерланген, в рамках спільного наукового проекту та договорів про співпрацю. Для аналізу зразків використовували найбільш чутливий із відомих сьогодні методів детекції – рідинну хроматографію з іонізацією зразків електроспреем та мас-спектрометрією із використанням квадрупольного-час-польоту детектора (LC-ESI-MS) (Bruker Daltonics, Bremen). Дослідження проводили на парних зразках сироватки та ЦСР у 12 пацієнтів Університетської клініки, яким було поставлено діагноз «м'які когнітивні розлади» (mild cognitive impairment) без симптомів запалення чи хвороби Альцгеймера. Аналіз здійснювався на основі критеріїв National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) [193] та Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA) [194], включаючи рутинні тести крові, тести ЦСР на олігоклональні антитіла, МРТ голови, перфузійну SPECT (однофотонну емісійну комп'ютерну томографію) мозку та ряд нейрофізіологічних тестів за системою CERAD+ [195].

Для дослідження використовували розщеплення імуноглобулінів трипсином для отримання глікопептидів, які потім аналізувались методом LC-ESI-MS. Як відомо, склад амінокислотних залишків поблизу сайту глікозилювання Asn²⁹⁷ у імуноглобулінів класу IgG дещо різниться між різними субкласами імуноглобулінів (рис. 4.27). У такий спосіб, аналізуючи відповідні пептиди та їх глікозилювання, можна розрізнити глікозилювання окремих субкласів імуноглобулінів – IgG1, IgG2/3 та IgG4. Оскільки амінокислотний склад IgG2 та IgG3 є ідентичним в межах пептиду, утвореного трипсиновим розщепленням, наразі їх розрізнити технічно неможливо.

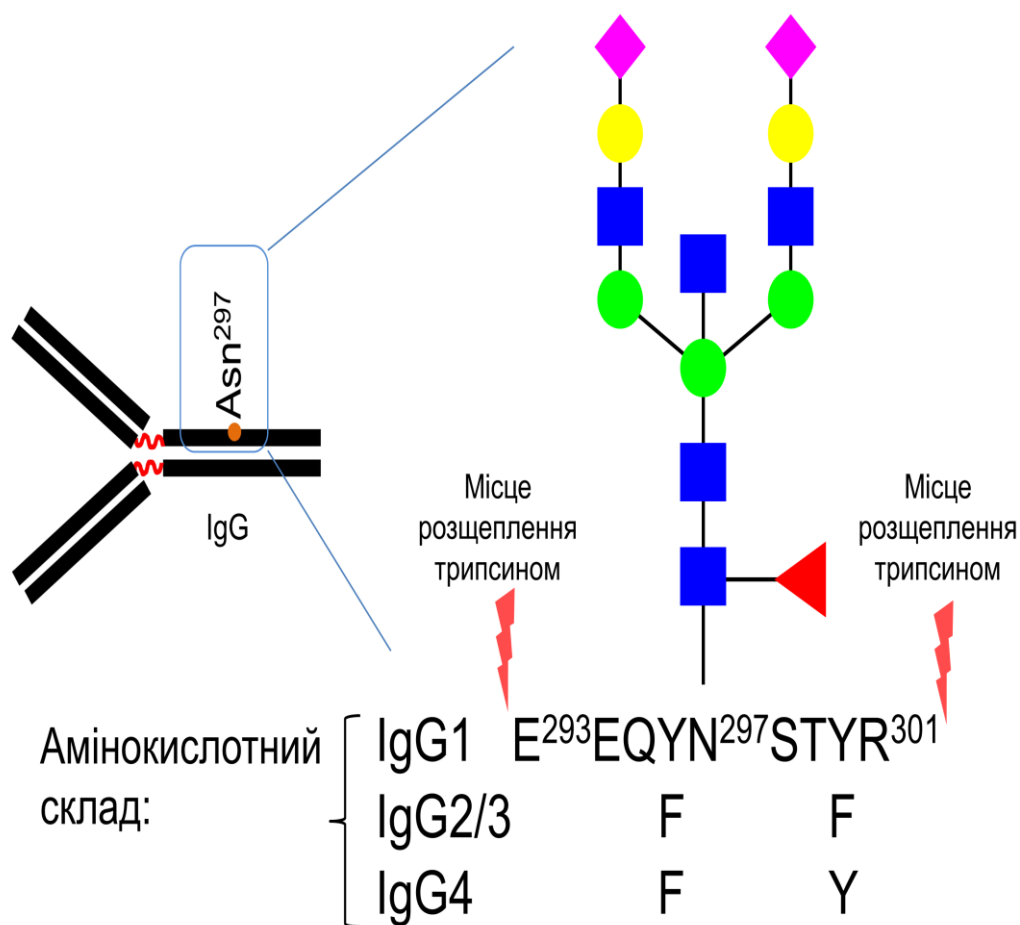


Рисунок 4.27 – Схематичне зображення розташування досліджуваних глікоформ на різних пептидних фрагментах різних класів імуноглобулінів, фрагменти утворені внаслідок розщеплення білка трипсином

У результаті аналізу отриманих пептидів було виявлено наступні глікоформи, представлені в табл. 4.1. У субкласів імуноглобулінів, вміст яких є

меншим, було виявлено меншу кількість глікопептидів, що обумовлено чутливістю методу. Усі зазначені глікопептиди піддавали аналізу щодо їх вмісту шляхом визначення інтегралів площ мас-спектрометричних піків, як це зазвичай прийнято при цьому типі аналізу.

Таблиця 4.1 – Глікоформи, що були ідентифіковані на глікопептидах субкласів імуноглобулінів

IgG1	IgG2/3	IgG4
H3*N4F1	H3N4F1	H3N4F1
H4N4F1	H4N4F1	H4N4F1
H5N4F1	H5N4F1	H5N4F1
H3N5F1	H3N5F1	H3N5F1
H4N5F1	H4N5F1	
H5N5F1	H5N5F1	
H4N4F1S1	H4N4F1S1	
H5N4F1S1	H5N4F1S1	H5N4F1S1
H4N5F1S1		
H5N5F1S1		
H5N4F1S2		
H3N4		
H4N4		
H5N4		
H4N5		
H5N5		

Аналіз вмісту глікоформ серед різних класів імуноглобулінів у зразках ЦСР та сироватки представлений на рис. 4.28 як відношення цих величин (ЦСР/сироватка). Отримані дані свідчать, що вміст глікоформ H3N3F1 є значно вищим у ЦСР для субкласів IgG1 та IgG2/3, вміст глікоформи H4N3F1 є вищим у ЦСР для IgG1 та IgG2/3, H5N5F1 є вищим у ЦСР для IgG2/3. Вміст глікоформи H4N4F1 також був вищим у ЦСР для IgG4. Також, у ЦСР спостерігалось достовірне зменшення вмісту наступних глікоформ: для IgG1 – H3N5F1, H4N4F1, H4N4F1S1, H4N5F1, H5N4, H5N4F1S1, H5N5F1; для IgG2/3 – H3N5F1, H4N4F1S1, H4N5F1, H5N4F1S1, для IgG4 – H5N4 та H5N5F1.

Оскільки співвідношення глікоформ для кожного субкласу імуноглобуліну є різним, а деякі глікоформи важко детектувати (наприклад, ди-сіаловані глікани розпадаються в процесі аналізу), ми проаналізували вміст окремих глікозильних

залишків у межах субкласів імуноглобулінів у ЦСР та сироватці крові обстежених. Для цього вміст кожної виявленої форми, що містили фукозильні залишки, галактозильні залишки, бісектуючі глікани та сіалільні залишки, поділили на суму усіх виявлених глікоформ в межах субкласу імуноглобулінів.

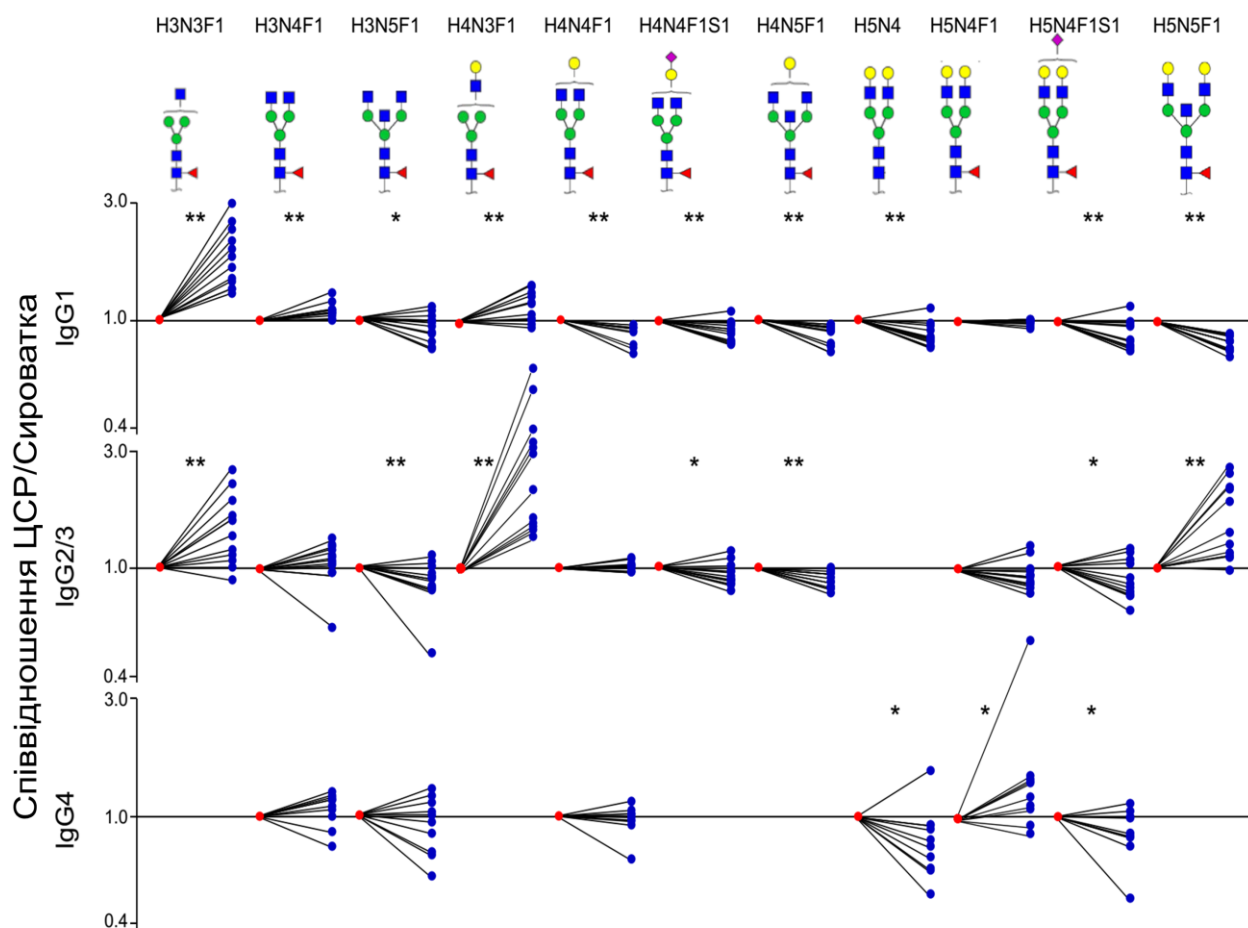


Рисунок 4.28 – Співвідношення вмісту окремих глікоформ у ЦСР та сироватці у різних субкласів імуноглобулінів. Вміст у ЦСР представлено синіми точками, у сироватці – червоними. Статистичний аналіз здійснено парним тестом Вілкоксона.

Аналіз сумарного вмісту бісектуючих залишків виявився статистично нижчим у ЦСР у порівнянні із значеннями у сироватці для усіх досліджуваних класів імуноглобулінів – IgG1, IgG2/3, IgG4 (рис. 4.29). Рівень галактозилювання був статистично нижчим з дуже незначними змінами у ЦСР в класі IgG. Аналогічні зміни спостерігались для змін сіалових кислот та для співвідношення вмісту сіалових кислот до галактозильних залишків. Зміни фукозилювання ми змогли визначити лише для субкласу імуноглобулінів IgG у зв'язку з обмеженою

кількістю детектованих глікопептидів, але достовірних змін у фукозилюванні виявлено не було (рис. 4.29).

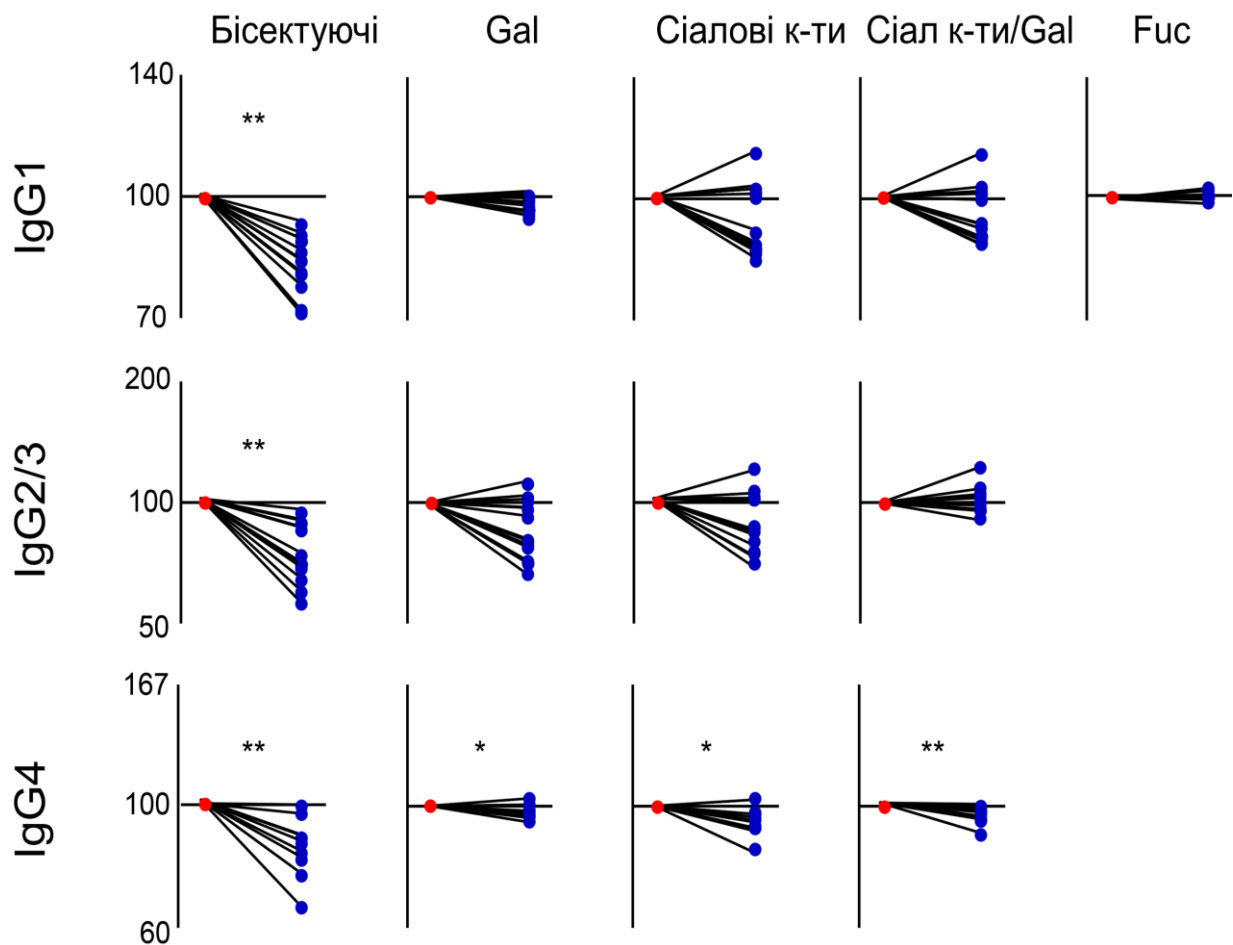


Рисунок 4.29 – Співвідношення глікозильних залишків, як співвідношення їх вмісту у ЦСР та сироватці крові. Вміст у ЦСР представлено синіми точками, у сироватці – червоними. Статистичний аналіз здійснено парним тестом Вілкоксона.

Зразки ЦСР та сироватки крові обстежених нами хворих на РС також досліджували на експонування сіалільних залишків на імуноглобулінах IgG. Як і в попередніх дослідженнях, ми спостерігали достовірне зменшення ($p < 0.001$) рівня експонування лектину SNA на молекулах IgG в ЦСР у порівнянні з молекулами IgG у сироватці (рис. 4.30).

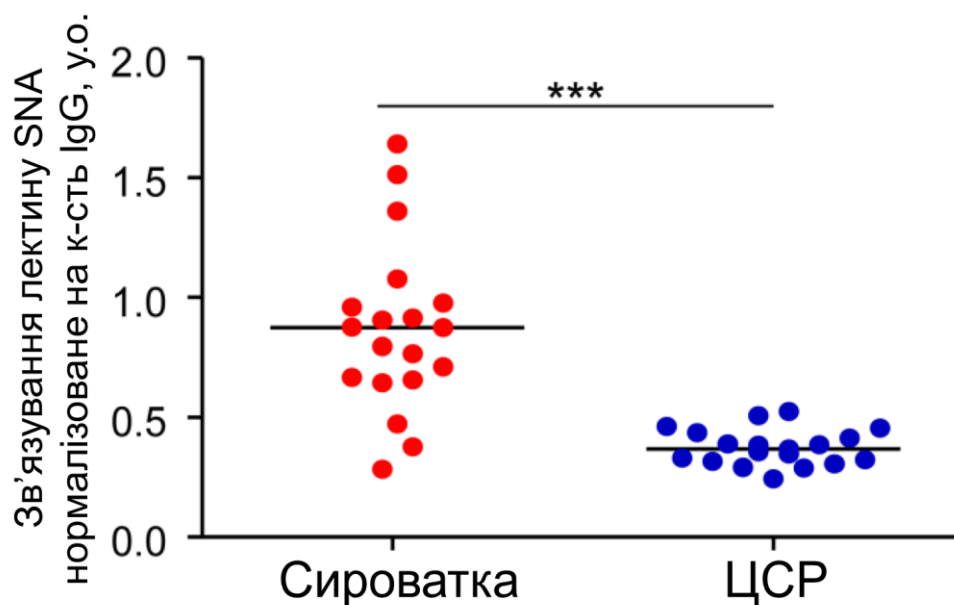


Рисунок 4.30 – Експонування лектину SNA на молекулах імуноглобулінів IgG досліджуваних сироваток та ЦСР

Щоб оцінити вплив імуноглобулінів на рівень експонування сіалільних залишків, нами було паралельно визначено вміст імуноглобулінів IgG та IgM у досліджуваних зразках.

Спостерігали достовірний позитивний зв'язок (кореляція за Спірманом) між рівнем експонування сіалільних залишків на молекулах IgG та їх вмістом (рис. 4.31А).

Ця залежність справджувалась як для ЦСР ($Rho = 0.761$, $p=0.00015$), так і для сироватки ($Rho = 0.641$, $p=0.00313$). Водночас, не спостерігали зв'язку між рівнем експонування сіалільних залишків на молекулах IgG та вмістом імуноглобулінів IgM (для сироватки – $Rho = 0.449$, $p=0.00002$; для ЦСР $Rho = -0.119$, $p=0.628$), що виключає утворення імунних комплексів чи можливість неспецифічних взаємодій (рис. 4.31Б).

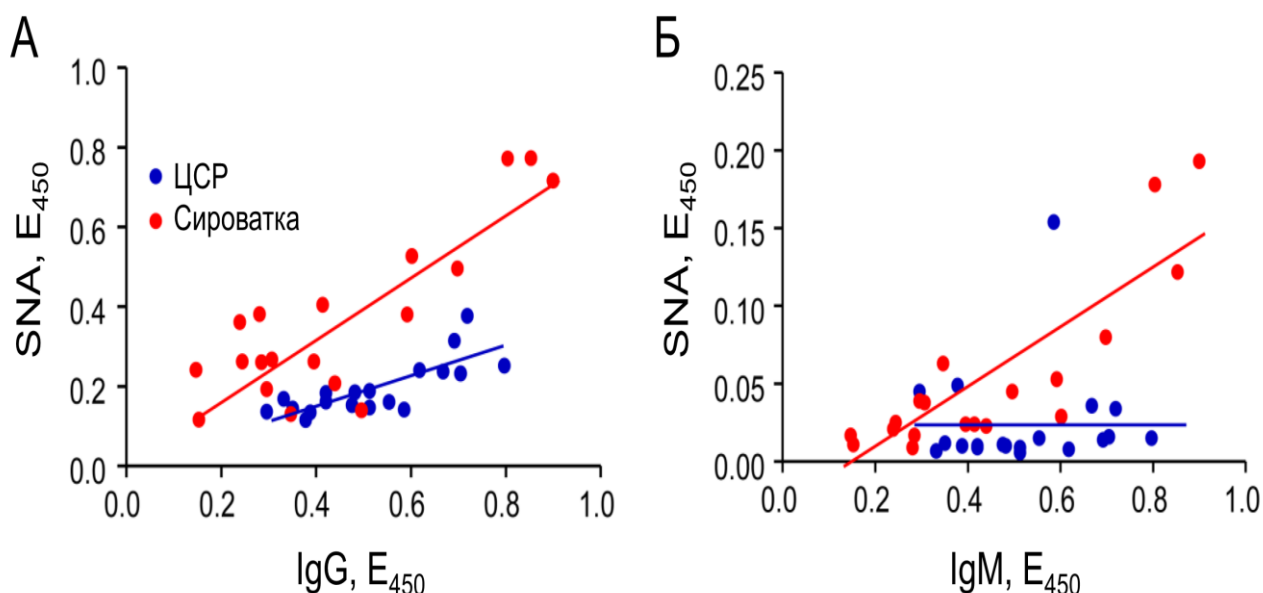


Рисунок 4.31 – Зростання експонування лектину SNA у сироватці крові в порівнянні з ЦСР є незалежним від вмісту IgM. А – Оптична густина (вміст) лігандів лектину SNA та імуноглобуліну IgG, визначена методами лектин-імуноферментного та імуноферментного аналізів відповідно. Кореляція між зазначеними величинами (за Спірманом) становить для сироватки – $Rho = 0.641$, $p=0.00313$; для ЦСР $Rho = 0.761$, $p=0.00015$. Б– Оптична густина (вміст) лігандів лектину SNA та імуноглобуліну IgM, визначена методами лектин-імуноферментного та імуноферментного аналізів відповідно. Кореляція між зазначеними величинами (за Спірманом) становить для сироватки – $Rho = 0.449$, $p=0.00002$; для ЦСР $Rho = -0.119$, $p=0.628$

Отже, проведений аналіз дозволив нам встановити, що: 1) зміни глікозилювання молекул IgG в ЦСР у порівнянні з такими молекулами в сироватці не залежать від того, чи захворювання носить запальний характер; 2) зміни глікозилювання відбуваються в усіх субкласах імуноглобулінів IgG; 3) встановлено окремі глікоформи, що зазнають змін в глікозилюванні ЦСР у порівнянні з сироваткою, наприклад, H3N3F1 та H4N3F1, та визначено тип цих змін (зменшення рівня бісектуючих гліканів та сіалових кислот у ЦСР).

Висновки до розділу 4

Виявили, що рівень експонування сіалованих залишків був вищим у сироватках крові хворих на РС та набагато нижчим у цереброспінальній рідині. З отриманих даних зробили висновок, що склад гліканів за рівнем сіалування суттєво різниться у сироватці крові та цереброспінальній рідині хворих на РС, а також про те, що в досліджуваному випадку спостерігаємо зміну експонування залишків сіалових кислот на біантенному N-глікані молекул імуноглобулінів.

Встановили, що в досліджуваних зразках ліквору та сироватках крові пацієнтів із РС відбуваються значні зміни експонування термінальних сіалових кислот та корових фукозильних залишків, які не є пов'язані із зміною кількості самих N-гліканів чи появою додаткових сайтів глікозилювання на молекулах імуноглобулінів.

Спостерігаються абсолютно відмінні спектри глікозилювання імуноглобулінів у сироватці та цереброспінальній рідині досліджуваних хворих із високим вмістом фукозильованих форм та підвищеним експонуванням частин фукозильованого триманозного кору, зменшенням рівня сіалованих форм гліканів імуноглобулінів у ЦСР.

Зафіксували, що зміни глікоформ імуноглобулінів при РС співпадають з такими ж змінами, раніше описаними для інших аутоімунних захворювань. При РС відбувається зростання вмісту бісектуючих форм гліканів, що пояснює раніше описане зростання зв'язування лектину LCA та, можливо, AAL.

Встановили, що зміни глікозилювання молекул IgG ЦСР у порівнянні з такими молекулами в сироватці крові обстежених не залежать від того, чи захворювання носить запальний характер.

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

Встановили, що окремі глікоформи, що зазнають змін в глікозилюванні ЦСР у порівнянні з сироваткою, наприклад, H3N3F1 та H4N3F1, та визначено тип цих змін (зменшення рівня бісектуючих гліканів та сіалових кислот у ЦСР). Таким чином, фукозильні залишки, підвищене експонування яких спостерігали при РС, зростали саме на аутологічних антитілах, зокрема, до ОБМ. Аналогічний

ефект виявлено для мішеней лектину LCA, які, як показано раніше, є бісектуючими N-гліканами.

Проаналізувавши історії хвороб пацієнтів із КІС та в дебюті РС, 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 цереброспінальній рідині у хворих на РС є більш чутливим методом для постановки достовірного діагнозу РС, порівняно з даними МРТ дослідження.

Результати власних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Magorivska I, Dönczö B, Dumych T, Karmash A, Boichuk M, Hychka K, 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;51:111–117.
2. Knopf J, Magorivska I, Maler JM, Spitzer P, Bilyy R, Biermann MHC, Hychka K, Bondt A, Wuhler M, Toes REM, Schett G, Herrmann M, Muñoz LE. Low amounts of bisecting glycans characterize cerebrospinal fluid-borne IgG. *J Neuroimmunol*. 2018;320:19-24.
3. Гичка КМ. Зміна глікозильних детермінант імуноглобулінів у хворих на розсіяний склероз як діагностичний маркер захворювання. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2020;16(1):22-29.
4. Гичка КМ, Негрич ТІ, Білий РО. Дослідження процесів глікозилювання антитіл у сироватці крові та цереброспінальній рідині хворих на розсіяний склероз як біомаркер при цьому захворюванні. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2020;16(3):22-29.

РОЗДІЛ 5

ОЦІНКА ДІАГНОСТИЧНО-ПРОГНОСТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЗМІН ГЛІКОЗИЛЮВАННЯ АУТОАНТИТІЛ ДО ОСНОВНОГО БІЛКА МІЄЛІНУ ПРИ РОЗСІЯНОМУ СКЛЕРОЗІ

5.1. Створення магнітних мікрокон'югатів на основі основного білка мієліну та їх використання для виділення аутоантитіл до ОБМ із сироватки крові хворих на розсіяний склероз

Детально дослідивши природу зміну глікозилювання антитіл при розсіяному склерозі, ми вирішили з'ясувати чи зміни у глікозилюванні антитіл, що спостерігались при РС притаманні усім типам антитіл сироватки, чи вони міняються на аутоантитілах, притаманних тільки цьому захворюванню. Оскільки РС є результатом демієлінізації внаслідок утворення аутоантитіл до компонентів ЦНС, але при цьому відомо багато мішеней, які атакуються даними аутоантитілами, ми обрали один з основних білків, що є мішенню атаки аутоантитілами та наступної демієлінізації – основний білок мієліну (ОБМ).

Для цього ми використали людський рекомбінантний ОБМ, який ковалентно кон'югували з магнітними мікрочастинками. Далі інкубували утворені мікрочастинки із зразками сироватки та розділяли зразки імуноглобулінів на ті, що зв'язались із ОБМ (специфічні анти-ОБМ антитіла), які в подальшому відділяли від мікрочастинок та досліджували, а також ті антитіла, що не зв'язались із ОБМ (далі – тотальні АТ сироватки). Схематично процес отримання специфічних анти-ОБМ антитіл представлено на рис. 5.1.

Основний білок мієліну є основним компонентом мієлінової оболонки олігодендроцитів та Шванівських клітин у нервовій системі. В роботі використовували людський рекомбінантний основний білок мієліну (Синтезований компанією Prospec Bio, Ізраїль, кат.но. Pro-1713), який являв собою єдиний, не глікозилюваний (для уникнення побічних взаємодій з летинами) поліпептид із 220 амінокислот (амінокислотні залишки 1-197 ОБМ) із молекулярною масою 23,9 кДА. Цей пептид був злитий з амінокислотою

послідовністю із 23 а.з. із His-міткою на N-кінці, що використовувалась для очистки білка. Білок було синтезовано за допомогою рекомбінантної технології в бактерії E.coli. Чистота білка становила понад 85% відсотків, як визначено виробником за допомогою поліакриламідного гел-електрофорезу. Амінокислотна послідовність використовуваного поліпептиду наступна:

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MGSMGNHAGK RELNAEKAST
NSETNRGESE KKRNLGELSR TTSEDNEVFG EADANQNNGT SSQDTAVTDS
KRTADPKNAW QDAH PADPGS RPHLIRLFSR DAPGREDNTF KDRPSEDEL
QTIQEDSAAT SESLDVMASQ KRPSQRHGSK YLATASTMDH ARHGFLPRHR
DTGILDSIGR FFGGDRGAPK RGSGKVSSEE

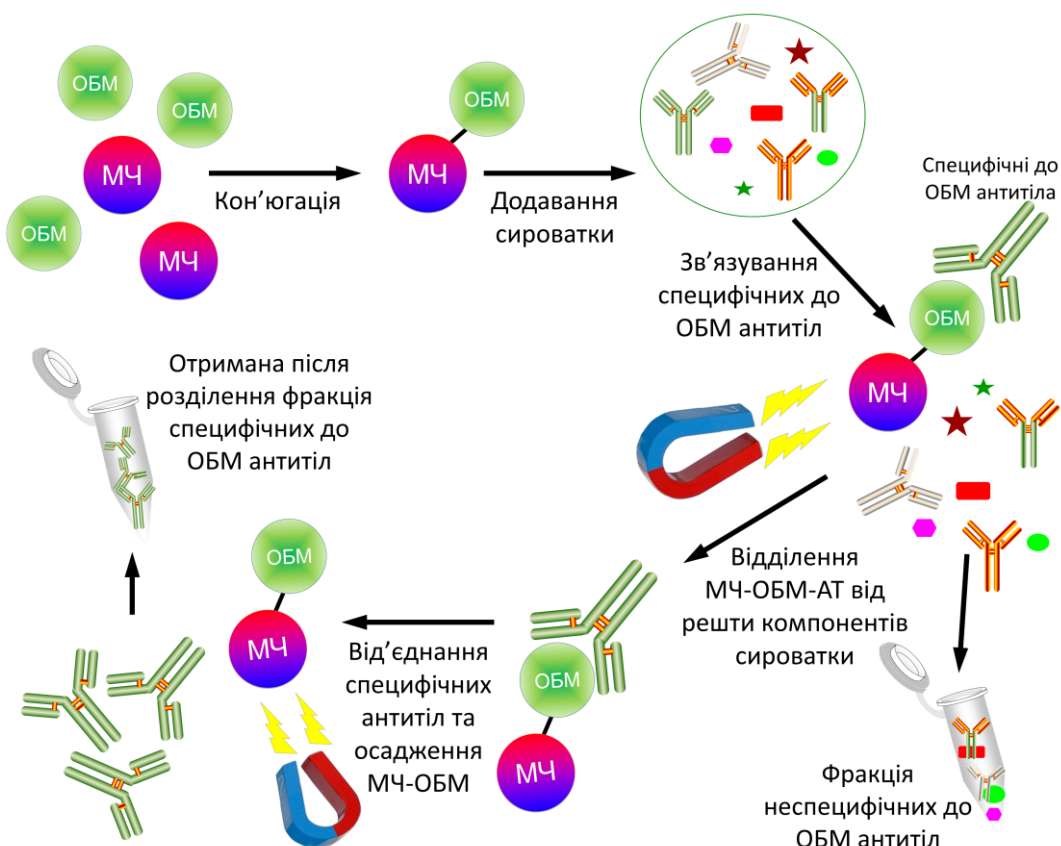


Рисунок 5.1 – Схема виділення специфічних анти-ОБМ антитіл із сироваток крові з використанням кон'югатів ОБМ-магнітні наночастинки. Деталі розділення описані в розділі Матеріали і Методи

Кон'югацію поліпептиду здійснювали з використанням мікрочастинок BioMagPlus (Pysciences, USA), вкритих оболонкою з карбоксильними групами, відповідно до протоколу виробника. Ковалентне приєднання поліпептиду до поверхні мікрономія дозволило запобігти втраті нечисленних антитіл. Визначивши ефективність кон'югації (шляхом оцінки кількості нанесеного та не прореагованого білка), показали, що з 1 мл суспензії мікрочастинок із вмістом частинок 20 мг, ковалентно приєднувалось 0,96 мг білка. Ці кон'югати очищались від компонентів реакції та використовувались для подальшого виділення аутоантитіл. Після інкубації сироватки з мікрочастинками виділяли зв'язану та незв'язану фракції, а кон'югати не регенерували та не використовували повторно (хоч це і рекомендовано виробником), щоб запобігти перехресному забрудненню зразків.

5.2. Визначення експонування глікозильних залишків на аутоантитілах до ОБМ та загальних антитілах сироватки крові хворих на РС залежно від клінічних особливостей захворювання та проведеної терапії

Зважаючи на той факт, що вміст антитіл залежить від стадії та типу лікування, періоду ремісії, тривалості захворювання, ми залучили в дослідження наступні групи пацієнтів із РС: здорові донори – 23 особи, первинні (неліковані) пацієнти – 17 осіб, пацієнти, які зазнавали терапії кортикостероїдами (захворювання перебувало в періоді загострення) – 12 осіб, пацієнти, які зазнавали терапії ІФН (стадія прогресування) - 15 осіб.

Усі зразки отримано за добровільної згоди пацієнтів, які перебували на комплексному амбулаторному або стаціонарному лікуванні на клінічній базі кафедри неврології (неврологічне відділення КЗ ЛОР Львівської обласної клінічної лікарні) у період з 2016 по 2019 рр.

Використовували зразки здорових осіб, (n=23) які були одноразовими донорами крові Львівського обласного центру служби крові.

При проведенні аналізу імунологічних показників детально вивчалися клінічні показники 44-ох хворих на РС віком від 21 до 61 року. Середній вік досліджуваних становив $38,5 \pm 1,37$ років. З поміж аналізованих хворих була 21 жінка (47,7%) та 23 чоловіки (52,3%). Згідно класифікації ВООЗ 17 (38,6%) чоловіків та 15 (34,1%) жінок - молодого віку, 6 (13,6%) чоловіків та 5 (11,4%) жінок були середнього віку, і один чоловік (2,3%) - похилого віку, що відображено на рис. 5.2.

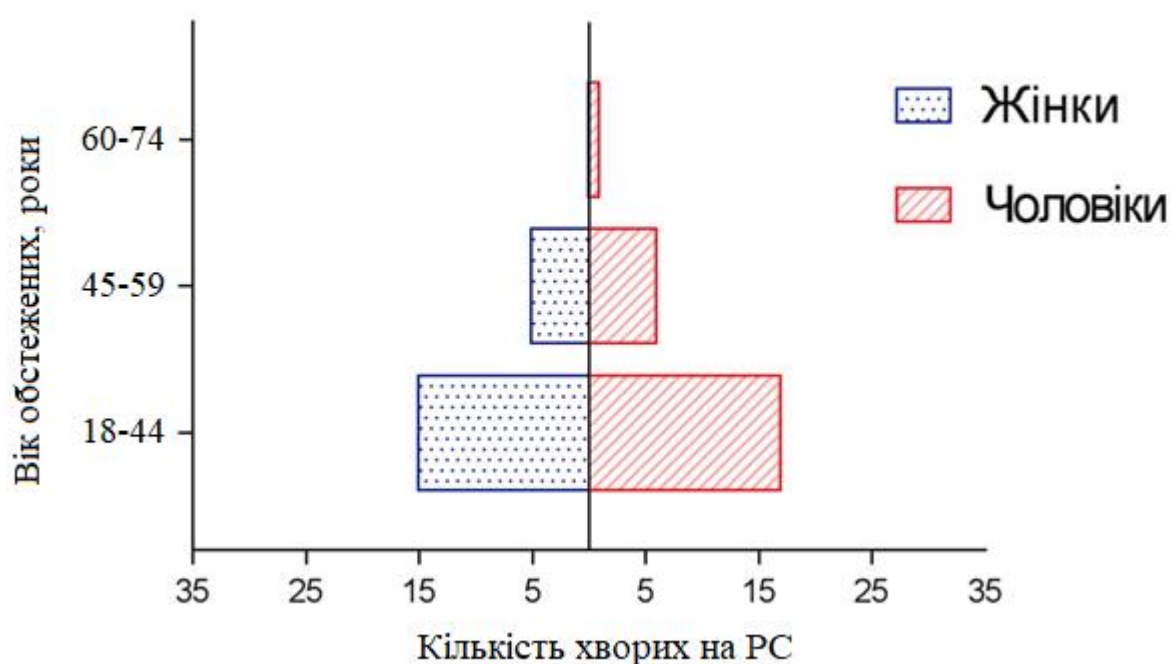


Рисунок 5.2 – Розподіл хворих на РС досліджуваної групи (n=44) за віком згідно класифікації ВООЗ

З'ясовано, що тривалість хвороби у цих пацієнтів перебувала в межах від 0 до 26 років, з середнім значенням $7,9 \pm 0,93$ роки. Тривалість захворювання до одного року була у двох чоловіків та одної жінки, від 1 до 5-ти років - 7 чоловіків та 10 жінок, тривалість захворювання від 6 – 10 років зафіксована у 6-ти чоловіків та 4-ох жінок, та понад 10 років було 10 чоловіків та 4 жінки, що відображено на рис. 5.3.

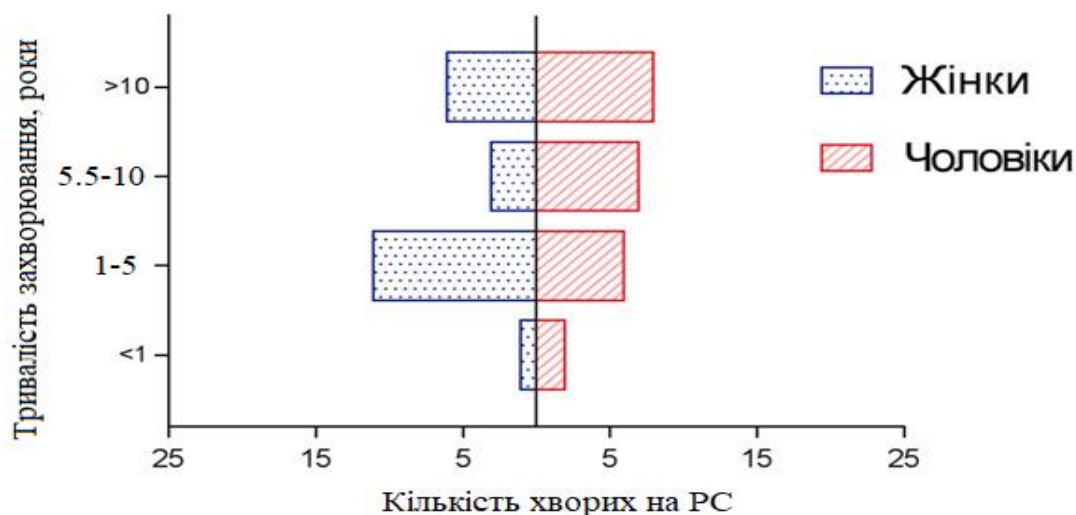


Рисунок 5.3 – Розподіл хворих на РС досліджуваної групи (n=44) за тривалістю захворювання

Бал EDSS в обстежених перебував у діапазоні від 1,5 до 7 балів, з середнім значенням $3,7 \pm 0,24$ бали. З поміж зазначених пацієнтів 27 (61,4%) мали бал EDSS в інтервалі від 1,0 до 3,5 балів, що відповідало легкому перебігу РС, 9 (20,4%) – в інтервалі від 4,0 до 5,5 балів, що відповідало середній тяжкості хвороби, а 8 (18,2%) пацієнтів - вище 6 балів, що відповідало тяжкому перебігу хвороби (рис. 5.4).

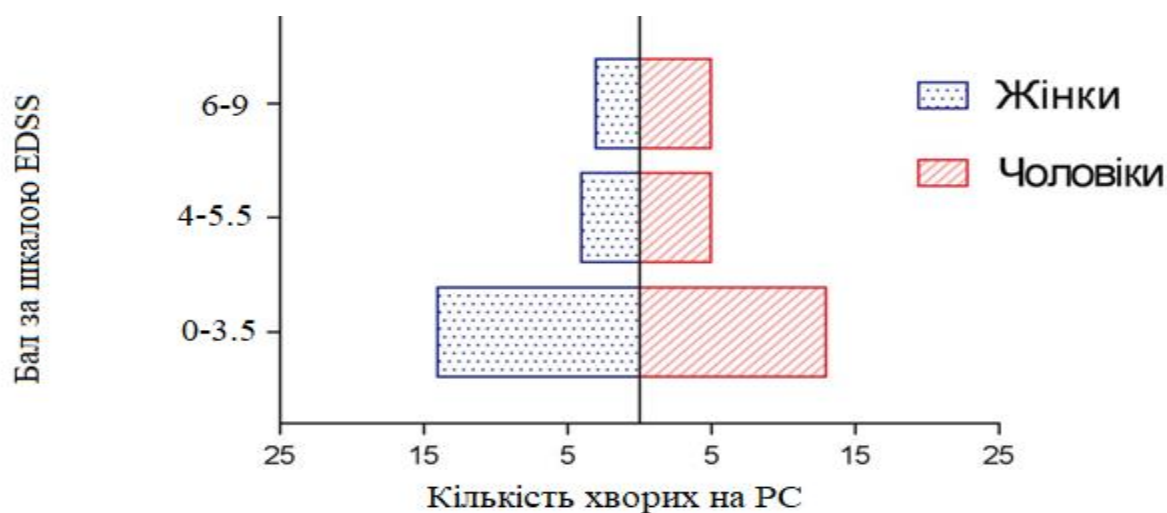


Рисунок 5.4 – Розподіл хворих на РС досліджуваної групи (n=44) за тяжкістю хвороби згідно балу шкали EDSS

У досліджуваній групі 17 пацієнтів (38,6%) були неліковані, 12 (27,3%) пацієнтів перебували в стадії загострення та приймали лікування солу-медролом, а 15 (34,1%) отримували лікування ІФН, що відображено на рис. 5.5.

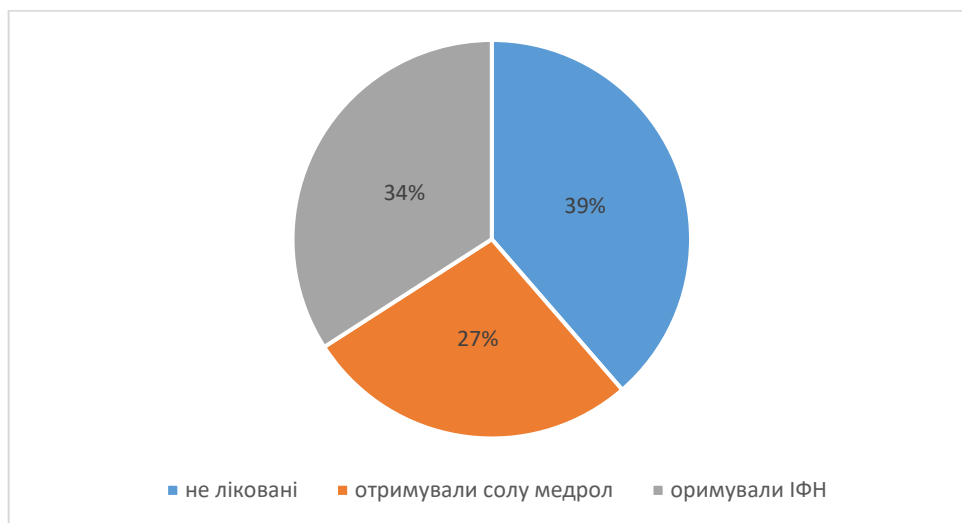


Рисунок 5.5 – Розподіл (%) пацієнтів досліджуваної групи (n=44) в залежності від отриманого лікування

Для усіх груп ми визначали експонування досліджуваних лектинів на імуноглобулінах сироватки крові, після чого проводили розділення імуноглобулінів на тотальні та специфічні та порівнювали експонування глікозильних залишків на антитілах тотальних та аутоантитілах, притаманних РС (рис. 5.6).

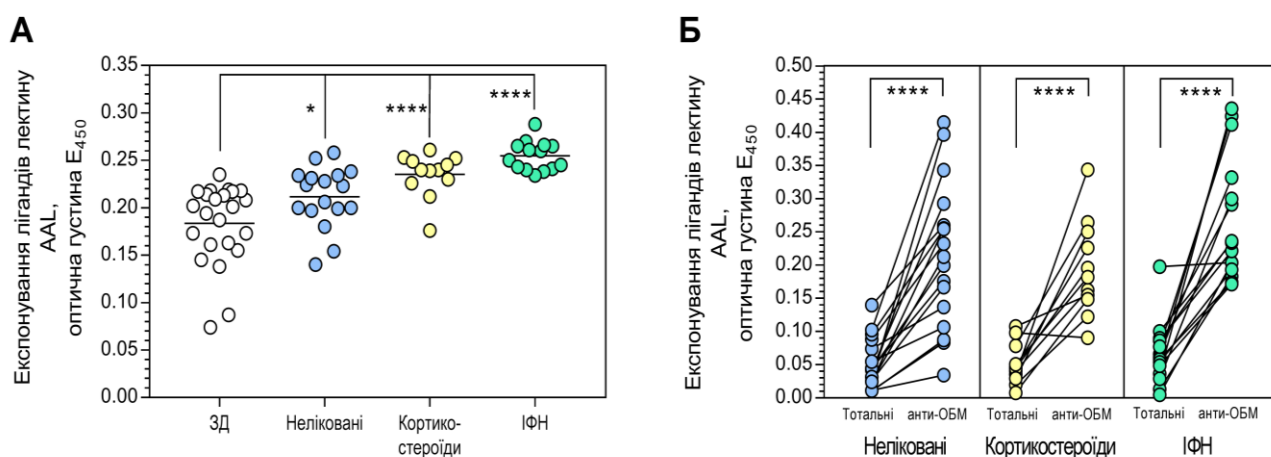


Рисунок 5.6 – Рівень зв'язування лектину AAL із фукозовмісними гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток (А) та препаратах анти-ОБМ антитіл та тотальних антитіл, виділених із сироваток крові хворих на РС (Б)

Лектин-імуноферментний аналіз показав достовірне зростання експонування гліканів – мішеней зв'язування лектину AAL на імуноглобулінах IgG пацієнтів із РС – нелікованих ($p < 0,01$) та тих, які лікувались кортикостероїдами ($p < 0,0001$) та ІФН ($p < 0,0001$) у порівнянні зі здоровими донорами (рис. 5.6А). Рівень лігандів лектину AAL зростав у групах хворих в наступній послідовності ЗД<первинно діагностовані> пацієнти в стадії загострення < пацієнти в стадії прогресування патологічного процесу. Зважаючи на той факт, що період півжиття імуноглобулінів IgG в організмі становить 18 днів, можна припустити, що імуноглобуліни як патологічний маркер запального процесу, яким виступає глікан - ліганд лектину AAL на молекулі IgG, накопичуються в організмі і можуть слугувати хорошим діагностичним фактором щодо тривалості хронічного запального процесу в ЦНС.

Щоб перевірити цю гіпотезу ми дослідили кореляційний зв'язок між рівнем експонування лектину AAL на тотальних IgG сироватки пацієнтів та тривалістю захворювання, вираженого в роках (Рис. 5.7).

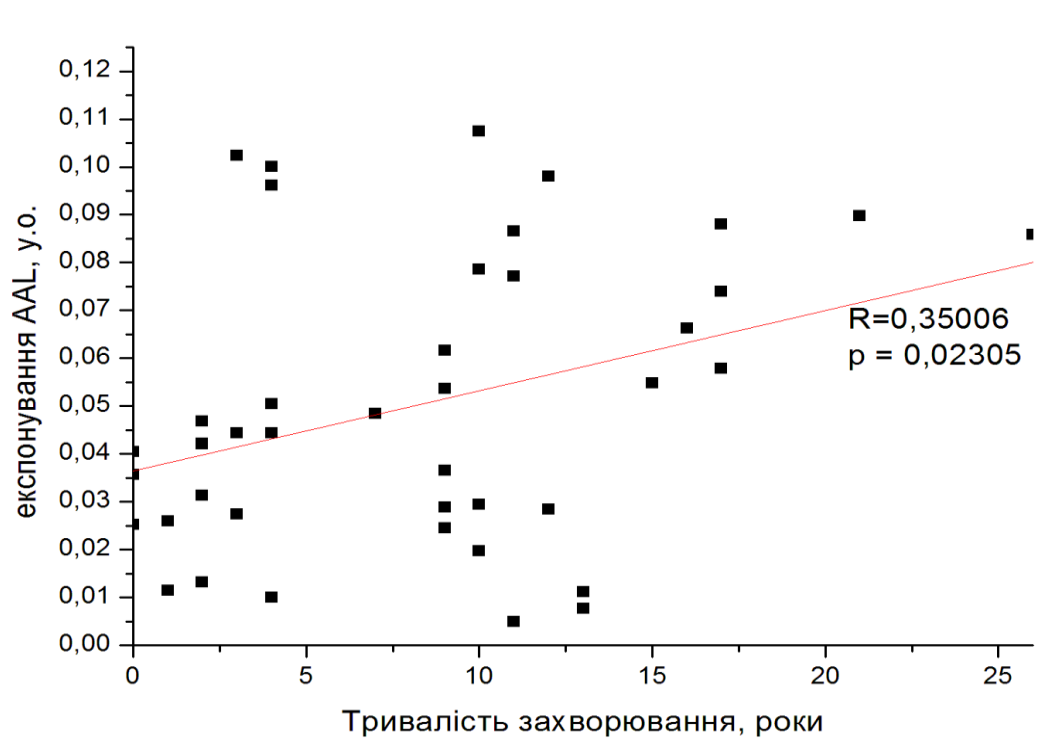


Рисунок 5.7 – Кореляційний зв'язок між рівнем експонування лектину AAL на антитілах IgG сироватки крові хворих на РС та тривалістю захворювання в роках для груп пацієнтів з первинним діагнозом (не ліковані), в гострій (кортикостероїди) та прогресуючій (ІФН) фазах захворювання

Ми встановили достовірний позитивний зв'язок середньої сили між двома досліджуваними величинами, $R = 0.350$, $p = 0.023$. Таким чином, досліджуваний показник може слугувати показником тривалості, активності та прогресування захворювання і накопичення в організмі імуноглобулінів із зміненим «прозапальним» спектром гліканів, що важливо для визначення початку захворювання на РС.

Виділення фракцій анти-ОБМ та тотальних антитіл усіх груп пацієнтів (у здорових донорів немає антитіл до ОБМ) та наступне порівняння експонування мішеней лектину на тотальних імуноглобулінах та специфічних анти-ОБМ антитілах показав достовірно збільшене експонування мішеней лектину AAL саме на анти-ОБМ імуноглобулінах IgG, а не на тотальних імуноглобулінах сироватки (рис. 5.6Б). Ця залежність спостерігалась як для первинних пацієнтів ($p < 0.0001$), так і тих, які зазнавали терапії кортикостероїдами ($p < 0.0001$) та ІФН ($p < 0.0001$).

Таким чином, саме патологічні аутоантитіла несуть змінений спектр глікозилування, зокрема, експонування фукозильних залишків кору N-глікану, що виявляється лектином AAL.

Аналіз зв'язування лектину LCA із імуноглобулінами сироватки досліджуваних груп показав достовірно вище зростання у групі пацієнтів, які отримували терапію ІФН, у порівнянні зі здоровими донорами ($p < 0.01$). У нелікованих пацієнтів цей рівень був дещо (і недостовірно) нижчим, а в пацієнтів на терапії кортикостероїдами – у деяких пацієнтів спостерігалось збільшення зв'язування, в інших – навпаки, зменшення. Загалом показники групи були такими ж як середні значення для здорових донорів (рис. 5.8А). Зростання рівня лектину LCA було достовірним лише у пацієнтів із тривалою формою хвороби, за якої призначали терапію ІФН. Це може свідчити як про вплив терапії на синтез даних глікоформ, так і про можливість накопичення лише при хронічній формі захворювання, що потребує подальших досліджень.

Аналіз зв'язування лектину LCA із специфічними для РС аутоантитілами до ОБМ та тотальними антитілами показав достовірну різницю у зв'язуванні із переважанням зв'язування лектину LCA специфічними антитілами до ОБМ (в

усіх досліджуваних групах – нелікованих пацієнтів, пацієнтів із терапією кортикостероїдами та ІФН різниця була достовірною і становила $p < 0.001$) (рис. 5.8Б).

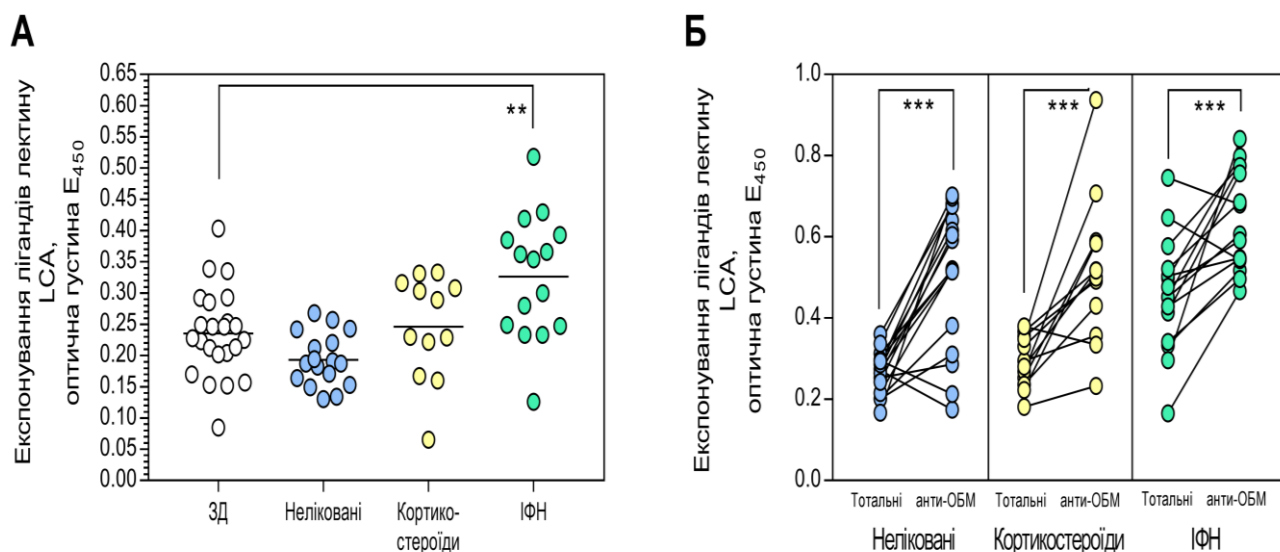


Рисунок 5.8 – Рівень зв’язування лектину LCA із гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток (А) та препаратах анти-ОБМ антитіл та тотальних антитіл, виділених із сироваток крові хворих на РС (Б)

Аналіз зв’язування сіалоспецифічного лектину SNA із імуноглобулінами сироватки досліджуваних груп показав достовірно вище зростання у групі пацієнтів з терапією ІФН ($p < 0.0001$) та терапією кортикостероїдами ($p < 0.001$) у порівнянні із здоровими донорами, у нелікованих пацієнтів цей рівень не відрізнявся від такого для здорових донорів (рис. 5.9 А).

Аналіз зв’язування лектину SNA із специфічними для РС аутоантитілами до ОБМ та тотальними антитілами показав достовірну різницю у зв’язуванні із переважанням зв’язування лектину SNA тотальними антитілами (тобто анти-ОБМ антитіла виявляли менший рівень зв’язування). Різниця була достовірною для груп нелікованих пацієнтів ($p < 0.01$) та пацієнтів на терапії кортикостероїдами ($p < 0.001$) (рис. 5.9Б).

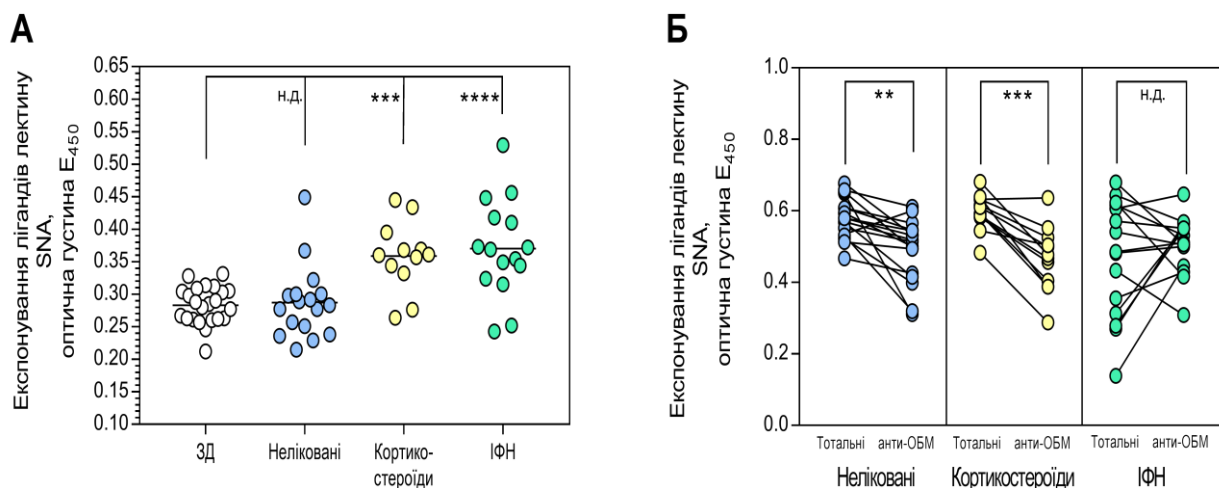


Рисунок 5.9 – Рівень зв’язування лектину SNA із сіаловмісними гліканами імуноглобулінів IgG у зразках досліджуваних сироваток (А) та препаратах анти-ОБМ антитіл та тотальних антитіл, виділених із сироваток крові хворих на РС (Б)

Таким чином, фукозильні залишки, підвищене експонування яких спостерігали при РС, зростали саме на аутологічних антитілах, зокрема, до ОБМ. Аналогічний ефект виявлено для мішеней лектину LCA, які, як показано раніше, є бісектуючими N-гліканами. Водночас, хоч у тотальних фракціях антитіл спостерігалось зростання вмісту залишків сіалових кислот (що надає їм антизапальних властивостей), аутоантитіла до ОБМ містили дуже мало сіалових кислот, тобто володіли прозапальними властивостями. Виявлення таких аутоантитіл із прозапальними глікановими залишками може стати потенційним діагностичним маркером захворювання. Водночас, зростання сіалування у тотальних фракціях імуноглобулінів, є можливим результатом компенсаційних реакцій організму.

Отже, саме аутоантитіла, притаманні РС, зокрема, досліджувані анти-ОБМ антитіла, володіють зміненим спектром глікозилювання. Ці патологічні антитіла виявляли прозапальні властивості, пов’язані із збільшеним фукозилюванням та зменшеним сіалуванням у складі гліканів IgG.

Висновки до розділу 5

Виявили, що зміна глікозилювання антитіл сироватки хворих, що спостерігалась у групах пацієнтів з РС, як нелікованих, так і тих, що зазнавали терапії кортикостероїдами чи ІФН, відбувалась внаслідок появи патологічних аутоантитіл.

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

Підтвердили, що глікан - ліганд лектину AAL на молекулі IgG може слугувати показником тривалості, активності та прогресування захворювання і накопичення в організмі імуноглобулінів із зміненим «прозапальним» спектром гліканів, що важливо для визначення початку захворювання на РС.

Клінічно підтвердили, що процес глікозилювання імуноглобулінів проявляється підвищенням активності захворювання та корелює із збільшенням тривалості хронічного запального процесу при цьому захворюванні.

Таким чином, дослідження процесів глікозилювання антитіл у цереброспінальній рідині та сироватці крові хворих на РС є надзвичайно важливим як з позиції розгляду їх як ключової ланки в патогенезі захворювання, так і як надійного біомаркера цього патологічного стану.

Результати власних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Гичка КМ, Бойчук МО, Думич ТІ, Парижак СЯ, Білий РО, Негрич ТІ. Оцінка впливу терапії інтерфероном β -1b на рівень та патологічну природу імуноглобулінів IgG у хворих на розсіяний склероз. Запорозький медичний журнал. 2018;(6):762-767.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

За сучасними уявленнями РС - хронічне прогресуюче захворювання центральної нервової системи, пов'язане з аутоімунними механізмами, що ініціюють багатовогнищеве демієлінізуюче ураження головного та спинного мозку, дегенерацію структур ЦНС і часто призводить до інвалідизації [196].

РС є найбільш відомим і розповсюдженим по всій земній кулі демієлінізуючим захворюванням нервової системи. У світі нараховується більше 3 млн. хворих на РС, в Україні зареєстровано понад 20 тис. хворих на РС. При цьому, в останні десятиліття спостерігається стабільна тенденція до зростання розповсюдженості РС в Україні (більше, ніж у 2,5 рази за останні роки) і світі, яка демонструє, що й досі залишаються недостатньо зрозумілими багато аспектів цієї патології [197, 198, 199]. Так, поширеність РС в Україні щороку збільшується на 1000-1200 хворих. Серед неврологічних захворювань з ураженням ЦНС за поширеністю РС посідає 4 місце після церебрального інсульту, епілепсії та паркінсонізму, і входить до числа так званих «чотирьох вершників неврологічного апокаліпсису» за своїми медичними і соціальними наслідками. Якщо врахувати економічні збитки від РС – то він посідає одне з чільних місць навіть у вище зазначеній четвірці, бо витрати на це захворювання на рік у провідних країнах Європи сягають 1,2 млрд фунтів стерлінгів (Велика Британія) [200], а в США - 9,7 млрд. доларів [201, 202], з яких до 65 % припадає на безпосередню медичну допомогу та забезпечення медикаментами, а біля 30% - на соціальну допомогу. У загальному плані розсіяний склероз призводить до великих матеріальних затрат і належить до соціальних захворювань [203].

Коморбідність, за даними сучасних досліджень, призводить до взаємного обтяження захворювань, сприяє погіршенню загального стану хворих і формуванню несприятливого прогнозу [204-208]. У разі коморбідності РС із низкою захворювань та станів також має місце проблема зменшення ефективності курабельності та наростання темпів прогресування, що вимагає більш глибокого вивчення аспектів впливу супутньої патології на патогенез і

перебіг РС, обов'язкового її врахування при діагностиці і комплексному лікуванні цього захворювання [209, 210, 211]. Наразі припускається, що в генезі поглиблення нейродегенеративних змін при РС можуть брати участь порушення, спричинені коморбідними захворюваннями, больовими синдромами, психоемоційними розладами, порушеннями сну незалежно від наявності патологічної аутоімунної демієлінізації [23, 26, 143, 212, 213]. Тому, є доцільним і актуальним проведення подальшого аналізу особливостей клінічного перебігу розсіяного склерозу з урахуванням коморбідної патології, дослідження поширеності та структури коморбідної патології у хворих із РС, визначення зв'язку між віком на момент виникнення супутнього захворювання, оскільки це дає змогу покращити діагностику і оптимізувати лікування розсіяного склерозу [214, 215, 216, 217, 218, 219].

Патогенез РС, незважаючи на значні досягнення у його вивченні, залишається до кінця не з'ясованим [220]. Одним з основних компонентів патогенезу РС є аутоімунне запалення. Виникає активація Т-лімфоцитів під впливом провокуючих факторів. Потім імунні клітини проникають через гемато-енцефалічний бар'єр (ГЕБ), де запускають складний механізм запальних реакцій, в основному за участю Т-хелперів 1-го типу, що веде до демієлінізації нервових волокон та пошкодження аксонів [221].

Активовані Т-клітини, макрофаги та мікроглія продукують прозапальні цитокіни: інтерферон- γ , фактор некрозу пухлини- α , лімфотоксин, які також сприяють розвитку запальних реакцій. Підвищення рівня запальних медіаторів (цитокінів, активних форм кисню, ейкозаноїдів) веде до загибелі мікросередовища. Потім здійснюється пошкодження гемато-енцефалічного бар'єру та вторинне проникнення запальних клітин у центральну нервову систему. На даному етапі, мікроглії належить головна роль у формуванні імунної відповіді у ЦНС [222]. Ураження мієліну та олігодендроцитів виникає у результаті біохімічних та імунологічних розладів. На наступних етапах патологічного процесу активуються неспецифічні механізми: фагоцитоз пошкоджених структур та проліферація гліальних елементів [223].

Прогноз останніх років показав, що не лише здатність антитіл розпізнавати антиген визначає його роль в організмі. Антитіло зв'язує антиген ділянкою Fab. Там гліканів немає, але саме зв'язування антигену нічого не дає. Антитіло зв'язується іншою ефекторною Fc ділянкою з клітинами, що забезпечують відповідь на антиген. Тобто антитіло – це проміжна ланка між антигеном і клітиною, яка забезпечує на нього відповідь. Це має вирішальну роль у кінцевій імунній відповіді, яку це антитіло буде відігравати. І ця роль зумовлюється глікановою компонентою антитіл, яка міняє конфігурацію молекули та спорідненість до про- та антизапальних рецепторів, як це описано в огляді літератури.

Здобутки останніх років показали, що коли в патологічних аутоантитіл, які виявлялись в мишачих експериментальних моделях ревматоїдного артриту, змінити глікозильні залишки, то прозапальний вплив цих антитіл нівелюється [224]. Також було розроблено методології щодо такого контрольованого таргетного пост-синтетичного глікозилювання імуноглобулінів [225]. Це один із прикладів таргетної терапії, за якою багато вчених вбачає майбутнє у лікуванні аутоімунних захворювань.

Останнє десятиріччя характеризувалось введенням у клінічну практику значної кількості нових препаратів та методів патогенетичного лікування РС, які показали перспективи позитивного впливу на його перебіг [9, 226, 227, 228]. Водночас, найбільш значущими визнані питання чіткої організації спеціалізованої допомоги хворим на РС, розширення механізмів керування захворюванням, в тому числі, створення ефективної системи виявлення хворих, його профілактика та попередження прогресування, лікування коморбідних захворювань. Все це є істотним резервом збільшення ефективності лікування, запобігання інвалідизації хворих та збереження їх спроможності до самообслуговування [206, 229].

Широке використання моноклональних антитіл у лікуванні РС привернуло увагу до цієї проблеми. Виявляється, що не лише білкова компонента, а й правильне глікозилювання молекули антитіл потрібні для реалізації її функцій. На практиці це означає, що моноклональне антитіло з

правильним глікозилюванням чинитиме такий же ефект, як 50-100 кратна кількість моноклональних терапевтичних антитіл без глікозильного залишку [225]. Це означає, що пацієнту можна вводити у 100 разів менше препаратів моноклональних антитіл. Це, окрім різних економічних переваг, означатиме набагато менший імуносупресивний вплив, хоча б через менше розведення пулу природних антитіл сироватки крові штучно введеними, адже останні не захищають від набутих інфекцій та нівелюють імунологічну пам'ять пацієнта.

Таким чином, РС є однією з найбільш актуальних дискусійних проблем сучасної неврології. Дослідження нових патогенетичних механізмів розвитку цього захворювання, впливу коморбідної патології на його клінічний перебіг, ефективності хворобо-модифікуючої терапії має наукове та практичне значення і є перспективним для розробки обґрунтованих рекомендацій.

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі неврології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та у Львівському обласному науковому центрі з вивчення проблем розсіяного склерозу та інших демієлінізуючих захворювань, що знаходиться на базі неврологічного відділення КЗ ЛОР «ЛОКЛ». Експериментальні дослідження сироватки крові та церебро-спінальної рідини (імунобіологічні дослідження) проводилися на кафедрі гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, у відповідності до підписаної угоди про науково-медичну співпрацю.

Організація дослідження ґрунтувалася на положеннях Гельсінської декларації. Комісією з питань біомедичної етики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол №5 від 23 лютого 2017 р.) встановлено, що це наукове дослідження відповідає етичним та морально-правовим вимогам згідно з наказом МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. Від усіх учасників дослідження було отримано добровільну письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

Науковий пошук проводили у декількох напрямках, що у структурі роботи відображено відповідними розділами, в яких представили результати клінічних та імунологічних досліджень.

Мета роботи полягала у оптимізації прогнозування перебігу РС із урахуванням коморбідної патології; розробці нових критеріїв діагностики РС на основі змін глікозильних детермінант імуноглобулінів класу Ig-G у сироватці крові та цереброспінальній рідині хворих на розсіяний склероз.

План дисертаційної роботи складався з трьох етапів, які були розроблені з використанням системного підходу відповідно до поставленої мети та завдань.

На першому етапі власних досліджень вивчали структуру та поширеність коморбідної патології у обстежених хворих різної статі та її вплив на клінічний перебіг цього захворювання.

При коморбідності РС з іншими захворюваннями потрібно врахувати, що утруднюється діагностика цього захворювання, відтерміновується час до постановки достовірного діагнозу [230]. У таких пацієнтів значно знижується якість життя, підвищується рівень смертності [230]. Все це вимагає більш глибокого вивчення аспектів впливу супутньої патології на перебіг РС, як і аналіз її частоти. Тому надзвичайно актуальним є проведення досліджень щодо з'ясування впливу супутньої патології на клінічний перебіг РС.

Для вирішення поставленого на першому етапі власних досліджень завдання обстежили 77 хворих на РС з достовірно підтвердженим діагнозом згідно критеріїв МакДональда 2010 року, у яких було документально підтверджено в амбулаторній карті або історії хвороби наявність супутньої патології.

У цій групі виявили 16 класів коморбідних захворювань згідно МКХ-10. Водночас, було діагностовано 133 коморбідні нозології, в середньому у одного хворого - $1,73 \pm 0,14$ супутнього захворювання.

Аналіз клінічних особливостей у пацієнтів із супутньою патологією, виявив низку закономірностей. При аналізі поширеності класів коморбідних захворювань за МКХ-10 у оглянутих нами хворих на РС найбільший рівень захворюваності складали хвороби органів травлення (K00-K93). Цей показник статистично значущо був вищим порівняно з поширеністю інших класів хвороб ($p < 0,05$). Отримані дані узгоджуються з даними Г.Чуприни в його дослідженні гастроентерологічна коморбідність була виявлена у 26,2% хворих [196].

Поширеними виявилися також хвороби кістково-м'язової системи та сполучної тканини ($p < 0,05$), що підтверджується даними літератури [231].

Найнижчі ($p < 0,05$) рівні захворюваності виявили для п'яти класів хвороб:

- 1) інфекційні й паразитарні хвороби;
- 2) хвороби крові та кровотворних органів і окремі порушення із залученням імунного механізму;
- 3) психічні розлади і розлади поведінки;
- 4) хвороби ока та його придаткового апарату;
- 5) хвороби шкіри і підшкірної клітковини.

У чоловіків найчастіше спостерігали захворювання органів травлення Цей показник статистично значущо ($p < 0,05$) був вищим порівняно з показниками інших класів хвороб. Найрідше серед хворих на розсіяний склероз чоловіків відзначали інфекційні захворювання, хвороби ока та його придаткового апарату, вуха і соскоподібного відростка.

У жінок, хворих на розсіяний склероз, частіше виявляли хвороби кістково-м'язової системи та сполучної тканини. Частка захворювань цього класу була статистично значущо ($p < 0,05$) більшою порівняно з показниками захворювань інших класів. Найрідше у жінок із розсіяним склерозом виявляли хвороби крові, психічні розлади та хвороби шкіри і підшкірної клітковини. Жодного випадку інфекційних хвороб, хвороб ока та його придаткового апарату, травм не виявлено.

У оглянутих нами хворих на РС було діагностовано 61 вид нозологій: 26 у чоловіків та 48 у жінок. Провели детальний аналіз нозологій, які поєднувалися з РС.

При аналізі поширеності коморбідних захворювань у хворих на розсіяний склероз остеохондроз діагностували статистично значущо ($p < 0,05$) частіше, ніж решту коморбідних нозологій. Виявлена закономірність підтверджується низкою наукових праць (М.М. Спирін, Є.Г. Безніско, Н.А. Маренічев опублікували окремим розділом в монографії Гусєва Е., Завалішина І., Бойко А. «Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания», R.Brain, M. Wilkinson і D. Oppenheimer.

Друге місце за поширеністю посідав гастродуоденіт. Значний сегмент супутньої патології при РС відноситься до гастро-ентерологічної коморбідності, що може мати негативне відображення на перебіг основного патологічного процесу у хворих на РС [232, 233, 234, 235]. Статистично значущих гендерних відмінностей щодо рівня захворюваності гастро-ентерологічної патології у оглянутих нами хворих не виявлено.

До онкологічних захворювань ми відносили нозології з класу новоутворень (C00-D48) та окремі захворювання, що належали до інших класів, проте мали в основі доброякісний або злоякісний ріст. Діагностовано 34 (25,56 % від усіх коморбідних захворювань, $n = 133$) онкологічних захворювання з поширеністю у середньому 44,16 випадки на 100 пацієнтів. У жінок виявлено 25 випадків ($p < 0,01$), у чоловіків — 9 випадків.

З онкологічних захворювань у чоловіків найчастіше діагностували кісту гайморової пазухи. У жінок із РС частіше виявляли лейоміому матки, ніж інші нозологічні одиниці.

У огляді R. A. Marrie, et al., 2015 [60], де проаналізували дані 38 досліджень щодо захворюваності та поширеності раку різної локалізації у загальній популяції та у популяції хворих на РС, повідомляється, що, загалом, незалежно від локалізації, ризик раку був меншим при РС, ніж у загальній популяції. З урахуванням локалізації раку, у загальній популяції спостерігається найвищий ризик щодо раку шийки матки, грудей та системи травлення, тоді як у популяції хворих на РС відзначається найвищий ризик щодо менінгіоми та раку сечостатевої системи [60]. Дослідники повідомляють, що серед факторів ризику, що призводять до розвитку раку у хворих на РС, слід віддати перевагу таким, як куріння, обмеження фізичної активності, спосіб харчування та вплив імунодепресивних лікарських препаратів [60]. Важливим висновком цього дослідження було те, що у хворих на РС може спостерігатися затримка діагностики раку, яка призводить до виявлення більш поширеного і часто вже неоперабельного раку [60].

Для оцінки впливу супутніх захворювань на перебіг РС порівнювали групи пацієнтів, у яких коморбідна патологія виникла до та відповідно після дебюту

РС. Переважну більшість ($p<0,01$) випадків виникнення коморбідного захворювання було відзначено після дебюту РС.

Виявили достовірні відмінності між віком на момент дебюту РС ($p<0,05$), віком на момент виникнення супутнього захворювання ($p<0,05$), тривалістю РС ($p<0,01$), тривалістю коморбідного захворювання ($p<0,01$) поміж пацієнтами, у яких коморбідна патологія виникла до дебюту РС та пацієнтами, у яких супутнє захворювання констатовано через певний час після появи перших симптомів цього захворювання. Ця інформація узгоджується з даними літератури [22, 23].

На наш погляд, вказані відмінності обумовлені, передовсім, поділом на аналізовані підгрупи, оскільки природно, що у випадку появи коморбідної нозології до дебюту РС, її перебіг буде тривалішим порівняно з терміном патології, що виникла після перших проявів РС. Водночас, якщо РС виникав у старшому віці, то існувала велика ймовірність, що у пацієнта буде більше коморбідних захворювань до появи симптомів РС, ніж після.

Натомість, привертає увагу достовірна різниця між показниками інвалідизації за шкалою EDSS між цими двома групами пацієнтів. Так, у пацієнтів, у яких коморбідне захворювання виникло після дебюту РС, середній бал за шкалою EDSS є вищим на 17,9% ($p<0,05$). У випадку виникнення супутнього захворювання після діагностованого РС сума балів за шкалою EDSS є також достовірно ($p<0,05$) на 20,9% більшою у жінок, тоді як у чоловіків аналогічна різниця існує, проте вона недостовірна.

Надзвичайно важливим був кореляційний аналіз щодо взаємозв'язку балу EDSS з іншими важливими клінічними параметрами цього захворювання. Виявили прямий зв'язок середньої сили між віком пацієнтів на момент дебюту РС та балом за шкалою EDSS ($p<0,05$). Тобто, чим пізніше виникав розсіяний склероз, тим важчим був клінічний стан пацієнтів, що виражалось у наростанні їх інвалідизації.

Також було виявлено прямий зв'язок середньої сили між віком пацієнтів на момент виникнення коморбідного захворювання та середнім балом інвалідизації за шкалою EDSS ($p<0,05$). Це означає, що поява коморбідного захворювання у більш старшому віці призводить до більш значимої інвалідизації

хворих на РС. В дослідженні R. A. Marrie, et al., 2011 [236], які дослідили когорту з 8983 хворих на РС в динаміці і аналізували не лише поширеність коморбідної патології при РС, але і вплив супутніх захворювань на перебіг РС, повідомляють, що кількість супутньої патології у одного хворого мала тенденцію до значного зростання по мірі перебігу РС [236]. У порівнянні з контролем (хворі на РС без коморбідної патології), середній вік виникнення симптомів РС був вищим у хворих з будь-яким коморбідним захворюванням [236]. При збільшенні кількості супутніх захворювань вік хворих ставав старшим [236].

Встановили, що до дебюту РС у обстежених пацієнтів було діагностовано 30 нозологій, які можна об'єднати у сім класів. Найбільший інтервал ($12,17 \pm 3,74$ років) між моментом виникнення коморбідного захворювання та дебютом РС був у пацієнтів із захворюваннями ендокринної системи, розладами харчування і порушенням обміну речовин та достовірно ($p < 0,05$) перевищував такий термін у пацієнтів із захворюваннями системи кровообігу, дихання, кістково-м'язової системи та сполучної тканини.

З'ясували, що після дебюту РС у пацієнтів було діагностовано 45 нозологій, які об'єднуються, у більшості випадків, у дев'ять класів. Найдовший інтервал до виникнення коморбідного захворювання після дебюту РС спостерігається у пацієнтів, яким діагностували захворювання сечостатевої системи ($11,00 \pm 2,52$ років), що є достовірно ($p < 0,05$) більше ніж при діагностиці хвороб кістково-м'язової системи та сполучної тканини, нервової системи, ендокринної системи, розладів харчування і порушення обміну речовин, а також новоутворів. Окрім цього, виявили, що хвороби кістково-м'язової системи та сполучної тканини діагностуються після дебюту РС достовірно ($p < 0,05$) швидше порівняно із захворюваннями органів травлення.

Встановили, що після дебюту РС вузловий зоб діагностувався у чоловіків достовірно ($p < 0,01$) швидше, ніж у жінок. Аналогічний висновок можна зробити і щодо появи гіпертонічної хвороби. Терміни діагностики цієї нозологічної одиниці є також достовірно ($p < 0,05$) коротшими після встановлення діагнозу РС у чоловіків, порівняно з жінками.

Така суперечливість даних пов'язана з індивідуальними особливостями досліджуваних популяцій хворих на РС: географічними, етнічними, віковими, статевими.

Згідно з даними літератури, при РС проблеми наростання темпів прогресування можуть бути спровоковані коморбідністю з низкою захворювань та станів: розладами серцево-судинної, гепато-біліарної, дихальної систем, нирок, шлунка, підшлункової залози, аутоімунними захворюваннями, психічними розладами [234, 237, 238, 239, 240]. Зважаючи на тривалий перебіг патологічного процесу при РС для нього притаманне ціле коло коморбідних захворювань і станів, які супроводжують людину впродовж певного періоду і які можуть мати негативний вплив на перебіг основного патологічного процесу та якість життя хворого [28, 61, 241, 242, 243, 244]. Як було доведено, хворі на РС хворіють часто тими ж хронічними захворюваннями, що і люди в загальній популяції, і що саме поєднання декількох хронічних захворювань сприяє значному зниженню когнітивних функцій, збільшенню проявів втоми та депресії [210, 244].

Таким чином, розуміння механізмів впливу коморбідної патології на перебіг розсіяного склерозу і спроможність контролювати вказані процеси є пріоритетним завданням, яке було висвітлене нашими дослідженнями.

На другому етапі роботи досліджували аспекти зміни глікозильних детермінант хворих на розсіяний склероз, які раніше не досліджували. Тому ми сконцентрувались на двох головних напрямках – дослідженнях глікозилювання антитіл у ЦСР та його порівнянні із антитілами сироватки та визначення їх природи – про- чи антизапальні (тобто «погані» чи «хороші»), а також на виявленні специфічних для РС класу аутоантитіл, (серед яких ми обрали антитіла до ОБМ через найбільшу кількість повідомлень щодо їх патологічного впливу) та з'ясування статусу їх глікозилювання, зокрема, у порівнянні з загальними антитілами сироватки крові.

Для вирішення поставленого завдання на другому етапі власних досліджень ми дослідили 20 зразків сироватки крові хворих на РС, з них 12

зразків ЦСР хворих на РС, а також оцінили 18 зразків сироватки крові здорових донорів (ЗД).

На момент початку цієї роботи уже було відомо, що аутоімунні захворювання супроводжуються зміною профіля глікозилювання імуноглобулінів крові. Проте щодо змін експонування глікозильних детермінант імуноглобулінів у цереброспінальній рідині дослідження не проводились. Єдина на той час робота [245] щодо дослідження глікозилювання імуноглобулінів класу IgG1 в ЦСР використовувала метод мас-спектрометрії, який був денатуруючим і аналізував отримані в процесі розщеплення глікопептиди, та не дозволяв отримати інформацію про експонування нативних глікоформ на IgG. Слід нагадати, що саме конформація гліканів IgG визначає їх взаємодію з афекторними імунними клітинами [246]. Водночас, згадана робота показала важливість дослідження гліканів IgG у лікворі як потенційних діагностичних факторів, та вказала на відмінність у їх будові від таких у сироватці крові пацієнтів.

Порівняння експонування гліканів у ЦСР та сироватці крові пов'язане із технічними труднощами, такими як низька доступність ЦСР (здебільшого це залишки препаратів отриманих при пункції для аналізу на олігоклональні антитіла) та значно нижчим вмістом імуноглобулінів у ЦСР [17].

Для вирішення поставлених завдань нами був запропонований модифікований метод лектин-імуноферментного аналізу, де рівна кількість аналізованого білка забезпечувалась надлишковістю мішеней зв'язування імуноглобулінів (як це описано на рис. 4.4.). За таких умов для аналізу використовувалось 2 мкл сироватки та 20 мкл ЦСР (насправді не всі з 2 мкл сироватки використовувались, але менший об'єм проб не дозволяв забезпечити низьку інструментальну похибку), що дозволило досягнути достатньої кількості паралельних аналізів та незалежних повторів, щоб добитись достовірних результатів аналізу.

Виявлені у розділі 4.1 зміни щодо експонування гліканів у сироватках крові здорових донорів, сироватках крові пацієнтів із РС та ЦСР пацієнтів із РС вказали на істотні зміни глікозилювання, що дозволяли відрізнити як сироватку

крові ЗД від сироватки крові пацієнтів, так і ЦСР від сироватки крові пацієнтів із РС, що несе в собі важливий діагностично-прогностичний потенціал при цьому захворюванні. Показано, що зміни імуноглобулінів у сироватці крові хворих на 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 виявлено для фукозовмісних та сіаловмісних гліканів імуноглобулінів IgG, і є важливим діагностичним маркером при РС, так як визначення вказаних показників у сироватці крові є набагато простішим та доступнішим методом діагностики у порівнянні з дослідженням ліквору. Отримані результати були підтверджені даними літератури, де було описано, що в крові та лікворі хворих на РС виявлено антитіла зі зміненим профілем гліканів, порівняно зі здоровими добровольцями [247, 248].

Ефекторні функції Ig визначаються складом біомолекул залишків вуглеводів (гліканів), приєднаних до N-глікозилюючого домену в кристалізуючому фрагменті (Fc-ділянці) важких ланцюгів Ig [247, 248]. Вважають, що зміни в структурі гліканів здатні впливати на активність Ig. Так, наявність або відсутність певних залишків вуглеводів у складі антитіл пов'язана з їх про- або протизапальними властивостями. У подальшому, це призводить до впливу на перебіг запальних реакцій, а отже, ймовірно, визначає активність захворювання. Тому дослідження структурних змін Ig сироватки крові хворих на РС має надзвичайно важливе клінічне значення.

Зважаючи на малу кількість досліджених зразків ЦСР та разючі зміни у профілі її глікозилювання, ми повторили аналіз, використовуючи парні зразки сироваток крові та ЦСР окремих пацієнтів (розділ 4.2). В обох випадках були отримані подібні результати, що свідчили про зростання експонування фукозильних залишків – мішеней лектину AAL на імуноглобулінах IgG виділених із ЦСР, а також зростання рівня експонування мішеней лектину LCA (специфічного до корових залишків N-гліканів IgG).

Залишки фукози, приєднані до кору N-гліканів є відомими модуляторами ADCC (антитіло-залежної цитотоксичності) [108]. Саме тому вони стали мішенню рекомбінантних антитіл останнього покоління, де в рекомбінантні моноклональні антитіла вводять керовані зміни щодо вмісту фукозильних залишків [249, 250, 251] що є особливо ефективно в протипухлинній терапії із використанням моноклональних антитіл [252]. Водночас, у ЦСР ми спостерігали значно менший рівень зв'язування сіалоспецифічних лектинів SNA та PSqL - залишків сілової кислоти приєднаної α 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, що свідчить про меншу ступінь сіалування молекул імуноглобулінів IgG у ЦСР. Останній параметр є добре вивченим критерієм прозапальної властивості антитіл [174].

Дослідження процесів глікозилювання антитіл у ЦСР та сироватці крові хворих на 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 КІС в КДРС.

Отже імуноглобуліни IgG в ЦСР володіють більш прозапальними властивостями у порівнянні з імуноглобулінами IgG сироватки крові пацієнтів.

Водночас, значення зміни експонування фукозильованого триманозного кору N-гліканів IgG, що відображалось у зростанні зв'язування з лектином LCA, залишались не відомими, оскільки дослідження таких змін цієї глікозильної структури при РС раніше не проводили. Проте, у 2017 році з'явилися дані [180], щодо ролі вказаної структури при іншому аутоімунному захворюванні – ревматоїдному артриті. У групі хворих на РА також спостерігалось зростання зв'язування лектину LCA із IgG у порівнянні із аналогічними зразками здорових донорів. Цей показник корелював із вмістом ревмофактору (як за участю IgA так і IgM), а також з вмістом a-CCP антитіл (антитіл до циклічних цитрулінованих пептидів – одного з важливих маркерів ревматоїдного артриту), тобто виступав ознакою прозапальних функцій антитіл.

Аналіз зразків методом КЕ-ЛІФ дозволив нам визначити відносний розподіл глікоформ у досліджуваних зразках і виявив зростання бісектуючих форм N-гліканів, які ми співвіднесли із зростанням зв'язування лектину LCA результати опубліковано в роботі [169].

Цей аналіз показав, що зміни глікоформ у IgG сироваток хворих на РС мають ту ж направленість (зростання вмісту бісектуючих гліканів, спадання вмісту сіалованих форм), що й зміни при інших антитіло-залежних аутоімунних захворюваннях.

При аналізі зміни глікоформ IgG за допомогою методів імунобіологічного аналізу 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.

Використовуючи дискримінаційний тест з комбінацією сіалованого глікану FA2(3)G1S1 та бісектуючого глікану FA2BG2, нам вдалося розрізнити групи антитіло-залежних (включаючи РС) та антитіло-незалежних аутоімунних захворювань. Даний підхід можна використовувати для визначення аутоімунних запальних процесів у пацієнтів із симптомами ураження ЦНС.

Щоб з'ясувати, чи спостережувані зміни гліканів на IgG є притаманні РС чи особливостям ЦСР, ми провели мас-спектрометричні дослідження зразків ЦСР у пацієнтів із антитіло-незалежними ушкодженнями ЦНС та порівняли їх із глікопрофілем сироваток цих пацієнтів (розділ 4.3).

Результати проведених досліджень дозволили нам зробити кілька важливих висновків. Насамперед, ми спостерігали зменшення вмісту бісектуючих глікоформ у всіх досліджуваних класах імуноглобулінів IgG – IgG1, IgG2/3, IgG4 в ЦСР у порівнянні з сироваткою крові пацієнтів. Зважаючи на те, що в досліджуваних пацієнтів не було виявлено аутоімунних запальних патологій, та те, що імуноглобуліни IgG в ЦСР мають сироваткове походження і переносяться через гемато-енцефалічний бар'єр [119] і майже не синтезуються в

межах гематоенцефалічного бар'єру, це свідчить про систему, що селективно розпізнає імуноглобуліни із зміненими глікоформами в процесі такого транспорту.

Отже, в організмі людини є природня система розпізнавання гліканів імуноглобулінів, що забезпечує їх селективне надходження до ЦСР. Це припущення має місце на існування зважаючи на відносно недавнє виявлення системи, яка забезпечує проходження антитіл класу IgG через плацентарний бар'єр [253, 254], який до цього роками вважався не проникним для макромолекул та імуноглобулінів зокрема. При цьому, ЦСР є збіднена бісектуючими формами гліканів, а при запальних процесах їх вміст зростає. Фізіологічне значення цього явища потребує подальшого дослідження, адже становить важливий терапевтичний інтерес для лікування ділянок запалення, що перебувають в межах гемато-енцефалічного бар'єру.

Іншим важливим фактором є те, що при антитіло-незалежних захворюваннях ми не спостерігали значного зростання фукозильних та зменшення сіалільних залишків, які спостерігались при РС (розділ 4.4). Це дозволяє нам запропонувати аналіз вказаних гліканів як важливий біомаркер при діагностиці та аналізі ефективності терапії РС. Результати проведених досліджень опубліковано нами в роботі [255]. Встановили, що рівень експонування сіалованих залишків був вищим у сироватках крові хворих на РС та набагато нижчим у цереброспінальній рідині. З отриманих даних зробили висновок, що склад гліканів за рівнем сіалювання суттєво різниться у сироватці крові та цереброспінальній рідині хворих на РС, а також про те, що в досліджуваному випадку спостерігаємо зміну експонування залишків сіалових кислот на біантенному N-глікані молекул імуноглобулінів.

На третьому етапі дисертаційної роботи проводили дослідження глікозилування аутоантитіл, що виникають при РС. Подібні дослідження раніше не проводились. На цьому етапі залучили в дослідження 44 пацієнти із достовірно підтвердженим діагнозом РС згідно з критеріями МакДональда 2017 року, та поділили їх на наступні підгрупи: первинні (неліковані) пацієнти – 17 осіб, пацієнти, які отримували терапію кортикостероїдами – 12 осіб, пацієнти,

які лікувалися інтерфероном $\beta 1\text{В}$ (ІФН) - 15 осіб. У якості контролю було залучено 23 здорові донори.

Проаналізувавши повідомлення про аутоантитіла, які виявляються при РС, ми зупинили вибір дослідження на антитілах до основного білка мієліну, як одного з найкраще досліджених класів аутоантитіл при РС [128]. Відомо, що ушкодження цього білка аутоантитілами спричиняє демієлінізацію та наступні патогенетичні розлади, що мають місце при РС. Поява цих антитіл часто використовується при постановці діагнозу на РС та слугує основою надчутливих тестів на РС нового покоління [256]. Також варіації в генах ОБМ за останніми даними навіть дозволяють передбачити тип перебігу РС [257].

Для виділення специфічних антитіл до ОБМ нами було випробувано кілька підходів, таких як очистка імуноглобулінів IgG за допомогою білка G та афінна хроматографія на ОБМ - зв'язаного з афінними сорбентом чи поверхнею імуноферментного планшету. Проте вони виявились не ефективними через низький вміст фракції антитіл та високий заряд білка (відповідно антитіл до нього), що спричиняло неспецифічні взаємодії. Тому нами було створено мікрочастинки з ковалентно кон'югованим поліпептидом ОБМ, які ми могли інкубувати з відносно великим об'ємом сироватки, досягаючи насичення мішеней зв'язування, використовуючи кон'югати, описані в розділі 5.1.

Дослідження фракцій специфічних аутоантитіл до ОБМ дозволило нам порівняти їх із фракцією тотальних антитіл сироватки. Останні, строго кажучи, були не загальними антитілами, присутніми в сироватці крові, а загальними антитілами, з яких було усунуто афінною хроматографією фракцію анти-ОБМ антитіл. Про повноту такого збіднення тотальних фракцій щодо анти-ОБМ антитіл судити важко. Адже вміст анти-ОБМ у кожного з досліджуваних пацієнтів та на різних стадіях захворювання чи терапії є різними. Тому отриману фракцію після очистки афінних антитіл ми вважали «тотальними» антитілами, а щоб компенсувати індивідуальну варіабельність у вмісті антитіл - дослідження проводили на відносно великих групах пацієнтів (всього 44 особи та 23 здорових донори) на різних стадіях терапії (не ліковані – 17 пацієнтів), та з різними типами терапії (кортикостероїди – 12 пацієнтів, ІФН – 15 пацієнтів).

Отримані нами результати досліджень вказують на те, що саме аутоантитіла, наявні при РС, володіють прозапальним спектром глікозилювання, зокрема збільшеним вмістом фукозильних (мішень лектину AAL) та бісектуючих залишків (мішень лектину LCA).

Також, цей аналіз допоміг зрозуміти неочікувані результати щодо вмісту сіалованих глікоформ імуноглобулінів, для тотальної фракції яких ми спостерігали зростання вмісту при РС.

Водночас, для багатьох інших запальних аутоімунних захворювань показано протилежні зміни – аутоантитіла до гістонів, притаманні системному червоному вовчаку (СЧВ), є менш сіаловані ніж тотальна фракція антитіл [99, 258].

Отримавши технічну можливість виділити аутологічні анти-ОБМ антитіла у хворих на РС, ми також спостерігали їх достовірно нижчий рівень сіалування - прозапальну характеристику. Водночас, більший рівень сіалування тотальних антитіл, очевидно, вказує на компенсаторні реакції організму, пов'язані з утворенням великої кількості антизапальних антитіл.

Виявили, що зміна глікозилювання антитіл сироватки хворих, що спостерігалась у групах пацієнтів із РС, як нелікованих, так і тих, що зазнавали терапії кортикостероїдами чи ІФН, відбувалась внаслідок появи патологічних аутоантитіл.

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

Таким чином, дослідження процесів глікозилювання антитіл у сироватці крові та цереброспінальній рідині хворих на РС є надзвичайно важливим як з позиції розгляду їх як ключової ланки в патогенезі захворювання, так і як надійного біомаркера активності, прогресування РС та терапевтичної відповіді при цьому патологічному стані, дозволяє не лише покращити діагностику цього захворювання, але і оцінити ефективність терапії.

Неухильне прогресування інвалідизації пацієнтів у поєднанні з наявною коморбідною патологією, недосконалим розумінням механізмів виникнення та

розвитку РС, складним діагностичним пошуком і сумнівними прогностичними критеріями доводять необхідність пошуку нових етіопатогенетичних механізмів та біомаркерів цього захворювання [12, 259].

Важливим теоретичним здобутком роботи є характеристика природи імуноглобулінів IgG, що з'являються у сироватці крові та ЦСР при РС, яка закладає наукові основи до відслідковування та спрямованого впливу на патологічний чинник цього захворювання.

Отже, отримані дані вказують на важливість виявлення саме патологічних аутоантитіл та оцінки їх глікозилювання як маркера важкості перебігу РС. В двоетапному тесті, де виявляються ауто-ОБМ антитіла та оцінюється їх глікозилювання, позитивний результат (в даному випадку – низький рівень сіалових кислот на анти-ОБМ антитілах) дозволить як діагностувати захворювання (адже в нормальних умовах антитіла до ОБМ не утворюються), так і оцінити його важкість та ефективність терапії – за зміною вмісту сіалових і/чи фукозильних залишків. Пропозиція використовувати дані тести в клінічній діагностиці РС є важливим практичним компонентом представленої роботи.

Таким чином, в роботі розкриті нові патогенетичні ланки РС, що допоможуть покращити діагностику захворювання, вибрати терапію і оцінити ефективність призначеного лікування.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено новий підхід щодо оптимізації прогнозування перебігу розсіяного склерозу із урахуванням коморбідної патології та визначення нових діагностичних і прогностичних біомаркерів цього захворювання у зразках сироватки крові та цереброспінальної рідини.

1. У результаті комплексного клініко-неврологічного аналізу виявлено, що у одного пацієнта із РС в середньому діагностували $1,73 \pm 0,14$ випадків супутніх захворювань. Згідно МКХ-10 було констатовано 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 ($18,80 \pm 3,39\%$), кістково-м'язової системи і сполучної тканини ($17,29 \pm 3,28\%$) та органів дихання ($15,04 \pm 3,10\%$). 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).
2. Переважну більшість ($p < 0,01$) випадків виникнення супутнього захворювання було відзначено після дебюту РС. Встановили достовірні відмінності між віком пацієнтів на момент дебюту РС ($p < 0,05$), їх віком на момент виникнення коморбідної патології ($p < 0,05$), тривалістю РС ($p < 0,01$), тривалістю супутнього захворювання ($p < 0,01$) між пацієнтами, у яких коморбідне захворювання виникло до дебюту РС, порівняно з тими, у кого воно з'явилося після перших проявів РС. Ступінь тяжкості основного захворювання за EDSS був вищим на 17,9% у пацієнтів із коморбідним захворюванням, що виникло після дебюту РС, 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 захворюваннями ендокринної системи, розладами харчування і порушенням обміну речовин. Після дебюту розсіяного склерозу найбільший інтервал до виникнення супутнього захворювання спостерігався у пацієнтів, яким діагностували захворювання сечостатевої системи - $11,00 \pm 2,52$ років.

3. Виявили істотні зміни гліканових маркерів у складі імуноглобулінів IgG сироватки крові хворих на РС. Зокрема, при РС спостерігалось зростання вмісту фукозильних залишків (дискримінуються лектинами AAL та LCA, $p < 0.05$) та зменшення рівня сіаловмісних залишків (виявляються лектинами SNA та PSqL, $p < 0.001$). Використовуючи глікани як молекулярні маркери захворювання, дискримінували популяцію здорових донорів з хворими на РС наступних груп - нелікованих ($p < 0,05$ для лектину AAL), після терапії кортикостероїдами ($p < 0,05$ для лектинів ALL, SNA), після лікування інтерфероном β -1В ($p < 0.05$ для лектинів AAL, LCA, SNA). Вказані зміни носили прозапальний характер і виявлялись на аутоантитілах притаманних саме РС, що дозволяє запропонувати лектин-імуноферментний аналіз для діагностики РС.
4. 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. Дослідження процесів глікозилування антитіл у ЦСР та сироватці крові хворих на 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 РС в клінічно достовірний РС.
5. При аналізі зміни глікоформ IgG у сироватці крові хворих на РС встановили, що вони 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 AAL. Дослідження нових патогенетичних механізмів розвитку РС має наукове та практичне значення і є перспективним для подальшого вивчення.

6. Аналіз за участі методів 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, у ЦСР вміст бісектованих глікоформ був достовірно нижчим ($p < 0,05$) у порівнянні із зразками сироваток крові пацієнтів на усіх досліджуваних субкласах імуноглобулінів, як от IgG1, IgG2/3 та IgG4. Достовірно нижчий вміст сіалових кислот у ЦСР у порівнянні з сироваткою крові виявлено лише для субкласу імуноглобулінів IgG4 ($p < 0,05$). Отже, змінені глікоформи імуноглобулінів IgG можуть слугувати біомаркером аутоімунного процесу при РС.
7. Група хворих на РС, які отримували терапію інтерфероном β -1В, характеризувалась зменшеним рівнем антитіл до ОБМ класів IgG та IgM у порівнянні з нелікованими хворими. Рівні антитіл у них наближались до таких, як 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 фукозильованих триманозидних залишків в ядрі (корі) глікану – лігандів лектину LCA - на молекулах IgG та асоційованих нативних імунних комплексах. Ці зміни глікозилування антитіл у ЦСР та сироватці крові хворих на РС можна використовувати в якості надійного біомаркера активності, прогресування РС та терапевтичної відповіді при цьому патологічному стані, що дозволяє покращити його діагностику і оцінити ефективність проведеної терапії.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Обґрунтовано доцільність визначення структури коморбідної патології при розсіяному склерозі з метою оптимізації діагностики та прогнозування перебігу цього захворювання.
2. З метою оптимізації прогнозування перебігу РС доцільно визначати часовий зв'язок між дебютом цього захворювання та появою супутньої патології.
3. Глікозилювання IgG доцільно використовувати як тест, що дозволяє розрізнити антитіло-залежні, включаючи РС, та антитіло-незалежні аутоімунні захворювання.
4. Обґрунтовано використання детекції глікозилювання IgG як молекулярного маркера запальних процесів при РС, оскільки саме запальна аутоімунна природа РС призводить до зростання корових фукозильних залишків гліканів IgG.
5. З метою підвищення точності діагностики РС доцільно застосовувати визначення глікоформ імуноглобулінів IgG, зміни в яких можуть слугувати біомаркером аутоімунного процесу при РС.
6. Для оцінки нативних форм гліканів IgG доцільно використовувати лектин-імуноферментний аналіз.
7. З метою підвищення точності діагностики та прогнозування РС, а також оцінки ефективності проведеної терапії, доцільно застосовувати аналіз гліканів, оскільки при РС спостерігається значне зростання фукозильних та зменшення сіалільних залишків
8. Метод лектин-імуноферментного аналізу рекомендований для паралельного виявлення глікозилювання IgG у сироватці крові (висока концентрація) та ЦСР (низька концентрація) хворих на РС
9. З метою діагностики РС рекомендовано визначати фукозовмісні та сіаловмісні глікани імуноглобулінів IgG у сироватці крові хворих, що є доступнішим методом діагностики цього захворювання у порівнянні з дослідженням цереброспінальної рідини.

10.3 метою ранньої діагностики, оцінки активності та прогресування РС доцільно визначати глікан - ліганд лектину AAL на молекулі IgG.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Чуприна ГМ, Свиридова НК. Розсіяний склероз: етіологія, патогенез, клініка, діагностика, лікування (клінічна лекція). Лекції Огляди Новини. 2016;(1(7)):18-26.
2. Przybek-Skrzypecka J, Małeczka I, Członkowska A, Mirowska-Guzel D. Demographic and clinical profile of patients with multiple sclerosis diagnosed over the last 30 years according to different diagnostic criteria. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*. 2020;.DOI: 10.5603/pjnns.a2020.0027
3. Yusuf F, Wijnands J, Kingwell E, Zhu F, Evans C, Fisk J et al. Fatigue, sleep disorders, anaemia and pain in the multiple sclerosis prodrome. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020;:135245852090816.
4. Sokolova L, Nehrych T, Voloshyna N, Yegorkina O, Kobus T, Pashkovskyi V et al. Recommendations on the treatment of patients with active relapsing-remitting multiple sclerosis in Ukraine. *Ukrainian Neurological Journal*. 2018;0(2):93-96.
5. Nehrych T, Hychka K, Matviyenko Y. Pain and vertebrogenic syndromes in patients with multiple sclerosis (review of literature). *Proceedings of the Shevchenko Scientific Society Medical sciences*. 2018;52(1):46-56.
6. Дуцанова Г, Зулфикарова Э, Чумаков С. Когнитивные и психологические аспекты рассеянного склероза. *National journal of neurology*. 2018;(4):55-58.
7. Hychka K. Characteristics of comorbid diseases in patients with multiple sclerosis depending on its onset. *International neurological journal*. 2018;0(2.96):32-37.
8. Gustavsen S, Søndergaard H, Oturai D, Laursen B, Laursen J, Magyari M et al. Shift work at young age is associated with increased risk of multiple sclerosis in a Danish population. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2016;9:104-109.
9. Чуприна Г, Свиридова Н, Галуша А. Clinical features of neurologic disturbances in patients with multiple sclerosis and acute disseminated encephalomyelitis in the aspect of comorbidity. *Family Medicine*. 2018;0(1):86-90.

10. D'Ambrosio A, Pontecorvo S, Colasanti T, Zamboni S, Francia A, Margutti P. Peripheral blood biomarkers in multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2015;14(12):1097-1110.
11. Teunissen C, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C, Killestein J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis the long road to clinical application. *Nature Reviews Neurology*. 2015;11(10):585-596.
12. Housley W, Pitt D, Hafler D. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*. 2015;161(1):51-58.
13. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andrés C, Seyffferth A, Ramos-Medina R, Alonso B et al. Plasma Biomarkers Discriminate Clinical Forms of Multiple Sclerosis. *PLOS ONE*. 2015;10(6):e0128952
14. Washburn N, Schwab I, Ortiz D, Bhatnagar N, Lansing J, Medeiros A et al. Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(11):E1297-E1306.
15. Annibali V, Umeton R, Palermo A, Severa M, Etna M, Giglio S et al. Analysis of coding and non-coding transcriptome of peripheral B cells reveals an altered interferon response factor (IRF)-1 pathway in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*. 2018;324:165-171
16. Lisak R. Human retrovirus pHEV-W envelope protein and the pathogenesis of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(30):14791-14793
17. Ganrot K, Laurell C. Measurement of IgG and Albumin Content of Cerebrospinal Fluid, and its Interpretation. *Clinical Chemistry*. 1974;20(5):571-573. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4207912>
18. Feinstein A. The pre-therapeutic classification of co-morbidity in chronic disease. *Journal of Chronic Diseases*. 1970;23(7):455-468
19. Ефремова ОА. Аутоиммунных заболеваний на формирование сердечно сосудистой патологии на примере г. Белгорода. Н. Рук." федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего

образования «белгородский государственный национальный исследовательский университет» (2016): 73.

20. Шарабчиев ЮТ, Антипов ВВ, Антипова СИ. Коморбидность-актуальная научная и научно-практическая проблема медицины XXI века. Медицинские новости. 2014;8(239)
21. Kovalyova O. Semantic analysis and clinical importance of comorbidity and multimorbidity. Ukrainian Therapeutical Journal. 2019;0(2):79-86.
22. Беялов ФИ. Двенадцать тезисов коморбидности. Клиническая медицина 87.12 (2009): 69-71.
23. Вёрткин АЛ, Скотников АС. Роль хронического аллергического воспаления в патогенезе бронхиальной астмы и его рациональная фармакотерапия у пациентов с полипатией. Врач скорой помощи 4 (2010): 6-14.
24. Беялов, ФИ. Лечение внутренних болезней в условиях коморбидности. 2011.
25. Salter A, Kowalec K, Fitzgerald K, Cutter G, Marrie R. Comorbidity is associated with disease activity in MS. Neurology. 2020;95(5):e446-e456.
26. McKay K, Tremlett H, Fisk J, Zhang T, Patten S, Kastrukoff L et al. Psychiatric comorbidity is associated with disability progression in multiple sclerosis. Neurology. 2018;90(15):e1316-e1323.
27. Marrie R. Comorbidity in multiple sclerosis: implications for patient care. Nature Reviews Neurology. 2017;13(6):375-382
28. Havas J, Leray E, Rollot F, Casey R, Michel L, Lejeune F et al. Predictive medicine in multiple sclerosis: A systematic review. Multiple Sclerosis and Related Disorders. 2020;40:101928
29. Fang C, Wang H, Chen H, Lin J, Lin W. Epidemiology and comorbidities of adult multiple sclerosis and neuromyelitis optica in Taiwan, 2001–2015. Multiple Sclerosis and Related Disorders. 2020;45:102425.
30. Marrie R, Cohen J, Stuve O, Trojano M, Sørensen P, Reingold S et al. A systematic review of the incidence and prevalence of comorbidity in multiple sclerosis: Overview. Multiple Sclerosis Journal. 2015;21(3):263-281.

31. Marrie R. Comorbidity in Multiple Sclerosis. *International Journal of MS Care*. 2016;18(6):271-272.
32. Fang F, Sveinsson O, Thormar G, Granqvist M, Askling J, Lundberg I et al. The autoimmune spectrum of myasthenia gravis: a Swedish population-based study. *Journal of Internal Medicine*. 2014;277(5):594-604.
33. Завалишин ИА, Пирадов МА, Бойко АН, Никитин СС, Спиринов НН, Переседова АВ, Санадзе АГ. Аутоиммунные заболевания в неврологии. 2014 Т.2. – 101 с.
34. Бельская ГН, Лузанова ЕИ, Степанова СБ, Макарова ЛД, Сергиенко ДА, Лукашевич ИГ. Сочетание миастении и демиелинизирующих поражений нервной системы. *РМЖ*, 2015;(16): 968-969.
35. Caetano A, Mendonça M, Pinto M, Correia A, Peleção R. Neuromyelitis optica spectrum disorder developing 40 years after myasthenia gravis remission. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2015;6(4):426-429.
36. Dehbashi S, Hamouda D, Shanina E. Co-occurrence of multiple sclerosis and myasthenia gravis: A case report and review of immunological theories. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2019;34:135-136.
37. Moraitis S, Agrafiotis A, Kapranou A, Kanakakis K. Mediastinal silicone lymphadenopathy revealed after thymectomy for autoimmune myasthenia gravis. *Monaldi Archives for Chest Disease*. 2018;88(1).
38. Смолин АИ, Окладников ВИ, Моисеев БС. Неврологическая оценка отдаленных результатов операции тимэктомии при лечении миастении. *Сибирский мед. журнал*. 2011(7):12–14.
39. Алексеева ТМ, Косачев ВД, Халмурзина АН. Клинико-иммунологические особенности миастении и подходы к ее терапии у лиц пожилого возраста (обзор литературы). *Neuromuscul Dis* [Internet]. 2016 [cited 2020 Nov 5];6(3).
40. Gotkine M., Fellig Y., Abramsky O. Occurrence of CNS demyelinating disease in patients with myasthenia gravis // *Neurology*. - 2006. - Vol. 12 (67). – P. 881–883.
41. Chamberlain JL, Huda S, Whittam DH, Matiello M, Morgan BP, Jacob A. Role of complement and potential of complement inhibitors in myasthenia gravis and

- neuromyelitis optica spectrum disorders: a brief review. *J Neurol* [Internet]. 2019; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-019-09498-4>
42. Danikowski KM, Jayaraman S, Prabhakar BS. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2017;14(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-017-0892-8>
 43. Kimura K, Okada Y, Fujii C, Komatsu K, Takahashi R, Matsumoto S et al. Clinical characteristics of autoimmune disorders in the central nervous system associated with myasthenia gravis. *J Neurol*. 2019;266(11):2743–51.
 44. Krenn M, Grisold A, Wohlfarth P, Rath J, Cetin H, Koneczny I et al. Pathomechanisms and clinical implications of myasthenic syndromes exacerbated and induced by medical treatments. *Front Mol Neurosci*. 2020;13:156.
 45. Lopomo A, Berrih-Aknin S. Autoimmune thyroiditis and myasthenia gravis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:169.
 46. Patsopoulos NA. Genetics of multiple sclerosis: An overview and new directions. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(7):a028951.
 47. Camara-Lemarroy CR, Metz L, Meddings JB, Sharkey KA, Wee Yong V. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain*. 2018;141(7):1900–16.
 48. Halling ML, Kjeldsen J, Knudsen T, Nielsen J, Hansen LK. Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases. *World J Gastroenterol*. 2017;23(33):6137–46.
 49. Edwards LJ, Constantinescu CS. A prospective study of conditions associated with multiple sclerosis in a cohort of 658 consecutive outpatients attending a multiple sclerosis clinic. *Mult Scler*. 2004;10(5):575–81.
 50. Langer-Gould A, Albers KB, Van Den Eeden SK, Nelson LM. Autoimmune diseases prior to the diagnosis of multiple sclerosis: a population-based case-control study. *Mult Scler*. 2010;16(7):855–61.
 51. Gasparini S, Ferlazzo E, Ascoli M, Sueri C, Cianci V, Russo C, et al. Risk factors for unprovoked epileptic seizures in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*. 2017;38(3):399–406.

52. Di Cara M, Bonanno L, Rifichi C, Sessa E, D'Aleo G, Corallo F, et al. Quality of life in patients with multiple sclerosis and caregivers. Predictive factors: An observational study. *J Clin Neurosci*. 2020;78:242–5
53. Marrie RA, Reider N, Cohen J, Trojano M, Sorensen PS, Cutter G, et al. A systematic review of the incidence and prevalence of sleep disorders and seizure disorders in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2015;21(3):342–9.
54. Langenbruch L, Krämer J, Güler S, Möddel G, Geßner S, Melzer N, et al. Seizures and epilepsy in multiple sclerosis: epidemiology and prognosis in a large tertiary referral center. *J Neurol*. 2019;266(7):1789–95.
55. Schorner A, Weissert R. Patients with epileptic seizures and multiple sclerosis in a multiple sclerosis center in southern Germany between 2003-2015. *Front Neurol*. 2019;10:613.
56. Burman J, Zelano J. Epilepsy in multiple sclerosis: A nationwide population-based register study. *Neurology*. 2017;89(24):2462–8.
57. Chou IJ, Kuo CF, Tanasescu R, Tench CR, Tiley CG, Constantinescu CS, et al. Epilepsy and associated mortality in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2019;26(2):342-e23.
58. Tolstykh NV, Koroliova NY, Shkilniuk HH, Kataieva HV, Stoliarov ID. Symptomatic epilepsy in patients with multiple sclerosis (review of literature and analysis of own clinical cases). *INT NEUROL J*. 2018;0(5.99):77–85.
59. Atmaca MM, Gurses C. Status epilepticus and multiple sclerosis: A case presentation and literature review. *Clin EEG Neurosci*. 2017;49(5):1550059417693732.
60. Marrie RA, Reider N, Cohen J, Stuve O, Trojano M, Sorensen PS, et al. A systematic review of the incidence and prevalence of cancer in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2015;21(3):294–304.
61. Marrie RA, Reider N, Cohen J, Stuve O, Trojano M, Cutter G, et al. A systematic review of the incidence and prevalence of cardiac, cerebrovascular, and peripheral vascular disease in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2015;21(3):318–31.
62. Hong Y, Tang HR, Ma M, Chen N, Xie X, He L. Multiple sclerosis and stroke: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol*. 2019;19(1):139.

63. Spencer JJ, Bell JS, DeLuca GC. Vascular pathology in multiple sclerosis: reframing pathogenesis around the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(1):42–52.
64. Neofidov NA, Totolyan NA, Shumilina MV, Skoromets AA, Evdoshenko EP. The effect of cardiovascular diseases on the course of multiple sclerosis (review of literature). *Sci Notes P Pavlov St Petersburg State Med Univ*. 2020;26(3):31–42.
65. Jakimovski D, Topolski M, Genovese AV, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R. Vascular aspects of multiple sclerosis: emphasis on perfusion and cardiovascular comorbidities. *Expert Rev Neurother*. 2019;19(5):445–58.
66. Shaygannejad V, Shirmardi M, Dehghani L, Maghzi H. Co-occurrence of multiple sclerosis and Parkinson disease. *Adv Biomed Res*. 2016;5(1):75.
67. Potulska-Chromik A, Sinkiewicz-Darol E, Kostera-Pruszczyk A, Drac H, Kabzińska D, Zakrzewska-Pniewska B, Gołębiowski M, Kochański A. Charcot-Marie-Tooth type 1C disease coexisting with progressive multiple sclerosis: a study of an overlapping syndrome. *Folia Neuropathol*. 2012;50(4):369-74. doi: 10.5114/fn.2012.32366.
68. Dzieżyc K. Multiple sclerosis in two patients with coexisting Wilson's disease / Dzieżyc K, Litwin T, Członkowska A. // *Mult Scler Relat Disord*. – 2014. – C. 387–90.
69. Marck CH, De Livera AM, Weiland TJ, Jelinek PL, Neate SL, Brown CR, et al. Pain in people with multiple sclerosis: Associations with modifiable lifestyle factors, fatigue, depression, anxiety, and mental health quality of life. *Front Neurol*. 2017;8:461.
70. Bosma RL, Kim JA, Cheng JC, Rogachov A, Hemington KS, Osborne NR, et al. Dynamic pain connectome functional connectivity and oscillations reflect multiple sclerosis pain. *Pain*. 2018;159(11):2267–76.
71. Demaneuf T, Aitken Z, Karahalios A, Leong TI, De Livera AM, Jelinek GA, et al. Effectiveness of exercise interventions for pain reduction in people with multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Phys Med Rehabil*. 2019;100(1):128–39.

72. Zakrzewska JM, Wu J, Brathwaite TS-L. A systematic review of the management of trigeminal neuralgia in patients with multiple sclerosis. *World Neurosurg.* 2018;111:291–306.
73. Чуприна, Г. М., Н. К. Свиридова, М. С. Петренко. "Особливості перебігу больових синдромів у хворих з множинним склерозом в аспекті коморбідності." *Східно-Європейський неврологічний журнал* 2 (2016): 35-43.
74. Nehrych T, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Gychka K, Matviyenko Y. Pain and vertebrogenic syndromes in patients with multiple sclerosis (review of literature). *Proc Shevchenko Sci Soc Med sci.* 2018;52(1):46–56.
75. Чуприна, Г. М. Больові поперекові синдроми і артрози суглобів нижніх кінцівок як прояв коморбідності у хворих на розсіяний склероз: особливості перебігу, підходи до медикаментозного та акупунктурного лікування. *Семейная медицина* 2 (2015): 88-90.
76. Yusuf FLA, Wijnands JM, Kingwell E, Zhu F, Evans C, Fisk JD, et al. Fatigue, sleep disorders, anaemia and pain in the multiple sclerosis prodrome. *Mult Scler.* 2020;1352458520908163.
77. Байдина Т.В., Акинцева Ю.В., Трушникова Т.Н. Синдром хронической усталости у больных рассеянным склерозом и содержание серотонина в тромбоцитах периферической крови. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2014;114(2):25-28.
78. Mazhari A. Multiple sclerosis-related pain syndromes: An imaging update. *Curr Pain Headache Rep.* 2016;20(12):63.
79. Чуприна Г.М., Свиридова Н.К., Петренко М.С. Особливості перебігу больових синдромів у хворих з множинним склерозом в аспекті коморбідності // *EAST EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY.* – 2016. - №2 (08). – С. 35-43.
80. Beckmann Y, Türe S. Headache characteristics in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;27:112–6.

81. Özer G, Ergün U, İnan LE. Headache in multiple sclerosis from a different perspective: A prospective study. *J Clin Exp Invest*. 2018;9(1):9–13.
82. Gebhardt M, Kropp P, Hoffmann F, Zettl UK. Headache in the course of multiple sclerosis: a prospective study. *J Neural Transm (Vienna)*. 2019;126(2):131–9.
83. Mirmosayyeb O, Barzegar M, Nehzat N, Shaygannejad V, Sahraian MA, Ghajarzadeh M. The prevalence of migraine in multiple sclerosis (MS): A systematic review and meta-analysis. *J Clin Neurosci*. 2020;79:33–8.
84. Husain F, Pardo G, Rabadi M. Headache and its management in patients with multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol*. 2018;20(4):10.
85. Evlice A, Demir T, Kaleağası C, Özcan F, Demirkıran M. Rare onset symptoms in multiple sclerosis. *Acta Clin Belg*. 2016;71(3):154–7.
86. Seixas D, Teles D. Multiple Sclerosis and Pain. In: *Neuroimaging of Pain*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 375–94.
87. Freiha J, Riachi N, Chalah MA, Zoghaib R, Ayache SS, Ahdab R. Paroxysmal symptoms in multiple sclerosis—A review of the literature. *J Clin Med*. 2020;9(10):3100
88. Gustavsen MW, Celius EG, Winsvold BS, Moen SM, Nygaard GO, Berg-Hansen P, et al. Migraine and frequent tension-type headache are not associated with multiple sclerosis in a Norwegian case-control study. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2016;2:2055217316682976.
89. Bashir K, Whitaker JN. Importance of paraclinical and CSF studies in the diagnosis of MS in patients presenting with partial cervical transverse myelopathy and negative cranial MRI. *Mult Scler*. 2000;6(5):312–6.
90. Korolessis P, Maraziotis T, Stamatakis M, Baikousis A. Simultaneous three-level disc herniation in a patient with multiple sclerosis. *Eur Spine J*. 1996;5(4):278–80.
91. Poser CM. Trauma to the central nervous system may result in formation or enlargement of multiple sclerosis plaques. *Arch Neurol*. 2000;57(7):1074–7, discussion 1078.
92. Muccilli A, Seyman E, Oh J. Spinal cord MRI in multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2018;36(1):35–57.

93. Xydis VG, Zikou AK, Kostadima V, Astrakas LG, Kosta P, Argyropoulou MI. The association between multiple sclerosis and spondylosis: When and why. *Eur J Radiol.* 2017;91:47–51.
94. Eden D, Gros C, Badji A, Dupont SM, De Leener B, Maranzano J, et al. Spatial distribution of multiple sclerosis lesions in the cervical spinal cord. *Brain.* 2019;142(3):633–46.
95. Гусев Е., Завалишин И., Бойко А. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Миклош, 2004 (540).
96. Cosman F, Nieves J, Komar L, Ferrer G, Herbert J, Formica C, et al. Fracture history and bone loss in patients with MS. *Neurology.* 1998;51(4):1161–5.
97. Stümer J, Biermann MHC, Knopf J, Magorivska I, Kastbom A, Svärd A, et al. Altered glycan accessibility on native immunoglobulin G complexes in early rheumatoid arthritis and its changes during therapy. *Clin Exp Immunol.* 2017;189(3):372–82. <https://doi.org/10.1111/cei.12987>
98. Sjöwall C, Zapf J, von Löhneysen S, Magorivska I, Biermann M, Janko C, et al. Altered glycosylation of complexed native IgG molecules is associated with disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2015;24(6):569–81. <https://doi.org/10.1177/0961203314558861>
99. Magorivska I, Muñoz LE, Janko C, Dumych T, Rech J, Schett G, et al. Sialylation of anti-histone immunoglobulin G autoantibodies determines their capabilities to participate in the clearance of late apoptotic cells: Pathogenic asialo anti-histone auto-IgG. *Clin Exp Immunol.* 2016;184(1):110–7. <https://doi.org/10.1111/cei.12744>
100. Fickentscher C, Magorivska I, Janko C, Biermann M, Bilyy R, Nalli C, et al. The pathogenicity of anti-β2GP1-IgG autoantibodies depends on fc glycosylation. *J Immunol Res.* 2015; <https://doi.org/10.1155/2015/638129>
101. Selman MHJ, Niks EH, Titulaer MJ, Verschuuren JJGM, Wuhrer M, Deelder AM. IgG fc N-glycosylation changes in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and myasthenia gravis. *J Proteome Res.* 2011;10(1):143–52. <https://doi.org/10.1021/pr1004373>

102. Campbell MP, Packer NH. UniCarbKB: New database features for integrating glycan structure abundance, compositional glycoproteomics data, and disease associations. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(8):1669–75
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.016>
103. Wahl A, van den Akker E, Klaric L, Štambuk J, Benedetti E, Plomp R, et al. Genome-wide association study on immunoglobulin G glycosylation patterns. *Front Immunol*. 2018;9:277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00277>
104. Herring JM, McMichael MA, Smith SA, Nimmerjahn F, Ravetch JV. FcgammaRs in health and disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2013;27(5):1020–1033.
105. Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcgammaR: current models. *Immunol Lett*. 2002;82(1–2):57–65.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12008035>
106. Tackenberg B, Nimmerjahn F, Lünemann JD. Mechanisms of IVIG efficacy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Clin Immunol*. 2010;30 Suppl 1(S1):S65-9. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9398-1>
107. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*. 2007;25(1):21–50.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702>
108. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2003;278(5):3466–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210665200>
109. Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature*. 2011;475(7354):110–3. <https://doi.org/10.1038/nature10134>
110. Harre U, Lang SC, Pfeifle R, Rombouts Y, Frühbeißer S, Amara K, et al. Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. *Nat Commun*. 2015;6(1):6651. <https://doi.org/10.1038/ncomms7651>

111. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006;313(5787):670–3.
112. Lux A, Yu X, Scanlan CN, Nimmerjahn F. Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcγRs. *J Immunol*. 2013;190(8):4315–23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200501>
113. Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA, Kümpfel T, Derfuss T, Khademi M, et al. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):235. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0450-1>
114. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2019;10:726.
115. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121–7. <https://doi.org/10.1002/ana.1032>
116. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
117. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162–73. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
118. Tumani H, Deisenhammer F, Giovannoni G, Gold R, Hartung H-P, Hemmer B, et al. Revised McDonald criteria: the persisting importance of cerebrospinal fluid analysis. *Ann Neurol*. 2011;70(3):520; author reply 521. <https://doi.org/10.1002/ana.22508>
119. Keir G, Thompson EJ. Immunoglobulins in CSF. In: *Immunoglobulins in Health and Disease*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1986. p. 173–87. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4169-4_10
120. Thompson EJ, Johnson MH. Electrophoresis of CSF proteins. *Br J Hosp Med*. 1982;28(6):600–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7150839>

121. Link H, Huang Y-M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol.* 2006;180(1–2):17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.07.006>
122. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement: A consensus statement. *Arch Neurol.* 2005;62(6):865–70. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.6.865>
123. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013;262(1–2):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.06.014>
124. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, et al. Routine Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis. In: *European Handbook of Neurological Management*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010. p. 5–17. <https://doi.org/10.1002/9781444328394.ch1>
125. Luque FA, Jaffe SL. Cerebrospinal fluid analysis in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:341–56. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)79015-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)79015-3)
126. Rosenthal A. The cerebrospinal fluid proteins in multiple sclerosis. *Clin Lab Med.* 1986;6(3):457–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3091313>
127. Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in multiple sclerosis: An up-to-date overview. *Mult Scler Int.* 2013;2013:340508. <https://doi.org/10.1155/2013/340508>
128. Weissert R. The immune pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(4):857–66. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9467-3>
129. Chase Huizar C, Raphael I, Forsthuber TG. Genomic, proteomic, and systems biology approaches in biomarker discovery for multiple sclerosis. *Cell Immunol.* 2020;358(104219):104219
130. Haddad N, McMinn B, Hartley L. Headache meets neurology and psychiatry: a framework for diagnosis. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2016;101(4):200–5. <https://doi.org/10.1002/9781444328394.ch1>
131. Bergamaschi R. Prognostic factors in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:423–47.

132. Oreja-Guevara C, ParadigMS Group. Overview of magnetic resonance imaging for management of relapsing-remitting multiple sclerosis in everyday practice. *Eur J Neurol*. 2015;22 Suppl 2:22–7.
133. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545–58.
134. Ferraro D, Galli V, Vitetta F, Simone AM, Bedin R, Del Giovane C, et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in clinically isolated syndrome patients: Association with oligoclonal IgM bands and prediction of Multiple Sclerosis diagnosis. *J Neuroimmunol*. 2015;283:64–9.
135. Alvarez E, Piccio L, Mikesell RJ, Klawiter EC, Parks BJ, Naismith RT, et al. CXCL13 is a biomarker of inflammation in multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and other neurological conditions. *Mult Scler*. 2013;19(9):1204–8.
136. Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, et al. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013;8(4):e61835.
137. Bielekova B, Komori M, Xu Q, Reich DS, Wu T. Cerebrospinal fluid IL-12p40, CXCL13 and IL-8 as a combinatorial biomarker of active intrathecal inflammation. *PLoS One*. 2012;7(11):e48370.
138. Romme Christensen J, Börnsen L, Khademi M, Olsson T, Jensen PE, Sørensen PS, et al. CSF inflammation and axonal damage are increased and correlate in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19(7):877–84.
139. Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K, Klein RS, Parks BJ, Lyons JA, et al. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2010;67(6):707–14.
140. Cross AH, Klein RS, Piccio L. Rituximab combination therapy in relapsing multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012;5(6):311–9.
141. Axelsson M, Malmeström C, Gunnarsson M, Zetterberg H, Sundström P, Lycke J, et al. Immunosuppressive therapy reduces axonal damage in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20(1):43–50.

142. Milo R. Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2016;15(7):714–8.
143. Tumani H, Lehmensiek V, Rau D, Guttman I, Tauscher G, Mogel H, et al. CSF proteome analysis in clinically isolated syndrome (CIS): candidate markers for conversion to definite multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2009;452(2):214–7.
144. Ottervald J, Franzén B, Nilsson K, Andersson LI, Khademi M, Eriksson B, et al. Multiple sclerosis: Identification and clinical evaluation of novel CSF biomarkers. *J Proteomics.* 2010;73(6):1117–32.
145. Harris VK, Donelan N, Yan QJ, Clark K, Touray A, Rammal M, et al. Cerebrospinal fluid fetuin-A is a biomarker of active multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013;19(11):1462–72.
146. Khademi M, Bornsen L, Rafatnia F, Andersson M, Brundin L, Piehl F, et al. The effects of natalizumab on inflammatory mediators in multiple sclerosis: prospects for treatment-sensitive biomarkers. *Eur J Neurol.* 2009;16(4):528–36.
147. Gaiottino J, Norgren N, Dobson R, Topping J, Nissim A, Malaspina A, et al. Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS One.* 2013;8(9):e75091
148. Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64(3):402–4.
149. Giovannoni G. Cerebrospinal fluid neurofilament: the biomarker that will resuscitate the “Spinal Tap.” *Mult Scler.* 2010;16(3):285–6
150. Burman J, Zetterberg H, Fransson M, Loskog AS, Raininko R, Fagius J. Assessing tissue damage in multiple sclerosis: a biomarker approach. *Acta Neurol Scand.* 2014;130(2):81–9.
151. Salzer J. The only certain measure of the effectiveness of multiple sclerosis therapy is cerebrospinal neurofilament level - YES. *Mult Scler.* 2015;21(10):1239–40.
152. Goldsmith J, Herskovits A. Cerebrospinal Fluid Testing for Multiple Sclerosis. *Clinics in Laboratory Medicine.* 2020;40(3):369-377.

153. Semra Y, Seidi O, Sharief M. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *Journal of Neuroimmunology*. 2002;122(1-2):132-139.
154. Khalil M, Teunissen C, Otto M, Piehl F, Sormani M, Gattringer T et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*. 2018;14(10):577-589.
155. Kuhle J, Disanto G, Lorscheider J, Stites T, Chen Y, Dahlke F et al. Fingolimod and CSF neurofilament light chain levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 2015;84(16):1639-1643.
156. Watanabe M, Nakamura Y, Michalak Z, Isobe N, Barro C, Leppert D et al. Serum GFAP and neurofilament light as biomarkers of disease activity and disability in NMOSD. *Neurology*. 2019;93(13):e1299-e1311
157. Leurs C, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte B, van Pesch V, Dujmovic I, Drulovic J et al. Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: A large multicenter study. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019;26(8):912-923.
158. Bridel C, van Wieringen W, Zetterberg H, Tijms B, Teunissen C, Alvarez-Cermeño J et al. Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology. *JAMA Neurology*. 2019;76(9):1035.
159. Martínez M, Olsson B, Bau L, Matas E, Calvo Á, Andreasson U et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid predict progression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2015;21(5):550-561
160. Harris V, Tuddenham J, Sadiq S. Biomarkers of multiple sclerosis: current findings. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*. 2017;Volume 7:19-29.
161. Domingues R, Fernandes G, Leite F, Tilbery C, Thomaz R, Silva G et al. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: far beyond the bands. *Einstein (São Paulo)*. 2017;15(1):100-104.
162. Kothur K, Wienholt L, Brilot F, Dale R. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review. *Cytokine*. 2016;77:227-237

163. Kapoor R, Ho P, Campbell N, Chang I, Deykin A, Forrestal F et al. Effect of natalizumab on disease progression in secondary progressive multiple sclerosis (ASCEND): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with an open-label extension. *The Lancet Neurology*. 2018;17(5):405-415.
164. Giovannoni G, Turner B, Gnanapavan S, Offiah C, Schmierer K, Marta M. Is it time to target no evident disease activity (NEDA) in multiple sclerosis?. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2015;4(4):329-333.
165. Thompson A, Banwell B, Barkhof F, Carroll W, Coetzee T, Comi G et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-173.
166. Kurtzke J. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1444.
167. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278–86.
168. Магорівська ІБ, Томін АМ, Думич ТІ, et al. Спосіб оцінки параметрів молекул імуноглобуліну класу IgG у зразках сироватки крові. UA, UA: Патент України на корисну модель 95297; 2014. р. 1–6.
169. Magorivska I, Dönczö B, Dumych T, Karmash A, Boichuk M, Hychka K, et al. Glycosylation of random IgG distinguishes seropositive and seronegative rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 2018;51(3):111–7. <https://doi.org/10.1080/08916934.2018.1468886>
170. Falck D, Jansen BC, de Haan N, Wuhrer M. High-throughput analysis of IgG Fc glycopeptides by LC-MS. *Methods Mol Biol*. 2017;1503:31–47. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6493-2_4
171. Polysciences.com. [cited 2020 Oct 22]. Available from: <https://www.polysciences.com/skin/frontend/default/polysciences/pdf/TDS>
<https://www.polysciences.com/skin/frontend/default/polysciences/pdf/TDS570.pdf>
172. Tomioka R, Matsui M. Biomarkers for multiple sclerosis. *Intern Med*. 2014;53(5):361–5.

173. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2008;372:1502–1517. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970977>.
174. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006;313(5787):670–3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16888140.
175. Mahorivska IB, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Bilyy RO, Muñoz L, Herrmann M, Stoika RS, et al. Sialylation of anti-histone antibodies in blood serum of systemic lupus erythematosus patients. *Biol Stud*. 2012;6(3):55–64.
176. Paryzhak S, Dumych T, Mahorivska I, et al. Neutrophil-released enzymes can influence composition of circulating immune complexes in multiple sclerosis. *Autoimmunity* [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 10];51:297–303. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08916934.2018.1514390>.
177. Mo H, Winter HC, Goldstein IJ. Purification and Characterization of a Neu5Aca2–6Galβ1–4Glc/GlcNAc-specific Lectin from the Fruiting Body of the Polypore Mushroom *Polyporus squamosus*. *J Biol Chem*. 2000;275(14):10623–9. <http://www.jbc.org/content/275/14/10623.abstract>.
178. Chen S, Lu C, Gu H, Mehta A, Li J, Romano PB, et al. Aleuria Aurantia Lectin (AAL)-reactive immunoglobulin G rapidly appears in sera of animals following antigen exposure. *PLoS One*. 2012;7(9):e44422
179. Sjöwall C, Zapf J, von Löhneysen S, Magorivska I, Biermann M, Janko C, et al. Altered glycosylation of complexed native IgG molecules is associated with disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2015;24(6):569–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389233>.
180. Stümer J, Biermann MHC, Knopf J, Magorivska I, Kastbom A, Svärd A, et al. Altered glycan accessibility on native immunoglobulin G complexes in early rheumatoid arthritis and its changes during therapy. *Clin Exp Immunol*. 2017;189(3):372–82 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28509333>.

181. Fickentscher C, Magorivska I, Janko C, Biermann M, Bilyy R, Nalli C, et al. The pathogenicity of anti- β 2GP1-IgG autoantibodies depends on fc glycosylation. *J Immunol Res*. 2015;2015:638129. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/638129>.
182. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. 2017;27(1):3–49.
183. Beseler C, Vollmer T, Graner M, Yu X. The complex relationship between oligoclonal bands, lymphocytes in the cerebrospinal fluid, and immunoglobulin G antibodies in multiple sclerosis: Indication of serum contribution. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186842
184. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol*. 2018;333:65–79.
185. Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell*. 2018;9(1):63–73
186. Li T, DiLillo DJ, Bournazos S, Giddens JP, Ravetch JV, Wang L-X. Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(13):3485–90.
187. Black AP, Liang H, West CA, Wang M, Herrera HP, Haab BB, et al. A novel mass spectrometry platform for multiplexed N-glycoprotein biomarker discovery from patient biofluids by antibody panel based N-glycan imaging. *Anal Chem*. 2019;91(13):8429–35
188. Seeling M, Brückner C, Nimmerjahn F. Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(10):621–30.
189. Ruhaak LR, Xu G, Li Q, Goonatilleke E, Lebrilla CB. Mass spectrometry approaches to glycomic and glycoproteomic analyses. *Chem Rev*. 2018;118(17):7886–930.
190. Pagan JD, Kitaoka M, Anthony RM. Engineered sialylation of pathogenic antibodies in vivo attenuates autoimmune disease. *Cell*. 2018;172(3):564-577.e13.
191. de Haan N, Reiding KR, Krištić J, Hipgrave Ederveen AL, Lauc G, Wuhler M. The N-glycosylation of mouse immunoglobulin G (IgG)-fragment crystallizable differs between IgG subclasses and strains. *Front Immunol*. 2017;8:608.

192. Epp A, Hobusch J, Bartsch YC, Petry J, Lilienthal G-M, Koeleman CAM, et al. Sialylation of IgG antibodies inhibits IgG-mediated allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):399-402.e8.
193. Moreira LB, Namen AA. A hybrid data mining model for diagnosis of patients with clinical suspicion of dementia. *Comput Methods Programs Biomed*. 2018;165:139–49.
194. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, et al. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 2018;554(7691):249–54.
195. Wojtala J, Heber IA, Neuser P, Heller J, Kalbe E, Rehberg SP, et al. Cognitive decline in Parkinson's disease: the impact of the motor phenotype on cognition. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(2):171–9.
196. Чуприна Г. М. Розсіяний склероз: клініко-патогенетичні характеристики та терапевтичні підходи з урахуванням коморбідності //Східно-європейський неврологічний журнал. 2018; (4):10-25.
197. Pellegrino L, Coscia M, Muller M, Solaro C, Casadio M. Evaluating upper limb impairments in multiple sclerosis by exposure to different mechanical environments. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20343-y>
198. Magni G, Pedretti S, Audano M, Caruso D, Mitro N, Ceruti S. Glial cell activation and altered metabolic profile in the spinal-trigeminal axis in a rat model of multiple sclerosis associated with the development of trigeminal sensitization. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2020.07.001>
199. Чуприна Г. М., Свиридова Н. К. Аналіз факторів ризику у хворих розсіяним склерозом в аспекті коморбідності. *Східно-Європейський неврологічний журнал*. 2016; (5):14-18.
200. Negrych NO, Nehrych TI, Payenok AV, Voloshyna NP, Myronovskij SL, Kit YY, et al. Clinical profile of a new serum biomarker as a potential product of endogenous human retroviral protein degradation in patients with multiple sclerosis. *INT NEUROL J*. 2018;0(1.95):24–30.

201. Boyko OV, Tatarinova MY, Popova EV, Guseva MR, Boyko AN, Gusev EI. The improvement of quality of life of patients with multiple sclerosis over 15-year period. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2018;118(8. Vyp. 2):23–8.
202. Shroff G. A review on stem cell therapy for multiple sclerosis: special focus on human embryonic stem cells. *Stem Cells Cloning*. 2018;11:1–11.
203. Мурашко НК, Чуприна ГМ. Аналіз коморбідності та чинників стилю життя у хворих із розсіяним склерозом." *Семейная медицина* 5 (2013): 85-87.
204. Ковальчук ЕЮ, Повзун АС. Инфаркт миокарда и коморбидность. Развитие современной науки: теоретические и прикладные аспекты 2017:116-123.
205. Опря, ЄВ. Психопатологія емоційної сфери у хворих на шизофренію з соматичними захворюваннями. *Український вісник психоневрології* 26, вип. 2 (2018): 82-85.
206. Савияов, ЕД, Колесников СИ, Брико НИ. Коморбидность в эпидемиологии-новый тренд в исследованиях общественного здоровья. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 4 (2016).
207. Приходько МН, Андреев КВ, Симонова ЖГ. Оценка клинико-функциональных параметров у больных стабильной стенокардией с сопутствующей гастродуоденальной патологией. *Вятский медицинский вестник* 2 (50) (2016).
208. Гринюк ВВ, Захаров ВВ, Вахнина НВ. Коморбидность хронического болевого синдрома и гипертонической болезни. *Клиническая геронтология* (2019):25.7-8.
209. Boyko A, Gusev E. Current algorithms of diagnosis and treatment of multiple sclerosis based on the individual assessment of the patient. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im SS Korsakova*. 2017;117(2. Vyp. 2):92.
210. Plow M, Motl RW, Finlayson M, Bethoux F. Response heterogeneity in a randomized controlled trial of telerehabilitation interventions among adults with multiple sclerosis. *J Telemed Telecare*. 2020;1357633X2096469.
211. Salcı Y, Fil A, Armutlu K, Yildiz F, Kurne A, Aksoy S et al. Effects of different exercise modalities on ataxia in multiple sclerosis patients: a randomized controlled study. *Disability and Rehabilitation*. 2016;39(26):2626-2632.

212. Rakhmatullin A, Bakhtiarova K, Magzhanov R. Autonomic dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im SS Korsakova*. 2017;117(1):55.
213. Motl R, Sandroff B, Kwakkel G, Dalgas U, Feinstein A, Heesen C et al. Exercise in patients with multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2017;16(10):848-856.
214. Мяловицька ОА, Хижняк ЮВ. Прогностична оцінка розвитку когнітивних та емоційних порушень у хворих на розсіяний склероз залежно від локалізації вогнищ демієлінізації в головному мозку. *Український неврологічний журнал*. 2017;3:33-37.
215. Ширалиева Р, Гусейнова С, Несруллаева Н. Анализ мультимодальных вызванных потенциалов в клинической практике у пациентов с рассеянным склерозом. *National Journal of Neurology*. 2019;(3):26-28.
216. Хижняк ЮВ. Клініко-нейропсихологічні співвідношення у хворих на розсіяний склероз (2019)
217. Truini A, Prosperini L, Calistri V, Fiorelli M, Pozzilli C, Millefiorini E et al. A dual concurrent mechanism explains trigeminal neuralgia in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2016;86(22):2094-2099.
218. Yilmazer C, Lamers I, Solaro C, Feys P. Clinical perspective on pain in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2020;1352458520952015.
219. Gürkan MA, Gürkan FT. Measurement of pain in multiple sclerosis. *Noro Psikiyatr Ars*. 2018;55(Suppl 1):S58–62.
220. Mialovytska O, Khyzhniak Y, Nebor Y. Modern views on pathogenetic mechanisms of cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *The Journ. of Neurosci*. 2017;5(2):11-6.
221. Столяров ИД, Петров АМ, Вотинцева МВ, Ивашкова ЕВ. Безопасность иммуносупрессорных препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза [Internet]. *Нервные болезни*; 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.24411/2226-0757-2018-12028>
222. Mayo L, Cunha APD, Madi A, Beynon V, Yang Z, Alvarez JI, et al. IL-10-dependent Tr1 cells attenuate astrocyte activation and ameliorate chronic central nervous system inflammation. *Brain*. 2016;139(Pt 7):1939–57.

223. Trapp BD, Vignos M, Dudman J, Chang A, Fisher E, Staugaitis SM, et al. Cortical neuronal densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective study. *Lancet Neurol*. 2018;17(10):870–84.
224. Papi E, Nayar S, Gardner DH, Colafrancesco S, Smith C, Barone F. Tertiary lymphoid structures: Autoimmunity goes local. *Front Immunol*. 2018;9:1952.
225. Wang TT, Ravetch JV. Functional diversification of IgGs through Fc glycosylation. *J Clin Invest*. 2019;129(9):3492–8.
226. Козин М, Куликова О, Фаворова О. Участие митохондрий в развитии нейродегенерации при рассеянном склерозе. *Биохимия*. 2018;83(7):1002–1021.
227. Sokolova LI, Nehrych TI, Voloshyna NP, Yegorkina OV, Kobus TO, Pashkovskyi VI, et al. Recommendations on the treatment of patients with active relapsing-remitting multiple sclerosis in Ukraine. *Ukrainian Neurological Journal*. 2018;0(2):93–6.
228. Негрич ТІ, Гриб ВА, Оринчак ЛБ. Some etiologic risk factors for multiple sclerosis among prykarpattia region inhabitants. *pulse* [Internet]. 2019Jun.10 [cited 2020Nov.3];0(7(43):47-50
229. Бойчук МО. Від ефективної діагностики розсіяного склерозу та вчасного лікування його загострень до покращення статистичних показників перебування в спеціалізованому медичному закладі. *Міжнародний неврологічний журнал* 6 (2018): 54-60.
230. Lo LMP, Taylor BV, Winzenberg T, Palmer AJ, Blizzard L, Ahmad H, et al. Estimating the relative contribution of comorbidities in predicting health-related quality of life of people with multiple sclerosis. *J Neurol* [Internet]. 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-020-10195-w>
231. Фус АВ, Подолинный ГИ. Полипатии: в поиске факторов этиопатогенетических рисков. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*, 2020:24(2).
232. Camara-Lemarroy C, Metz L, Yong V. Focus on the gut-brain axis: Multiple sclerosis, the intestinal barrier and the microbiome. *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24(37):4217-4223.

233. Seabra M, Abreu P, Soares Mendonça M, Reis J, Sá M, Guimarães Ferreira Almeida J. "Multiple sclerosis plus": Does it influence the disease course?. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2020;11(2):117-121.
234. Jaruvongvanich V, Sanguankeo A, Jaruvongvanich S, Upala S. Association between *Helicobacter pylori* infection and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2016;7:92-97.
235. Hauer L, Perneczky J, Sellner J. A global view of comorbidity in multiple sclerosis: a systematic review with a focus on regional differences, methodology, and clinical implications. *Journal of Neurology*. 2020.
236. Marrie R, Horwitz R, Cutter G, Tyry T, Vollmer T. Association between comorbidity and clinical characteristics of MS. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2010;124(2):135-141.
237. Tezel N, Bal A, Bizpınar Ö, Karaahmet Ö, Çakçı A. Concomitance Ankylosing Spondylitis and Multiple Sclerosis: Case Report. *Türkiye Klinikleri Journal of Case Reports*. 2017;25(3):109-112.
238. Kosmidou M, Katsanos A, Katsanos K, Kyritsis A, Tsivgoulis G, Christodoulou D et al. Multiple sclerosis and inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*. 2016;264(2):254-259.
239. Plantone D, De Angelis F, Doshi A, Chataway J. Secondary Progressive Multiple Sclerosis: Definition and Measurement. *CNS Drugs*. 2016;30(6):517-526.
240. Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and environmental factors in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(4):a028944.
241. Чуприна ГМ. Підходи до комплексного лікування хворих на розсіяний склероз за умов коморбідності з використанням методів рефлексотерапії. *Східно-європейський неврологічний журнал* 3 (2015): 44-48.
242. Чуприна ГМ. Аналіз впливу місяця народження на розвиток розсіяного склерозу в аспекті коморбідності. *Здоров'я суспільства* 6(3) 2017: 59-63.
243. Чуприна ГМ, Свиридова НК. Аналіз факторів ризику у хворих розсіяним склерозом в аспекті коморбідності. *Східно-Європейський неврологічний журнал* (5)2016: 14-18.

244. Ontaneda D, Thompson AJ, Fox RJ, Cohen JA. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *Lancet*. 2017;389(10076):1357–66.
245. Gastaldi M, Zardini E, Franciotta D. An update on the use of cerebrospinal fluid analysis as a diagnostic tool in multiple sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(1):31–46.
246. Ahmed AR, Kaveri S. Reversing autoimmunity combination of rituximab and intravenous immunoglobulin. *Front Immunol* [Internet]. 2018;9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01189>
247. Gupta SK, Shukla P. Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(24):10457–68.
248. Cymer F, Beck H, Rohde A, Reusch D. Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation - Structure, function and therapeutic potential. *Biologicals*. 2018;52:1–11.
249. Chang MM, Gaidukov L, Jung G, Tseng WA, Scarcelli JJ, Cornell R, et al. Small-molecule control of antibody N-glycosylation in engineered mammalian cells. *Nat Chem Biol*. 2019;15(7):730–6.
250. Dekkers G, Plomp R, Koeleman CAM, Visser R, von Horsten HH, Sandig V, et al. Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans. *Sci Rep*. 2016;6:36964. <http://dx.doi.org/10.1038/srep36964>.
251. Wang Q, Chung C-Y, Chough S, Betenbaugh MJ. Antibody glycoengineering strategies in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*. 2018;115(6):1378–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29457629>.
252. Zhang Y, Fan C, Zhang L, Ma X. Glycosylation-dependent antitumor therapeutic monoclonal antibodies. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;163:471–85. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117319300389>.
253. Simister NE, Story CM. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol*. 1997;37(1):1–23. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(97\)00068](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(97)00068)
254. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. 2003;21(24):3365–9. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00334-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00334-7)

255. Knopf J, Magorivska I, Maler JM, Spitzer P, Bilyy R, Biermann MHC, Hychka K et al. Low amounts of bisecting glycans characterize cerebrospinal fluid-borne IgG. *J Neuroimmunol*. 2018;320:19–24.
256. Lomakin Y, Kudriaeva A, Kostin N, Terekhov S, Kaminskaya A, Chernov A, et al. Diagnostics of autoimmune neurodegeneration using fluorescent probing. *Sci Rep*. 2018;8(1):12679. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30938-0>
257. Zhou Y, Simpson S Jr, Charlesworth JC, van der Mei I, Lucas RM, Ponsonby A-L, et al. Variation within MBP gene predicts disease course in multiple sclerosis. *Brain Behav*. 2017;7(4):e00670. <https://doi.org/10.1002/brb3.670>
258. Herrmann, M., Mahorivska, I., Munoz, L., Janko, C., Rech, J., Bilyy, R., Schett, G. (2013, April). Sialylation of anti-histone IgG from patients with systemic lupus erythematosus determines their functional capabilities. In *INTERNIST* (Vol. 54, pp. 53-53). 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA: SPRINGER.
259. Miljković D, Spasojević I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(18):2286–334.