

АНОТАЦІЯ

Бойчук М.О. Клініко-діагностичні особливості перебігу розсіяного склерозу з урахуванням глікозилювання молекул імуноглобулінів крові.- Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина. – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2021.

Незважаючи на велику кількість нейроімунологічних досліджень, етіологія та патогенез розсіяного склерозу (РС) ще не до кінця зрозумілі і остаточно не з'ясовані. Тому пошук нових патогенетичних механізмів розвитку цього захворювання та надійних біомаркерів його діагностики, клінічного перебігу та відповіді на терапію є одним із ключових завдань неврології на сучасному етапі. Це дозволить призначати на ранніх стадіях патогенетичне лікування, яке спрямоване на зниження гостроти процесу, ефективне попередження рецидивів, подовження тривалості ремісій, уповільнення темпів інвалідизації, а, отже, підвищення функціональної активності, покращення якості життя та соціально-економічних чинників хворих, включаючи скорочення термінів перебування пацієнтів в умовах неврологічного стаціонару.

У дисертаційній роботі узагальнено основні результати проведених комплексних клініко-неврологічних та імунологічних досліджень глікозильних детермінант IgG сироватки крові як діагностичних маркерів при РС, запропоновано нові методи діагностики РС та оптимізації лікування пацієнтів за різних умов перебігу хвороби та стратегій терапії.

У науковій роботі викладено статистичний аналіз результатів клініко-неврологічного, радіологічного (МРТ-обстеження) та імунобіологічного обстеження 75-ти хворих на РС різного віку і 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 2017 по 2021 роки та 23 практично здорових осіб відповідного віку та статі (ЗД). Імунобіологічні лабораторні дослідження сироватки крові були проведені на кафедрі гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Також здійснили ретроспективний клінічний аналіз стану і динаміки госпіталізацій 1206 хворих на РС жителів м. Львова та Львівської області, які перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні неврології Львівської обласної клінічної лікарні (ЛОКЛ) за період з 2012 по 2016 рр.

На першому етапі наукової роботи провели поглиблену персоніфіковану оцінку стану госпіталізацій з приводу РС жителів Львівської області у 2012-2016 роках, проаналізувавши 1512 «Медичних карт стаціонарного хворого (ф № 033/о), заповнених на 1206 хворих на РС, які стаціонарно лікувалися з приводу цього захворювання у відділенні неврології ЛОКЛ протягом досліджуваного періоду з метою характеристики розподілу за тяжкістю хвороби, статтю та віком хворих на РС, а також виявлення чинників, що впливають на тривалість госпіталізації.

На другому етапі власних досліджень вивчали особливості клінічного перебігу РС з метою оцінки активності та прогресування патологічного процесу, порівнювали розподіл обстежених чоловіків і жінок за віковими групами та залежно від тривалості й ступеня тяжкості захворювання на РС. Для вирішення цього завдання було проведено клініко-неврологічний аналіз захворювання на РС у 75-ти хворих, поділених на групи за тривалістю та тяжкістю захворювання, а також стадією патологічного процесу (загострення або ремісія).

На третьому етапі представленої дисертаційної роботи було вивчено вплив препаратів хворобомодифікуючої терапії та глюкокортикоїдів на

вираженість імунної відповіді при РС. Провели аналіз глікозилування імуноглобулінів IgG у сироватках крові 75-ти хворих на РС, описаних на другому етапі. Для дослідження використали групи хворих на РС із шістьма різними типами терапії (первинні хворі, які не отримували жодної терапії; хворі на РС, які більше двох років отримували хворобомодифікуючу терапію препаратами з групи інтерферонів β -1b (ІФН); особи після пульс-терапії метилпреднізолоном (МП) дозою 1000 мг внутрішньовенно впродовж 5-7 днів; хворі на РС, які отримували терапію препаратом з групи моноклональних антитіл, а саме – окрелізумабом (ОК) дозою 600 мг внутрішньовенно, частотою 1 раз на 6 місяців, впродовж двох років; особи, які перебували на лікуванні препаратом глатирамеру ацетатом (ГА) дозою 40 мг тричі на тиждень, впродовж двох років; хворі на РС, які отримували лікування препаратом терифлуномід (ТФ) у дозі 14 мг при прийомі один раз на добу, впродовж останніх двох років). Визначали також вміст антитіл до основного білка мієліну (ОБМ) та вміст імунних комплексів IgG – IgM у сироватці крові цих пацієнтів.

На четвертому етапі дисертаційної роботи здійснювався пошук надійних і високоспецифічних біомаркерів РС з метою скорочення терміну діагностичного пошуку та визначення оптимальної медикаментозної тактики при цьому захворюванні. Вивчали зміни глікозилування імуноглобулінів при РС та їх використання як діагностичного та прогностичного біомаркера при цьому захворюванні. Основним методом аналізу глікозилування імуноглобулінів, використаним в роботі, є метод лектин-імуноферментного аналізу розроблений Львівською лектинологічною школою у співпраці з групою проф. Германа, Університетська клініка м. Ерланген. Цей метод був порівняний з аналізом гліканів методом капілярного електрофорезу лазер-індукованої флуоресценції, який сьогодні вважається одним з найточніших для виявлення індивідуальних гліканів. Обидва методи показали високу чутливість у виявленні патологічних гліканів у хворих з аутоімунними захворюваннями. Водночас, перевагою лектин-імуноферментного аналізу є

здатність виявляти нативні форми гліканів у складі молекул імуноглобулінів G, в той час, як інші доступні методи вимагають денатурації молекул і, відповідно, руйнування нативних глікоконформацій. Паралельне використання вказаних двох методів дозволило виявити той факт, що лектин LCA віддає перевагу у зв'язуванні гліканів, що містять бісектуючий залишок глюкозаміну, і вміст вказаних форм зростає при аутоімунних розладах. Цей факт раніше був невідомим і має важливе значення в уточненні протоколів для розпізнавання бісектуючих гліканів у складі молекул імуноглобулінів.

Для дослідження кореляції експонування гліканів, що було виявлено за допомогою лектин-ІФА, провели порівняння отриманих показників лектин-ІФА-аналізу із даними щодо вмісту окремих гліканових фракцій виділених методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції (КЕ-ІЛФ). Суть методу полягає у від'єднанні усіх N-гліканів від молекули IgG та наступному їх міченню флуоресцентним агентом з розділенням шляхом електрофорезу в капілярі та детекції гліканів за допомогою індукованої лазером флуоресценції відповідної приєднаної мітки. Отримані нами значення вмісту глікоформ для 23 здорових донорів, порівняли із відповідними значеннями КЕ-ІЛФ. Також, як позитивний контроль змін гліканів проаналізували обома методами вибірки імуноглобулінів, отримані для аутоімунних захворювань, які, як відомо, супроводжуються утворенням специфічних аутоантитіл (тобто є серопозитивними), і для яких відомі зміни гліканів цих антитіл – це системний червоний вовчак та серопозитивний ревматоїдний артрит, а також зразки сироваток хворих із аутоімунними захворюваннями, що не залежать від специфічних аутоантитіл (серонегативний ревматоїдний артрит). Ці зразки були надані Лабораторією аутоімунних захворювань Медичного центру при Університеті Фрідріха-Александра (ФРН) у рамках договору про співпрацю.

Аналіз неврологічного симптомокомплексу у хворих на РС проводився з урахуванням клініко-інструментального обстеження, характеристики їх скарг і даних неврологічного статусу. Для встановлення діагнозу РС користувалися переглянутими критеріями McDonald et al. 2017 року. Був здійснений детальний неврологічний 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). Згідно з оцінкою за шкалою EDSS виділяли три ступені тяжкості захворювання: легкому ступеню відповідали 0-3,5 бали за шкалою EDSS, середньому ступеню – 4,0-5,5 балів, а тяжкому – 6-9,0 балів цієї шкали. Оцінка неврологічного статусу проводилась за стандартизованою методикою з визначенням вищих мозкових функцій, функцій черепно-мозкових нервів, 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; визначення двомірно-просторової чутливості та стереогнозису), а також функцій статичної та координації рухів. У оглянутих пацієнтів було виключено патологію інших органів та систем, що могло вплинути на результати проведених імунологічних тестів.

Імунобіологічні методи дослідження включали визначення загального вмісту імуноглобулінів IgG та асоційованих імунних комплексів у зразках сироватки крові хворих на РС, визначення антитіл до основного білка мієліну (анти-ОБМ), визначення вмісту антитіл для вторинно-некротичних клітин, лектин-імуноферментний аналіз для визначення глікозилування імуноглобулінів, визначення гліканів методом капілярного електрофорезу – індукованої лазером флуоресценції, визначення еластази нейтрофілів у сироватці крові.

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 Стьюдента (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 6 груп з різним типом терапії). Специфічність та чутливість ознак у випадку використання як маркерів розраховували шляхом обрахунку ROC-кривої (також відомої як «крива помилок»), для якої оцінювали площу під кривою, похибку та її достовірність. Статистична обробка матеріалів проводилась за допомогою комп'ютерної програми Statistica 10.0. Для перевірки нормальності розподілу кількісних даних вибірок із числом спостережень до 100 одиниць застосовували критерії Колмогорова-Смірнова, Лілієфорда та Шапіро-Уїлка. Вірогідність різниці між двома середніми величинами, отриманими із вибірок із числом варіант до 100, визначалась при нормальному розподілі за допомогою t -тесту, а при відсутності «нормальності розподілу» – U -критерію Манна-Уїтні. Вірогідність різниці між двома і більше відносними показниками, визначалась за допомогою точного тесту Фішера із Metropolis алгоритмом. Для встановлення кореляційних залежностей між показниками двох вибірок обчислювали непараметричний коефіцієнт кореляції Кендалл-Тау (τ) та його похибку (m_τ). Визначення чинників, які обумовлюють тривалість одного випадку стаціонарного лікування, проводили за допомогою методу множинної регресії. Залежною змінною величиною (y) у рівняннях множинної регресії була тривалість одного випадку стаціонарного лікування, а незалежними змінними (x) – відповідні показники віку (у роках) та статі (чоловіки-1, жінки-2) госпіталізованих.

Виконані дослідження із використанням біологічних зразків, одержаних від донорів і пацієнтів клінічних установ, здійснювали за погодженням Комісією з питань етики ЛНМУ імені Данила Галицького, протокол 5 від 23.02.2017 року та з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської 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.

У дисертаційній роботі на підставі проведених комплексних клініко-неврологічних та імунобіологічних досліджень представлено новий підхід щодо покращення діагностики розсіяного склерозу та визначення нових прогностичних біомаркерів цього захворювання з метою оптимізації лікувального процесу в умовах неврологічних стаціонарів. З'ясовано причину зміни глікозильних детермінант при РС – показано, що вони пов'язані з появою циркулюючих нейтрофільних позаклітинних пасток в кровотоці. Запропоновано використання детекції експонування глікозильних детермінант на молекулах IgG як біомаркера РС. Це відкриває можливості до кращого розуміння патогенезу РС, об'єктивної оцінки особливостей його клінічного перебігу, правильного прогнозування та обрання коректної та ефективної лікувальної стратегії.

Серед госпіталізованих хворих 32,50 % становили чоловіки і 67,50 % жінки у віці від 18 до 71 року. Серед чоловіків більше було осіб молодого віку (74,49%), ніж серед жінок ($p < 0,05$). Завдяки оптимізації діагностичного процесу у відділенні вдалося вірогідно знизити середню тривалість одного випадку стаціонарного лікування з приводу РС, як серед хворих обох статей (коефіцієнт кореляції Кендалл-Тау $\tau = -0,80$, $p < 0,05$), так і окремо серед чоловіків ($\tau = -0,80$, $p < 0,05$) та жінок ($\tau = -0,80$, $p < 0,05$). З 2012 по 2016 рр. середня тривалість одного випадку стаціонарного лікування з приводу РС

вірогідно знизилась у госпіталізованих обох статей на 23,39% (з $11,63 \pm 0,38$ до $8,90 \pm 0,23$ днів, $p < 0,001$). Спостерігали вірогідну тенденцію до зниження ($\tau = -0,80$, $p < 0,05$) середньої тривалості одного первинного випадку госпіталізації як у всіх хворих (з $11,92 \pm 0,42$ до $8,82 \pm 0,27$ днів), так і окремо серед чоловіків (з $12,48 \pm 0,85$ до $8,72 \pm 0,44$ днів, $p < 0,01$) та жінок (з $11,64 \pm 0,47$ до $9,78 \pm 0,16$ днів, $p < 0,05$) із встановленим діагнозом РС.

При клініко-неврологічному обстеженні 75-ти хворих на РС як серед чоловіків так і серед жінок переважали молоді особи у віці 18-44 роки ($65,63\% \pm 8,40\%$ у чоловіків та $69,77 \pm 7,00\%$ у жінок, при $p < 0,001$). Виявлено статистично вірогідні позитивні кореляційні зв'язки середньої сили між ступенем тяжкості РС та тривалістю хвороби ($\tau = 0,36$, $p < 0,001$), а також між ступенем тяжкості РС та віком обстежених ($\tau = -0,39$, $p < 0,001$). Досліджувана група пацієнтів із РС мала типові клінічні характеристики цього захворювання, які відповідають даним літератури, що було важливим для проведення наступних етапів імунобіологічних досліджень.

Рівень аутоантитіл класу IgG до основного білка мієліну (анти-ОБМ-IgG) був підвищений у нелікованих пацієнтів у порівнянні із групою здорових донорів ($p < 0,01$). Рівень аутоантитіл класу IgM (анти-ОБМ-IgM) був значно підвищений у групі нелікованих пацієнтів та пацієнтів на терапії окрелізумабом ($p < 0,01$). Найнижчий рівень антитіл анти-ОБМ-IgM спостерігався в групі пацієнтів із РС на терапії інтерфероном- $\beta 1B$, де він знижувався до базового рівня притаманного ЗД. Вміст імунних комплексів (ІК IgM-IgG) у хворих на РС на терапії метилпреднізолоном був достовірно вищим ($p < 0,01$) у порівнянні з групою ЗД. Визначення вмісту антитіл до вторинно-некротичних клітин показало, що лише у трьох з 75-ти пацієнтів із РС захворювання є вторинним наслідком системних аутоімунних порушень, в той час, як у більшості пацієнтів – це результат первинного аутоімунного ураження ЦНС.

У сироватці крові хворих на РС виявляються антитіла, які за спектром глікозилування відповідають профілю прозапальних аутоантитіл, відомих

при інших аутоімунних захворюваннях. У зразках сироваток крові пацієнтів із серопозитивними аутоімунними захворюваннями (АІЗ) спостерігали зростання експонування гліканів на імуноглобулінах IgG, що розпізнаються лектинами LCA ($p < 0,001$) та AAL ($p < 0,01$). Аналіз гліканів IgG сироватки за допомогою капілярного електрофорезу та індукованої лазером флуоресценції (KE-ІЛФ) показав зростання рівня гліканів FA2BG2 на IgG та зменшення кількості глікану FA2(3)G1S1 на IgG при АІЗ. Поєднання цих двох маркерів дозволяє чітко дискримінувати популяції здорових донорів та пацієнтів із серопозитивними АІЗ. Гліканові маркери на IgG у хворих на РС вказують на їх приналежність до групи АІЗ.

Лектин-імуноферментний аналіз гліканів імуноглобулінів IgG показав зростання експонування залишків сілової кислоти (ліганд лектину SNA) у групі пацієнтів на терапії інтерфероном- β 1В ($0,295 \pm 0,017$ у.о., $p < 0,01$), метилпреднізолоном ($0,296 \pm 0,014$ у.о., $p < 0,01$) та ГА ($0,300 \pm 0,021$ у.о., $p < 0,01$) у порівнянні із значеннями 23-х здорових донорів ($0,22 \pm 0,005$ у.о.). Вміст бісектуючих фукозильованих N-гліканів IgG (ліганди лектину LCA) у нелікованих пацієнтів достовірно відрізнявся від значень у групах пацієнтів, які перебували на терапії ІФН ($0,259 \pm 0,020$ у.о., $p < 0,001$) та ГА ($0,244 \pm 0,023$ у.о., $p < 0,01$), в яких він був підвищений.

Виявлення гліканових маркерів IgG за допомогою лектин-імуноферментного аналізу з використанням лектину AAL дозволило дискримінувати усі досліджувані групи хворих на РС (включаючи нелікованих пацієнтів) від ЗД ($p > 0,05$). Виявлено маркер, що дозволяє дискримінувати хворих на РС – фукозовмісний N-глікан (ліганд) лектину AAL на молекулах IgG. Поєднання цього маркеру (ліганду лектину AAL) з іншим маркером – лігандом лектину PSqL дозволяє не лише дискримінувати групи хворих на РС та ЗД (AAL-/PSqL-), а й розрізнити групи хворих на РС з різним типом терапії, зокрема ІФН (AAL++/PSqL+) і метилпреднізолоном (AAL+/PSqL++).

Для гліканових маркерів – лігандів лектинів AAL, SNA та комбінації PSqL/AAL оцінено криву специфічності та чутливості з метою дискримінувати хворих на РС від ЗД. Обрахована площа під кривою (AUROC) становила для SNA: $R=0,713\pm 0,050$, $p=0,0021$, для PSqL/AAL: $R=0,824\pm 0,044$, $p<0,0001$, для AAL - $R=0,906\pm 0,029$, $p<0,0001$. Чутливість маркеру AAL становила - 76,1%, специфічність - 59,03%. Ці показники перевищують інші наявні діагностичні маркери РС, а їх поєднання з клінічними даними та іншими незалежними показниками може суттєво покращити підтвердження діагнозу РС.

Одним з можливих чинників, що спричиняють зміну гліканових детермінант на імуноглобулінах можуть слугувати гідролітичні ензими вивільнені лейкоцитами при хронічному аутоімунному захворюванні. Спостерігали зростання рівня ферментативної активності еластази нейтрофілів у сироватці крові хворих на терапії метилпреднізолоном, яке було достовірно вищим ніж у здорових донорів ($p<0,05$). Між рівнем активності еластази нейтрофілів та експонуванням фукозовмісних гліканів на IgG (ліганди лектину PSqL) спостерігалась достовірна позитивна кореляція слабої сили ($r=0,353$, $p<0,001$). Пряма взаємодія *in vitro* нейтрофільних позаклітинних пасток, декорованих еластазою нейтрофілів, з імуноглобулінами IgG призводила до зміни їх гліканових компонентів. Еластаза нейтрофілів може бути одним із чинників, які руйнуючи імунні комплекси, призводить до експонування прихованих глікозильних детермінант і може слугувати маркером патологічного процесу при РС і способом оцінки ефективності проведеної терапії.

Ключові слова: розсіяний склероз, біомаркери, імуноглобуліни, глікозилування, еластаза нейтрофілів, діагностика, лікування.

ANNOTATION

Boichuk M.O. Clinical and diagnostic features of multiple sclerosis course taking into account the glycosylation of blood immunoglobulin molecules. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on obtaining a degree of the doctor of philosophy on a specialty 222 - Medicine. - Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Healthcare of Ukraine, Lviv, 2021.

Despite extensive neuroimmunological studies, the etiology and pathogenesis of multiple sclerosis (MS) are not yet fully understood and definitively elucidated. Therefore, the search for new pathogenetic mechanisms of this disease and reliable biomarkers of its diagnosis, clinical course and response to therapy is one of the key tasks of neurology at the present stage. This will allow the administration of pathogenetic treatment at the early stages, which aims to reduce the severity of the pathological process, effectively prevents recurrence, prolongs remission, slows down the rate of disability, and, consequently, increases functional activity, improves quality of life and socioeconomic factors, including reduced length of patients' stay in a neurological department.

The dissertation summarizes the main results of complex clinical-neurological and immunological studies of glycosyl determinants of serum IgG as diagnostic markers in MS, also we offered new methods for diagnosing MS and optimizing treatment of patients with different disease's course and therapeutic strategies.

The scientific work presents a statistical analysis of the results of clinical-neurological, radiological (MRI) and immunobiological examination of 75 patients with MS with different ages and sex, who underwent comprehensive outpatient or inpatient treatment at the Department of Neurology of the Danylo Halytsky Lviv National Medical University (also at the Neurological department of the Lviv regional clinical hospital) during the period 2017-2021 and 23 healthy individuals of the corresponding age and sex. Immunobiological laboratory tests with serum

were conducted at the Department of Histology, Cytology and Embryology of the Danylo Halytsky Lviv National Medical University. We also performed a retrospective clinical analysis of the condition and dynamics of admission into the hospital among 1206 patients with MS from Lviv and Lviv region, who were hospitalized in the Department of neurology of Lviv regional clinical hospital during 2012-2016.

At the first stage of scientific work we conducted an in-depth personalized assessment of the state of hospitalization for MS among residents of Lviv region for the period 2012-2016, analyzing 1512 medical inpatient cards (form № 033/o), filed for 1206 persons with MS who were treated in hospital due to this disease in the Department of Neurology during the studied period in order to characterize the distribution by severity of the disease, gender and age of patients with MS, as well as to identify factors influencing the duration of hospital stay.

In the second stage of our own research we studied the features of the clinical course of MS to assess the activity and progression of the pathological process, comparing the distribution of examined men and women by age groups and depending on the duration and severity of MS. To solve this problem, a clinical and neurological analysis of MS was performed in 75 patients, divided into groups according to the duration and severity of the disease, as well as the stage of the pathological process (exacerbation or remission).

At the third stage of the presented work the influence of disease-modifying therapy and glucocorticoids upon the severity of the immune response in MS was studied. The glycosylation of IgG immunoglobulins was analyzed in the sera of 75 MS patients described in the second stage. In the study we used groups of MS patients with six different types of therapy – primary patients who did not receive any therapy; MS patients who received treatment for more than two years with drugs from the group of interferons β -1b (IFN); persons after pulse therapy with methylprednisolone (MP) with a daily dose 1000 mg intravenously for 5-7 days; patients with MS who received therapy with a drug from the group of monoclonal

antibodies, namely, ocrelizumab (OC) with a dose 600 mg intravenously, once every 6 months, for 2 years; persons treated with glatiramer acetate (HA) with a dose 40 mg three times a week for 2 years; patients with MS who received treatment with teriflunomide (TF) with a dose 14 mg once a day for the last 2 years. The content of antibodies to the myelin basic protein (MBP) and the content of immune complexes IgG-IgM in the serum of these patients were also determined.

At the fourth stage of the study search for reliable and highly specific biomarkers of MS was carried out in order to reduce the time of diagnostic search and determine the optimal therapeutic tactics in this disease. Changes in glycosylation of immunoglobulins in MS and their use as a diagnostic and prognostic biomarker in this disease were studied. The main method of glycosylation analysis of immunoglobulins used in the work is the method of lectin enzyme-linked immunosorbent assay developed by the Lviv School of Lectinology in collaboration with the group of prof. Herrmann, University Clinic of Erlangen. This method was comparable to the analysis of glycans by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence, which is now considered one of the most accurate for the detection of individual glycans. Both methods have shown high sensitivity in the detection of pathological glycans in patients with autoimmune diseases. At the same time, the advantage of lectin enzyme-linked immunosorbent assay is the ability to detect native forms of glycans in the composition of immunoglobulin G molecules, while other available methods require denaturation of molecules and, consequently, the destruction of native glycoconformations. The parallel use of these two methods revealed the fact that the lectin LCA prefers to bind glycans containing a bisecting glucosamine residue, and the content of these forms increases in autoimmune disorders. This fact was previously unknown and is important in refining protocols for the recognition of bisecting glycans in the composition of immunoglobulin molecules.

To study the correlation of glycan exposure, which was detected using lectin-ELISA, we compared the obtained indicators of lectin-ELISA with data on the content of individual glycan fractions isolated by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence (CE-LIF). The essence of the method is to separate all N-glycans from the IgG molecule and then label them with a fluorescent agent with separation by capillary electrophoresis and detection of glycans using laser-induced fluorescence of the corresponding attached label. The values of glycoform content obtained for us for 23 healthy donors were compared with the corresponding values of CE-LIF. Also, as a positive control of glycan changes we analyzed using both methods of sampling immunoglobulins obtained for autoimmune diseases, which are known to be accompanied by the formation of specific autoantibodies (i.e. are seropositive), and for which are known glycan changes of these antibodies – SLE and seropositive rheumatoid arthritis, as well as serum samples from patients with autoimmune diseases that do not depend on specific autoantibodies (seronegative rheumatoid arthritis). These samples were provided by the Laboratory of Autoimmune Diseases of the Medical Center at the Friedrich-Alexander University (Germany) in accordance with a cooperation agreement.

The analysis of the neurological symptom complex in patients with MS was performed taking into account the clinical and instrumental examination, the characteristics of complaints and data of neurological status. The revised criteria of McDonald et al. (2017) were used to diagnose MS. A detailed neurological examination of patients with assessment of the degree of disability was performed using the Expanded Disability Status Scale (EDSS), which gives a notion of the degree of disability and severity of manifestations among patients, expressed in points – from 0 (normal) to 10 (death). According to the EDSS assessment, there were three degrees of severity of the disease: mild – 0-3.5 points, moderate – 4.0-5.5 points, and severe – 6-9.0 points according to this scale. Assessment of neurological status was performed according to standardized methods with the definition of higher cerebral functions, functions of cranial nerves, study of the

motor spectrum (active, passive movements, muscle strength of the upper and lower extremities, assessment of spasticity, physiological and pathological reflexes). examination of the sensorium (determination of pain, tactile, musculoskeletal, thermal sensation; determination of vibratory sensation using a tuning fork (frequency 128 Hz); determination of graphesthesia and stereognosis), as well as the functions of statics and coordination.

Immunobiological research methods included determination of total content of IgG immunoglobulins and associated immune complexes in serum samples from patients with MS, determination of antibodies to myelin basic protein (anti-MBP), determination of antibody content for secondary necrotic cells, lectin-ELISA for determination of immunoglobulin glycosylation, determination of glycans by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence, determination of neutrophil elastase in blood serum.

Statistical analysis of the data was performed using OriginPro (OriginLab), Prism7 (GraphPad) and Excel (Microsoft) software. The following criteria were used to assess the differences of the studied data sets: for parametric data – Student's t-test (even and odd), analysis of variance (ANOVA) to determine the relationship between many samples; for nonparametric data, we used the Mann-Whitney U-test to assess the relationship between the two populations, or the Dunn's multiple comparison test to compare all study groups (healthy donors and 6 groups with different types of therapy). The specificity and sensitivity of the traits when used as markers were calculated by calculating the ROC curve (also known as the "error curve"), for which the area under the curve, the error and its reliability were estimated. Statistical processing of materials was performed using the computer program Statistica 10.0. To check the normality of the distribution of quantitative data of samples with the number of observations up to 100 units, we used the criteria of Kolmogorov-Smirnov test, Liliefors test and Shapiro-Wilk test. The probability of the difference between the two averages obtained from samples with the number of variants up to 100 was determined in the normal distribution

using the t-test, and in the absence of "normal distribution" – using the Mann-Whitney U-test. The probability of the difference between two or more relative indicators was determined using Fisher's exact test with the Metropolis algorithm. To establish the correlations between the indicators of the two samples, the nonparametric Kendall rank correlation coefficient (τ) and its error ($m\tau$) were calculated. Determining the factors that determine the duration of one case of inpatient treatment was performed using the multiple regression analysis. The dependent variable (y) in the multiple regression equations was the duration of one inpatient treatment, and the independent variables (x) were the corresponding indicators of age (in years) and sex (men – 1, women – 2) of the hospitalized persons.

Studies performed using biological samples obtained from donors and patients of clinical institutions were carried out in agreement with the Ethics Commission of Danylo Halytsky Lviv National Medical University (minute #5 dated February 23, 2017) and in compliance with the main provisions of the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, Helsinki Declaration of the World Medical Association on ethical principles regarding conducting scientific medical research with human participation (dated 1964, with further additions, including the version from 2000) and the Order of the Ministry of Health of Ukraine #690 (dated September 23, 2009).

In the dissertation work on the basis of complex clinical-neurological and immunobiological researches the new approach on improvement of MS diagnostics and definition of new prognostic biomarkers of this disease for the purpose of optimization of medical process in the conditions of neurological departments is presented. The cause of changes in glycosyl determinants in MS has been clarified - they have been shown to be associated with the appearance of circulating neutrophilic extracellular traps in the bloodstream. The use of detection of exposure to glycosyl determinants on IgG molecules as a biomarker of MS is proposed. This opens up opportunities for a better understanding of the

pathogenesis in the disease, an objective assessment of the features of its clinical course, the correct prediction and selection of a correct and effective treatment strategy.

Among the hospitalized patients 32.50% were men and 67.50% were women aged 18-71 years. There were more young people (74.49%) among men than among women ($p < 0.05$). Due to the optimization of the diagnostic process in the hospital department it was possible to reduce the average duration of one case of inpatient treatment for MS, as among patients of both sexes (Kendall-Tau correlation coefficient $\tau = -0.80$, $p < 0.05$) and separately among men ($\tau = -0.80$, $p < 0.05$) and women ($\tau = -0.80$, $p < 0.05$). During 2012-2016, the average duration of one case of inpatient treatment for MS probably decreased in hospitalized both sexes by 23.39% (from 11.63 ± 0.38 down to 8.90 ± 0.23 days, $p < 0.001$). There was a probable tendency to decrease ($\tau = -0.80$, $p < 0.05$) the average duration of one primary case of hospitalization in all patients (from 11.92 ± 0.42 down to 8.82 ± 0.27 days), and separately among men (from 12.48 ± 0.85 down to 8.72 ± 0.44 days, $p < 0.01$) and women (from 11.64 ± 0.47 down to 9.78 ± 0.16 days, $p < 0.05$) with a diagnosis of MS.

During the clinical and neurological examination of 75 patients with MS, both men and women were dominated by young people aged 18-44 years ($65.63\% \pm 8.40\%$ among men and $69.77 \pm 7.00\%$ among women, $p < 0.001$). Statistically significant positive correlations of medium strength between the severity of MS and the duration of the disease ($\tau = 0.36$, $p < 0.001$), as well as between the severity of MS and the age of the subjects ($\tau = -0.39$, $p < 0.001$) were revealed. The study group of patients with MS had typical clinical characteristics of this disease, which correspond to the literature, which was important for the next stages of immunobiological studies.

The level of autoantibodies from the IgG class to the myelin basic protein (anti-MBP-IgG) was increased in untreated patients compared with the group of healthy donors ($p < 0.01$). The level of autoantibodies from the IgM class (anti-

MBP-IgM) was significantly increased in the group of untreated patients and patients treated with ocrelizumab ($p < 0.01$). The lowest level of anti-MBP-IgM antibodies was observed in the group of patients with MS treated with interferon- β 1B, where it decreased to the baseline level inherent in healthy state. The content of immune complexes (IC IgM-IgG) among patients with MS on methylprednisolone therapy was significantly higher ($p < 0.01$) compared with the healthy group. Determination of antibodies to secondary necrotic cells showed that only three of 75 patients with MS had a secondary consequence of systemic autoimmune disorders, while in most patients it was the result of primary autoimmune CNS damage.

In the serum of patients with MS antibodies are detected, which on the glycosylation spectrum correspond to the profile of pro-inflammatory autoantibodies known in other autoimmune diseases. An increase in glycan exposure to IgG immunoglobulins recognized by lectins LCA ($p < 0.001$) and AAL ($p < 0.01$) was observed in serum samples of patients with seropositive autoimmune diseases (AID). Analysis of serum IgG glycans by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence (CE-LIF) showed an increase in the level of FA2BG2 glycans on IgG and a decrease in the amount of glycan FA2(3)G1S1 on IgG in AID. The combination of these two markers clearly discriminates populations of healthy donors and patients with seropositive AID. Glycan markers on IgG in patients with MS indicate their belonging to the AID group.

Lectin-ELISA of IgG immunoglobulin glycans showed an increase in exposure to sialic acid residues (lectin SNA ligand) in the group of patients treated with interferon- β 1B (0.295 ± 0.017 c.u., $p < 0.01$), methylprednisolone (0.296 ± 0.014 c.u., $p < 0.01$) and HA (0.300 ± 0.021 c.u., $p < 0.01$) compared with the values of 23 healthy donors (0.22 ± 0.005 c.u.). The content of bisecting fucosylated N-glycans IgG (LCA lectins) in untreated patients differed significantly from the values in the groups of patients treated with IFN (0.259 ± 0.020 c.u., $p < 0.001$) and HA (0.244 ± 0.023 c.u., $p < 0.01$), where it was increased.

Detection of glycan markers IgG by lectin-enzyme-linked immunosorbent assay using lectin AAL allowed to discriminate all study groups of patients with MS (including untreated patients) from the healthy ones ($p > 0.05$). A marker that allows to discriminate patients with MS - fucose-containing N-glycan (ligand) of lectin AAL on IgG molecules. The combination of this marker (lectin AAL ligand) with another marker – ligand PSqL allows not only to discriminate groups of patients with MS and healthy ones (AAL-/PSqL-), but also to distinguish groups of patients with MS on the different types of therapy, including IFN (AAL++/PSqL+) and methylprednisolone (AAL+/PSqL++).

For glycan markers – ligands of lectins AAL, SNA and combination PSqL/AAL, a curve of specificity and sensitivity was evaluated in order to discriminate patients with MS from healthy ones. The calculated area under the curve (AUROC) was for SNA: $R = 0.713 \pm 0.050$, $p = 0.0021$, for PSqL / AAL: $R = 0.824 \pm 0.044$, $p < 0.0001$, for AAL - $R = 0.906 \pm 0.029$, $p < 0.0001$. The sensitivity of the AAL marker was - 76.1%, specificity - 59.03%. These values exceed other available diagnostic markers of MS, and their combination with clinical data and other independent indicators can significantly improve the confirmation of the diagnosis.

One of the possible factors causing the change of glycan determinants on immunoglobulins may be hydrolytic enzymes released by leukocytes in chronic autoimmune disease. An increase in the level of enzymatic activity of neutrophil elastase in the serum of patients on methylprednisolone therapy was observed, which was significantly higher than in healthy donors ($p < 0.05$). A significant positive correlation of weak strength ($r = 0.353$, $p < 0.001$) was observed between the level of neutrophil elastase activity and exposure to fucose-containing glycans on IgG (PSqL lectin ligands). Direct interaction of in vitro neutrophilic extracellular traps decorated with neutrophil elastase with IgG immunoglobulins led to changes in their glycan components.

Neutrophil elastase may be one of the factors that destroys immune complexes, leads to exposure to hidden glycosyl determinants and can serve as a marker of the pathological process in MS and a way to assess the effectiveness of therapy.

Key words: multiple sclerosis, biomarkers, immunoglobulins, glycosylation, neutrophil elastase, diagnosis, treatment.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Magorivska I, Dönczö B, Dumych T, Karmash A, **Boichuk M**, Hychka K, Mihalj M, Szabó M, Csánky E, Rech J, Guttman A, Vari S & Bilyy R. Glycosylation of random IgG distinguishes seropositive and seronegative rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 2018, 51:3, 111-117. (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).
2. Гичка КМ, **Бойчук МО**, Думич ТІ, Парижак СЯ, Білий РО, Негрич ТІ. Оцінка ефективності терапії інтерфероном β -1b на рівень та патологічну природу імуноглобулінів IgG у хворих на розсіяний склероз. *Запорожський медичний журнал* 2018; №6 (111), 762-767. (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).
3. Paryzhak S, Dumych T, Mahorivska I, **Boichuk M**, Bila G, Peshkova S, Nehrych T, Bilyy R. Neutrophil-released enzymes can influence composition of circulating immune complexes in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, 2018, Volume 51 Issue 6. (Особистий внесок – брала участь у формулюванні ідеї та гіпотези роботи, проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).
4. **Бойчук МО**. Від ефективної діагностики розсіяного склерозу та вчасного лікування його загострень до покращення статистичних показників перебування в спеціалізованому медичному закладі. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2018; (100): 126-132.
5. **Бойчук МО**. Вплив місця проживання та гендерних ознак на розвиток розсіяного склерозу на прикладі жителів Львівської області. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2018; (101): 102-110.
6. **Бойчук МО**, Білий РО, Негрич ТІ. Аналіз вмісту імунних комплексів у сироватці хворих на розсіяний склероз з урахуванням патогенетичної і хворобомодифікуючої терапії. *Прикарпатський вісник НТШ Пульс*. 2019; (57):114-118. (Особистий внесок – брала участь у формулюванні мети

роботи, проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті)

7. **Бойчук М.О.**, Негрич Т.І., Білий Р.О. Прогностичне значення дослідження експонування глікозильних детермінант на молекулах імуноглобулінів IgG у сироватці крові хворих на розсіяний склероз залежно від проведеної медикаментозної терапії. Міжнародний неврологічний журнал. 2020; Том 16, №5: 27-33. (Особистий внесок – брала участь у формулюванні ідеї та гіпотези роботи, проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті)
8. M. Bozhenko, **M. Boichuk**, G. Bila, T.Nehrych, R.Bilyy Freezing Influences, the exposure of IgG glycans in Sera from Multiple Sclerosis Patients. ISSN 2409-4943. Ukr Biochem J. 2020, Vol 92, №2: 21-31. (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці статті).

Тези доповідей:

9. Paryzhak S, **Boichuk M**, Dumych T, Hychka K, Herrmann M, Munoz L, Nehrych T, Bilyy R. Glycosylation of IgG in patients with multiple sclerosis at different treatment conditions. In: 9th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2017); 2017 Sept 8-11, Lviv. Lviv, 2017. p. 20. (Особистий внесок – брала участь у проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
10. **Бойчук МО**, Негрич ТІ. Розсіяний склероз і ревматологічні захворювання – діагностичні і диференціально-діагностичні аспекти. Школа клінічних нейронаук «Карпатські читання»; 2018 Черв 12-14; Ужгород. Ужгород, 2018. с. 17. (Особистий внесок – брала участь у проведенні літературного пошуку, визначенні мети роботи, проведенні досліджень, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
11. Paryzhak S, **Boichuk M**, Hychka K, Dumych T, Nehrych T, Bilyy R. Glycosylation of IgG serves as a marker of pathogenic autoantibodies at multiple sclerosis. In: 9th TriNet Meeting - RECOOP Annual Project Review

Meeting; 2018 Oct 11-14; Bratislava. Bratislava; 2018. p. 58. (Особистий внесок – брала участь у проведенні літературного пошуку, визначенні мети роботи, проведенні досліджень, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).

12. **Бойчук МО**, Білий РО, Негрич ТІ. Аналіз вмісту патогенних антитіл у сироватці крові хворих на розсіяний склероз. Тези доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини»; 2019 Бер 28-29; Харків. Харків; 2019. с.46-47. (Особистий внесок – брала участь у проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці тез до друку).

13. **Бойчук МО**, Білий РО, Негрич ТІ. Дослідження експонування глікозильних детермінант на молекулах імуноглобулінів IgG в сироватці крові хворих на розсіяний склероз. Тези доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини»; 2019 Бер 28-29; Харків. Харків; 2019. с.47-48. (Особистий внесок – брала участь у проведенні досліджень, обробці та узагальненні результатів, підготовці тез до друку).