

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии
Российской академии наук
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
«Городская клиническая больница имени В.М. Буянова
Департамента здравоохранения города Москвы»**

-На правах рукописи

ФОМИНЫХ ВЕРА ВЛАДИМИРОВНА

**АНАЛИЗ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

14.01.11 — Нервные болезни

03.03.01 – Физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

кандидат медицинских наук

Л.В. Брылев

доктор биологических наук

Н.В. Гуляева

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Характеристика аутоиммунных заболеваний ЦНС	11
1.1.1. Аутоиммунные энцефалиты (АЭ)	11
1.1.2. Рассеянный склероз (РС).....	27
1.1.3. Острый рассеянный энцефаломиелит (ОРЭМ).....	30
1.1.4. Оптикомиелит Девика и заболевания из спектра оптикомиелит-ассоциированных расстройств (ОМ).....	31
1.2. Нейровоспаление и нейродегенерация при аутоиммунных заболеваниях ЦНС	32
1.2.1. Нейровоспаление и нейродегенерация при РС	32
1.2.2. Нейровоспаление и нейродегенерация при ОРЭМ.....	37
1.2.3. Нейровоспаление и нейродегенерация при ОМ.....	37
1.2.4. Нейровоспаление и нейродегенерация при АЭ.....	39
1.2.5. Система оксида азота (NO) при РС	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1. Характеристика исследуемых групп больных и контрольной группы.....	51
2.2. Забор и хранение биологического материала.....	59
2.3. Биохимические методы исследования сыворотки крови и ЦСЖ.....	59
2.3.1. Определение метаболитов NO	59
2.3.2. Определение антител к поверхностным нейрональным антигенам	62
2.3.3. Определение уровня показателей нейровоспаления и нейродегенерации.....	62
2.4. Инструментальные методы обследования.....	63
2.4.1. ВидеоЭЭГ мониторинг	63
2.4.2. Анализ МРТ изображений.....	63
2.5. Статистическая обработка результатов исследования	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	65
3.1. Клинические характеристики пациентов с АЭ	65
3.2. Анализ маркеров воспаления и нейродегенерации у пациентов с АЭ, РС и в контрольной группе	72
3.3. Анализ МРТ в группе демиелинизирующих заболеваний ЦНС, корреляция данных МРТ с клиничко-биохимическими показателями.....	76
3.4. Анализ маркеров воспаления и нитрозотиолов у пациентов с разными формами демиелинизирующих заболеваний (РС, ОРЭМ, ОМ).....	77

3.5. Анализ маркеров нитрозативного стресса у пациентов с разными формами течения рассеянного склероза	79
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	83
4.1. АЭ: клиническая характеристика, нейровоспаление и нейродегенерация.....	83
4.2. Демиелинизирующие заболевания ЦНС: нейровоспаление и нейродегенерация.....	89
4.3. Активность системы NO при РС	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ.....	97
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	128
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. РАСШИРЕННАЯ ШКАЛА ИНВАЛИДИЗАЦИИ КУРТЦКЕ (EDSS)	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Нейроиммунология и нейроиммунные взаимодействия — одна из самых «горячих» тем физиологии нервной системы и неврологии в настоящее время, так как нейровоспаление считается важным звеном патогенеза многих церебральных патологий. Для формирования наиболее полного представления о функционировании клеток иммунной системы изучаются их физиологические функции в норме и при патологии [1]. В центральной нервной системе (ЦНС) процессы нейровоспаления и нейродегенерации в ряде случаев запускают друг друга и далее протекают параллельно, поэтому их изучение актуально для нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний. Наиболее полно взаимодействие и изменение данных процессов можно проследить при аутоиммунных заболеваниях ЦНС.

Аутоиммунные заболевания ЦНС (или иммуноопосредованные в отсутствие точно выделенного патологического антигена) — это спектр мультифакториальных заболеваний, при которых происходит повреждение ЦНС вследствие аутоиммунного острого или хронического воспалительного процесса. Ранее считалось, что активация иммунной системы является ведущим патогенетическим фактором при рассеянном склерозе (РС), остром рассеянном энцефаломиелите (ОРЭМ) и поражении ЦНС при системных заболеваниях. Однако сейчас спектр данных заболеваний расширен. Описаны группа аквапорин-4 (AQP4) ассоциированных синдромов, включая оптикомиелит Девика (ОМ), и группа аутоиммунных энцефалитов (АЭ) идиопатической и паранеопластической этиологии [2; 3]. С развитием магнитно-резонансной томографии (МРТ) и других высокотехнологичных методов данные заболевания стали диагностироваться раньше и чаще. Эти заболевания находятся в центре внимания «аутоиммунной неврологии» — одной из наиболее социально и экономически значимых областей современной неврологии в связи с высокой распространённостью среди лиц молодого возраста и потенциальной излечимостью.

На сегодняшний день наиболее полно изучен патогенез РС — демиелинизирующего заболевания ЦНС, одного из самых распространенных среди лиц молодого возраста [4]. Проявления РС крайне разнообразны, однако не существует достоверных маркеров, позволяющих диагностировать заболевание на ранней стадии, а также дифференцировать его от других аутоиммунных заболеваний ЦНС. Первостепенную роль в его патогенезе играют процессы нейровоспаления, однако именно с нейродегенеративными изменениями связано развитие стойкого неврологического дефицита и инвалидизации [5; 6]. При отсутствии специфического лечения РС приобретает прогрессирующий характер с преобладанием процессов нейродегенерации, в связи с чем ранняя диагностика и терапия имеют важное

социально-экономическое значение [7]. Именно при РС и ОРЭМ наиболее полно изучен механизм активации иммунной системы против антигена по механизму Т или В-клеточного иммунного ответа [8]. При РС также достаточно подробно изучена нейродегенерация: специфичными маркерами считаются легкие и тяжелые цепи нейрофиламентов [9], β -амилоид [10]. Отдельная роль отводится оксиду азота (NO): показана его роль в развитии процессов нейродегенерации, воспаления, нарушении проницаемости гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) и демиелинизации в экспериментальных работах на животных и при РС. Большая часть данных получена при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите и на аутопсийном материале, тогда как результаты по исследованию состояния нитрергической системы в биологических жидкостях противоречивы (для нитратов/нитритов (NOx)) или немногочисленны (для нитрованных по тирозину белков (НТБ) и нитрозотиолов (RSNO)). Анализ компонентов системы NO при РС в соответствии с клиническими данными важен для понимания роли NO в патогенезе заболевания.

Помимо патофизиологических механизмов развития заболевания, важной проблемой является диагностика РС на ранней стадии и выявление маркеров течения заболевания. Картина МРТ и показатели олигоклонального синтеза могут быть одинаковыми при аутоиммунных заболеваниях, поэтому в ряде случаев диагноз может быть установлен только клинически при динамическом наблюдении с учетом всех инструментальных и лабораторных исследований [11; 12].

При ОМ и АЭ процессы нейровоспаления и нейродегенерации изучены неполно, либо проведена интерполяция процессов по аналогии с происходящими при РС [13]. При ОМ в большей степени описаны процессы астроцитопатии вследствие взаимодействия антител с AQP4, в меньшей степени — процессы нейродегенерации [14]. Кроме того, отмечается сайт-специфичность патологий с характерным поражением определенного отдела ЦНС: спинного мозга (СМ) и зрительных нервов при ОМ и массивное поражение полушарий головного мозга при ОРЭМ или диффузное поражение головного мозга при АЭ, зачастую без изменений, видимых при МРТ.

Таким образом, остается крайне актуальным комплексное рассмотрение данных патологий в рамках проблемы «аутоиммунной неврологии» с целью изучения физиологических механизмов, приводящих к повреждению структур нервной ткани, а также дифференциации патологических процессов в рамках различных заболеваний.

Отдельный интерес представляет группа АЭ — еще не охарактеризованная в российской популяции — диагностически сложная и разнородная по своим проявлениям и течению [15]. Ранее проводился анализ отдельных клинических случаев [16; 17], более полно охарактеризованы пациенты с паранеопластическими синдромами и поражением

периферической нервной системы [18; 19], однако анализ когорты пациентов с поражением ЦНС не проводился. При АЭ известные антитела выявляются только при 30–40 % АЭ, тогда как остальные случаи составляют «возможные АЭ» согласно критериям Graus et al. [20]. Однако подобная формулировка диагноза в ряде случаев затрудняет диагностику, а при резистентных, МР-негативных формах делает крайне затруднительным проведение иммуносупрессивной терапии ввиду отсутствия достаточных инструментальных данных, подтверждающих диагноз. Изучение процессов нейровоспаления и нейродегенерации, а также поиск маркеров данных процессов, крайне актуальны и имеют значение как для уточнения патогенеза аутоиммунных неврологических заболеваний, так и для уточнения клинических представлений о природе неврологического дефицита у конкретного больного, проведения дифференциального диагноза и прогнозирования темпа прогрессирования болезни.

Цель исследования

Провести анализ биохимических маркеров воспалительных и нейродегенеративных процессов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями ЦНС (РС, ОРЭМ, ОМ, АЭ) и поиск ассоциаций между биохимическими показателями и клиническими характеристиками.

Задачи работы

1. Охарактеризовать клинические особенности и вопросы сложности диагностики группы АЭ в рамках отобранной когорты пациентов в условиях неврологического отделения многопрофильного стационара (ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ»)
2. Определить наличие антител к поверхностным нейрональным антигенам и рибосомальному белку Р в ЦСЖ и сыворотке крови у пациентов с АЭ и РС, изучить взаимосвязь между наличием антител и клиническими особенностями
3. Исследовать биохимические маркеры нейродегенерации и воспаления у пациентов с АЭ и РС, изучить ассоциацию маркеров с особенностями клинической картины заболевания и их потенциальную прогностическую значимость
4. Исследовать биохимические маркеры нейродегенерации и воспаления у пациентов с демиелинизирующими заболеваниями: РС, ОРЭМ и ОМ, изучить ассоциацию маркеров с особенностями клинической картины заболевания
5. Исследовать состояние нитрергической системы у пациентов на разных стадиях РС (РРС и вторично-прогрессирующего течения РС, ВППС) в сравнении с ОРЭМ и контрольной группой.

Научная новизна

Впервые в российской популяции охарактеризована когорта пациентов с АЭ: спектр клинических проявлений, антител и биохимических маркеров нейровоспаления и нейродегенерации. Впервые использован дизайн исследования сравнения группы пациентов с АЭ с группой пациентов с демиелинизирующими заболеваниями. Показана активация процессов нейровоспаления и нейродегенерации у пациентов с данными патологиями ЦНС. Уточнены механизмы участия воспалительных процессов в патогенезе изучаемых заболеваний.

Впервые показана специфичность активации пути Ил-6 при данных патологиях и активация процессов нитрозилирования у пациентов с РС и наличием очагов в СМ, возможность использовать RSNO в качестве маркеров поражения СМ. Впервые охарактеризованы маркеры, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики АЭ (неоптерин) и оценки тяжести течения заболевания (уровень белка, фНФТ, Ил-6). На основании полученных результатов может быть проведена дальнейшая оценка прогностической значимости на больших популяциях.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы состоит в описании механизмов нейровоспаления и нейродегенерации как ключевых факторов патогенеза аутоиммунных заболеваний ЦНС. В данной работе показана активация процессов нейровоспаления и нейродегенерации у пациентов с данными заболеваниями. Впервые показана специфичность пути активации Ил-6 при разных патологиях и активация процессов нитрозилирования у пациентов с РС и наличием очагов в СМ, что может иметь теоретическое значение для понимания патогенеза этих заболеваний. Практическую значимость имеет показанная возможность использования RSNO в качестве маркера поражения СМ. Кроме того, охарактеризованы маркеры, которые можно использовать для дифференциальной диагностики АЭ (неоптерин) и оценки тяжести заболевания (уровень белка, фНФТ, Ил-6). Результаты работы (в том числе, проведенный анализ группы АЭ) могут помочь при дифференциальной диагностике, оценке выраженности процессов нейродегенерации и нейровоспаления в каждом конкретном случае, а также выявить причину необратимого неврологического дефицита и спрогнозировать тяжесть течения заболевания и степени инвалидизации пациента.

Методология и методы исследования

Объектом исследования были пациенты с АЭ и демиелинизирующими заболеваниями ЦНС. Всего в исследование были включены 226 больных и 79 участников контрольной группы. В группу пациентов входили больные с РС (n=169), ОРЭМ (n=21), ОМ (n=12), АЭ (n=24).

Проведен сбор анамнеза пациентов, неврологический осмотр, детальный анализ клинической картины, оценка уровня инвалидизации по шкале EDSS, стандартные скрининговые анализы, МРТ. Проведено исследование ЦСЖ и сыворотки крови при помощи анализа антител на клеточных культурах (биочипах), иммуноферментного анализа (ИФА), флуоро- и фотометрических методов измерений. Проводилась обработка МР-изображений при помощи программы количественного анализа (Msmatrix). Инструментальные данные и результаты лабораторных исследований сопоставлялись с клиническими характеристиками. Проводилась статистическая обработка результатов исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Впервые в российской популяции охарактеризована группа пациентов с аутоиммунным энцефалитом, в том числе спектр клинических проявлений, антител и особенности дифференциального диагноза.

2. Наличие олигоклонального синтеза иммуноглобулинов G указывает на вероятный паранеопластический генез энцефалита. Повышение уровня общего белка в ликворе может быть использовано в качестве прогностически неблагоприятного маркера течения аутоиммунного энцефалита.

3. Процессы нейровоспаления характерны для всех изученных заболеваний и связаны с модификацией системы интерлейкина-6.

4. Нейродегенерация характерна для рассеянного склероза, острого рассеянного энцефаломиелита, аутоиммунного энцефалита, однако ее выраженность взаимосвязана с типом заболевания и характером его течения. Максимальная активность процессов нейродегенерации и нейровоспаления наблюдается у пациентов с тяжелым течением аутоиммунного энцефалита.

5. На всех стадиях рассеянного склероза наблюдается активация нитрической системы, паттерн которой зависит от стадии течения заболевания и локализации поражения. Усиление процессов нитрозилирования ассоциировано с наличием очагов в спинном мозге.

6. Выявлен потенциальный маркер для дифференциальной диагностики аутоиммунных энцефалитов (неоптерин).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется значительным и достаточным для статистического анализа количеством наблюдений, четкой постановкой цели и задач, использованием в работе современных нейровизуализационных, нейрофизиологических методов обследования, биохимических методов анализа жидкостей, применением адекватных методов сбора, обработки данных и статистического анализа.

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на расширенном заседании лаборатории функциональной биохимии нервной системы, лаборатории молекулярной нейробиологии, лаборатории условных рефлексов и физиологии эмоций ФГБУН ИВНД и НФ РАН и неврологической службы ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» (Протокол No 1 от 13.02.2019 г.).

Материалы диссертации были представлены: Encephalitis Conference (Лондон, Англия, 3.12.2018), Конференция “Болезни мозга: от изучения механизмов к диагностике и лечению” (Москва, Россия, 12-13.04.2018), школе Общества по болезням движения «Myoclonic and other jerky movements» (Гронинген, Голландия, 13–14.10.2016); XXI Всероссийской конференции «Нейроиммунология. Рассеянный склероз” (Санкт-Петербург, Россия, 19–22.05.2016); Molecular Neurodegeneration Conference (Хинкстон, Великобритания, 29.11 – 4.12. 2015); на XIX, XX, XXI Школах-конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН, Москва, (27–28.10.2015, 31.10 – 1.11.2016, 30.09 – 1.10.2017), EFNS-ENS Joint Congress of European Neurology, Турция (31.05. – 3.06.2014).

Внедрение результатов работы

Полученные результаты внедрены в практику работы 1-го неврологического отделения и Межотделного центра рассеянного склероза № 1 ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ».

Публикации

По теме диссертации опубликована 21 печатная работа, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 7 статей в международных журналах, индексируемых в базе Web of Science/Scopus.

Личный вклад автора

Автору принадлежит определяющая роль в разработке дизайна и протоколов исследования, постановке задач, обосновании выводов и практических рекомендаций. Проработаны отечественные и зарубежные источники литературы по данной тематике. Самостоятельно был проведен отбор пациентов, осмотр, анализ клинических данных и заполнение шкал, сбор материала и биохимический анализ биологических жидкостей. Самостоятельно проведены обработка и статистический анализ полученных данных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В последние годы нейровоспаление и нейродегенерация являются предметом большого числа исследований в связи с их участием в виде ключевого звена при многих церебральных патологиях. Нейровоспаление наблюдается практически при всех заболеваниях ЦНС во всех структурах мозга и, скорее всего, в условиях нормальных физиологических процессов [21]. В норме нейровоспаление выполняет функцию адаптации к травме или изменению гомеостаза, улучшения регенерации. Однако при потере контроля данная защитная реакция может приводить к повреждению мозга: медиаторы нейровоспаления приводят к гибели нейронов и глии. Описано огромное число триггерных факторов, запускающих активацию микроглии и воспалительный ответ (например, механические повреждения, ишемия, аномальная активность синапса), а также генетическая предрасположенность конкретного индивидуума к данному воспалительному ответу. Механизмам воспаления (цитотоксическим, антительным) посвящено множество работ как на экспериментальных моделях, так в биологических жидкостях и тканях больных [22].

При заболеваниях ЦНС описана параллельная активация и взаимодействие данных процессов: при нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона) показано участие нейровоспаления в развитии заболевания [23], тогда как при воспалительных заболеваниях нейровоспаление запускает процессы нейродегенерации. В условиях клиники и изучения взаимодействия данных процессов биомаркеры нейровоспаления в биологических жидкостях являются доступным источником информации о нейрохимических механизмах в тканях ЦНС [24].

В современной неврологии параллельно с развитием фундаментальных наук и открытием и описанием новых антител неуклонно растет количество новых нозологий и подтипов аутоиммунных заболеваний. Данные заболевания обладают значительной гетерогенностью (возможно наличие сопутствующей патологии или формирования перекрестного синдрома, наличие нескольких антител у одного пациента), а так же существуют заболевания с четкой клинической и МРТ картиной (например, РС), но без известного специфического маркера, в связи с чем ряд экспертов относит РС к иммуноопосредованным заболеваниям. При такой характеристике заболеваний вопросы клинико-биохимических корреляций являются особенно сложными и интересными с точки зрения изучения данных патологий и разработки новых маркеров диагностики [25]. Так же, для российской популяции практически не описана когорта пациентов с АЭ, которая встречается в практике врачей центров, занимающихся рассеянным склерозом и аутоиммунными патологиями нервной системы. В данной работе обзор литературы и детальный анализ клинической картины,

инструментальных данных и исследуемых маркеров нейровоспаления и нейродегенерации проведен для таких наиболее часто встречающихся заболеваний, как РС, ОРЭМ, ОД, АЭ, что может помочь оценить физиологические различия данных процессов при аутоиммунных заболеваниях ЦНС.

1.1. Характеристика аутоиммунных заболеваний ЦНС

1.1.1. Аутоиммунные энцефалиты (АЭ)

АЭ — это группа неврологических заболеваний, характеризующихся поражением головного мозга в ходе аутоиммунного воспалительного процесса, в том числе аутоантителами, которые вырабатываются к вне- или внутриклеточным структурам нервной системы, выступающим в роли антигенов [15; 20]. Сочетание неврологических и психических нарушений, а также возможность определить конкретный субстрат «антиген и антитело» делает эти заболевания крайне интересными как с позиции «молекулярной психиатрии» и создания новых экспериментальных моделей когнитивных процессов, так и со стороны клинической диагностики и более точного лечения.

С тех пор, как были выделены антитела к н-метил-Д-аспартат-рецепторам (NMDAR) в качестве причины развития острого психоза и поведенческих нарушений у молодых пациенток с тератомой яичника [26], в области «молекулярной психиатрии» начался новый этап поиска конкретного субстрата, который может объяснить развитие психических нарушений.

Вслед за первым открытием в данной области стало работать много лабораторий, и на сегодняшний день каждый год описывается одно – два новых антитела [27]. Появление каждого из этих антител может приводить к появлению у пациентов психиатрической симптоматики — острых психозов, поведенческих и когнитивных нарушений. Примерно у 60 % пациентов психические нарушения появляются первыми и являются ведущими в клинической картине заболевания [28]. Такие пациенты сначала госпитализируются или проходят лечение у психиатров, зачастую с диагнозом «шизофрения», тогда как постановка правильного диагноза и проведение иммуносупрессивной терапии может полностью излечить пациента и вернуть к нормальной жизни. Именно излечимость данных состояний привела к выделению отдельной группы АЭ и активному поиску других антител и субстратов, которые также могли быть причиной подобной симптоматики.

Группу АЭ разделяют на две большие подгруппы: паранеопластические энцефалиты, развитие которых связано с наличием опухоли и последующей антигенной презентацией, и идиопатические энцефалиты, при которых аутоантитела вырабатываются без связи с каким-либо онкологическим процессом [20]. На данный момент в ряде случаев описывают третью группу постинфекционных энцефалитов, к которым относятся NMDAR-энцефалит, который

развивается после герпетического, при развитии детских аутоиммунных нервно-психических расстройств, ассоциированных со стрептококковой инфекцией, постмалярийные энцефалиты [29].

По тому же принципу принято подразделять антитела на три группы:

1) антитела к внутриклеточным антигенам или, как их часто называют, «истинным» паранеопластическим антигенам (Hu, Yo, Ma2, CV2, амфифизин), которые в большинстве случаев связаны с наличием опухоли

2) антитела к поверхностной нейрональной мембране, которые могут выявляться как при паранеопластическом процессе, так и идиопатически (метаботропному глутаматному рецептору 5 (mGlu5R), GABA_B-рецептору (GABA_BR), NMDAR, рецептору α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), рецептору контактин-ассоциированного белка 2 (CASP2R)

3) антитела, которые чаще выявляются идиопатически (глутамат декарбоксилазе (GAD65), дипиптедил-пептидаз-подобному белку (DPPX), IgLON5, глициновому рецептору (GlyR))

Кроме того, для АЭ с антителами к поверхностной нейрональной мембране существует своя классификация по локализации антигена [30]:

1) антитела к рецепторам нейротрансмиттеров (NMDAR, AMPAR, mGluR5, GABA_AR, GABA_BR, GlyR, дофаминовому рецептору 2(D2R))

2) антитела к трансмембранным белкам (CASPR2, DPPX, IgLON5, нейрексин-3а и др.)

3) антитела к секретируемым белкам (белку гена, богатого лейцином и инактивированного в глиоме 1, LGI1)

По наличию антител и их типу можно предсказать скорость прогрессирования заболевания, прогноз, ответ на терапию, что делает крайне важным поиск определенного антитела в каждом конкретном случае.

Типы энцефалитов: Энцефалит Экономо

Исторически, постинфекционной аутоиммунный генез предполагается у летаргического энцефалита Экономо, пандемия которого наблюдалась с 1915 по 1925 года вслед за эпидемией гриппа. В связи с внезапным развитием и таким же внезапным исчезновением данного заболевания о его причинах практически ничего неизвестно, однако клинически у пациентов развивалась картина слабости, усталости, нарушений сна, ранее описываемые как «летаргический сон», офтальмоплегии, кататонии, симптомов паркинсонизма и психозов. Предположения об аутоиммунном генезе энцефалита Экономо были сделаны на основании нескольких клинических и эпидемиологических фактов:

- пандемии энцефалита после пандемии «испанки» (гриппа, поразившего около 30 % населения планеты в начале XX века),
- взаимосвязи с перенесенным фарингитом у 55 % больных с наличием повышенных титров антител к анти-стрептолизину,
- патоморфологических данных исследования мозга умерших от энцефалита Экономо, в ходе которых было показано наличие воспалительных лимфоцитарных инфильтратов в среднем мозге и базальных ядрах, а также наличие олигоклональных антител в ЦСЖ, наличие антител к антигенам базальных ядер и положительный ответ на терапию стероидами [31].

Кроме того, при исследовании спорадических случаев энцефалита Экономо в более поздние периоды иммуногистохимически было показано наличие антител преимущественно к нейронам, а также Т- и В-клеточная инфильтрация в зоне базальных ядер. Однако иногда нельзя исключить, что антитела к базальным ядрам появляются после того, как они уже повреждены в ходе какого-либо другого патологического процесса [32].

Хорея Сиденгама

Хорея Сиденгама как нозологическая единица была описана еще Парацельсом как «пляска святого Витта», тогда как в 17 веке Сиденгам дал ей точное клиническое описание, и он же описал острую ревматическую лихорадку. Однако взаимосвязь между двумя этими заболеваниями была предположена позже, в 18 веке Ричардом Брайтом и далее поддержана рядом исследователей. Исследователи того времени писали: «из двух детей с ревматической лихорадкой один обязательно болен хореей». Классическое описание хорей Сиденгама— это сочетание хорей, иногда с развитием парезов, поведенческих нарушений (преимущественно, обсессивно-компульсивного спектра) после перенесенной инфекции, вызванной гемолитическим стрептококком группы А.

В конце XX века был выделена группа педиатрических аутоиммунных нейропсихиатрических заболеваний вследствие стрептококковой инфекции. Предполагаемый механизм развития подобного спектра заболеваний — кросс-реактивность антител к стрептококку и базальным ганглиям, что приводит к экстрапирамидным нарушениям движения и психиатрическим проявлениям [31]. В последнее время в ряде работ хорея Сиденгама рассматривается как клиническая картина энцефалита с антителами к D2R [33].

Энцефалопатия Хашимото

В 1966 году Brain и соавторы описали случай эпизодической энцефалопатии, ассоциированной с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ). Через несколько месяцев после выявления АИТ у пациента (мужчины 48 лет) периодически возникали парезы различной локализации, снижение уровня сознания, когнитивные нарушения, которые сохранялись несмотря на проводимую терапию гормонами, антикоагулянтами, тироксином, однако через год

регрессировали полностью. Врачи предположили взаимосвязь между АИТ и поражением головного мозга на фоне патологии щитовидной железы, так как описанная картина заболевания не укладывалась ни в одну из известных на тот момент патологий [34].

Далее неоднократно предпринимались попытки классифицировать данные состояния, разработать критерии и разобраться в этиологии энцефалопатии Хашимото, однако в связи с редкостью и до сих пор неизвестным механизмом развития поражения головного мозга это так и не удалось.

Основные клинические проявления включают эпилептические приступы, резистентные к противоэпилептической терапии, головную боль, галлюцинации, инсультподобные эпизоды и другую очаговую неврологическую симптоматику, нарушение когнитивных функций и сознания вплоть до комы, поведенческие и настроенческие нарушения, атаксию, деменцию. Частота встречаемости данного заболевания 2.1/100 000 (Национальным Институтом здоровья США данное заболевание отнесено к разряду редких), и характерным является более частая встречаемость у женщин, флюктуирующий характер патологии и ответ на иммуносупрессивную терапию. Аутоиммунный генез энцефалопатии также подтверждается рядом лабораторных тестов. У пациентов выявляется высокий титр антител к тиропероксидазе или тироглобулину, тогда как в большинстве случаев наблюдается эутиреоз или небольшое изменение функции щитовидной железы [35]. В ряде работ было показано наличие в ЦСЖ больных антител, которые специфически связывались с астроцитами мозжечка. В ЦСЖ зачастую выявлялся повышенный уровень иммуноглобулина G (IgG) и/или олигоклональные антитела [36]. В нескольких исследованиях было показано наличие иммунореактивных рецепторов тиреотропного гормона в коре головного мозга [37]. В 2002 году были найдены антитела к альфа-энолазе [38], которые обнаруживаются у пациентов с энцефалопатией Хашимото от 68 до 83.3% случаев согласно различным исследованиям [39]. Однако антинейрональный аутоиммунный ответ не считается до конца подтвержденным: выдвигается гипотеза о генезе энцефалопатии Хашимото по типу аутоиммунного васкулита с учетом данных однофотонной эмиссионной компьютерной томографии о гипоперфузии головного мозга, высокой экспрессии альфа-энолазы в эндотелии сосудов и наличия антител к ней при других васкулитах (системной красной волчанке, ревматоидном артрите и др.) [36].

Соответственно, на сегодняшний день существует три взгляда на механизм развития энцефалопатии Хашимото [36]:

- 1) аутоиммунный васкулит ЦНС,
- 2) аутоиммунный энцефалит с антителами против антигенов щитовидной железы и ЦНС,

3) метаболическая патология из-за токсического эффекта тиреотропного гормона на ЦНС.

Однако до настоящего времени ряд исследователей сомневается не только в генезе, но и в существовании данной патологии.

Паранеопластические энцефалиты (Таблица 1)

Следующая эра в изучении АЭ — это описание группы паранеопластических энцефалитов. Классификация и изучение данной группы заболеваний началась в ту же эпоху, что и молекулярное описание различных типов опухолей в 50х годах XX века. Корифеи аутоиммунной неврологии считают, что первый случай аутоиммунного паранеопластического энцефалита описан Оппенгеймом в 1888 году [40] в статье «О неврологических симптомах, связанных с карциноматозом без выявленных изменений в головном мозге». Пациентка 54 лет впервые поступила в клинику Шарите в Берлине в июне 1887 года. В неврологическом статусе отмечалась агнозия, перемены настроения, грубая афазия, общение было возможно только при помощи самых простых жестов. Через несколько дней пациентка умерла, при вскрытии был обнаружен рак желудка, однако никаких видимых изменений головного мозга, в том числе менингеальных оболочек и сосудов, выявлено не было. При гистологическом исследовании так же не было найдено каких-либо значимых изменений — метастазов, патологии сосудов и нервов. С учетом странного сочетания наличия неврологической симптоматики без каких-либо патоморфологических изменений, Оппенгейм стал искать подобные случаи в архивах клиники и нашел похожее описание годом раньше, когда у пациентки с эпилептическими приступами и раком молочной железы при патоморфологическом исследовании ткани мозга никаких изменений выявлено не было. Оппенгейм предположил наличие «токсического эффекта» опухоли на головной мозг даже при отсутствии метастазов. В 1929 году была описана подострая дегенерация мозжечка у пациентов с онкологической патологией и только спустя полвека, в 1948 году, Denny-Brown [41] описал быстро прогрессирующую сенсорную нейропатию у пациентов с раком легкого и предположил о необходимости «метаболических исследований в подобных случаях для выявления причины поражения нервной системы». В 1949 году термин «паранеопластический» был введен Guichard и Vignon для описания нейропатии, возникшей у пациентки с раком матки [42].

Второй случай после Оппенгейма с поражением центральной, а не периферической нервной системы был описан Brierley и его коллегами в 1960 году: в публикации были представлены три случая заболевания с воспалительной реакцией в полушариях мозга, лимбической системе и сопутствующей карциномой бронхов, лейомиомой почки и неизвестной опухолью легких, соответственно [43]. Этот же случай считается первым описанием клинической картины лимбического энцефалита, Позднее было описано еще несколько

подобных случаев и в 1968 году Corsellis [44] ввел термин «лимбический энцефалит» и написал обзор литературы по данной тематике.

В то же время были предложены три гипотезы развития паранеопластических энцефалитов:

- 1) нейродегенерация клеток по неизвестной причине, вследствие чего вторично происходит воспалительная инфильтрация
- 2) возможная вирусная инфекция
- 3) гипотеза аутоиммунного поражения нервной системы антителами, которая впоследствии и стала основной. [45]

На этом этапе нужно отметить, что практически в течение целого века проводилось только описание клинических случаев и изучение морфологической картины патологии в мозге умерших людей: только через 100 лет после клинического описания Оппенгейма будут открыты анти-Hu антитела. В 1985 году были опубликованы первые работы по выявлению в биологических жидкостях антител к различным нейрональным структурам: описаны антитела к клеткам Пуркинье при паранеопластической дегенерации мозжечка [46] и впервые описаны нейрональные антиядерные антитела, ассоциированные с сенсорной нейропатией и раком легкого, впоследствии охарактеризованные как анти-Hu [47; 48]. Далее было описано несколько антинейрональных антител: в 1983 году anti-Yo антитела [49], в 1989 году — анти-Ri антитела [50] у пациенток с раком молочной железы, также было показано связывание выделенных IgG с клетками опухоли. В 1993 году выделены антитела к амфифизину (128 кДа белку мозга) у трех пациенток с синдромом ригидного человека и раком молочной железы [51], а в 1996 году описаны анти CV2-антитела (антитела к белку 66 кДа) [52] и антитела к Ma2 у пациентов с опухолью яичка.

На данном этапе уже был разработан достаточно стандартный протокол поиска антител (представлен ниже). Однако описание данных антител и точная диагностика ассоциированного неврологического синдрома не приводили к кардинальному изменению судьбы больных — в большинстве случаев терапия подобных состояний была малоэффективной, а прогноз — неутешительным. Так продолжалось до тех пор, пока не был описан первый АЭ с антителами к поверхностной нейрональной мембране, поддающийся лечению с хорошим восстановлением.

Немного обособленно рассматривают антитела к GAD — зачастую GAD-ассоциированные состояния выделяют в отдельную группу GAD-ассоциированных синдромов, а энцефалиты с антителами к GAD в отдельную группу энцефалитов [53]. Синдром ригидного человека, атаксии, лимбические энцефалиты, фармакорезистентные эпилепсии и эпилептические статусы — все эти состояния находятся в зоне пристального внимания специалистов по двигательным расстройствам, эпилептологов, врачей-специалистов по

аутоиммунным заболеваниям [54], и в данной области отмечается большая вариабельность диагнозов и классификаций данных синдромов.

Таблица 1 — Паранеопластические энцефалиты с антителами к внутриклеточным антигенам

Антиген	Клинические проявления (наиболее частые)	Опухоль
Классические паранеопластические энцефалиты		
Анти-Hu (ANNA-1) [48]	Энцефалит (лимбический, корковый, стволовой), полинейропатия, вегетативные нарушения	>90 % (мелкоклеточный рак легкого)
MA (MA1, MA2) [55]	Энцефалит (лимбический, стволовой), полинейропатия	>90 % (рак яичка, груди, кишечника)
Амфифизин [51]	Лимбический энцефалит, энцефалопатия, синдром ригидного человека, дегенерация мозжечка	> 90 % (мелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома молочной железы)
Анти-Ri (ANNA-2) [50]	Лимбический энцефалит, энцефаломиелит, синдром ригидного человека, дегенерация мозжечка, дистония	>90 % (мелкоклеточный рак легкого)
CV2(CRMP5) [52]	Энцефалит, оптический неврит, ретинит, полинейропатия, миелопатия, синдром Ламберта-Итона, дегенерация мозжечка, двигательные расстройства (хорея и др.)	>90 % (мелкоклеточный рак легкого, тимома)
Антитела к GAD [56]	Энцефалит (лимбический, корковый, стволовой), синдром ригидного человека, дегенерация мозжечка	<5 % (тимома, рак почки, аденокарцинома молочной железы или кишечника)
Другие паранеопластические неврологические синдромы		
ZIC-4 [57]	Подострая дегенерация мозжечка	Мелкоклеточный рак легкого
Yo-1 (PCA-1) [49]	Подострая дегенерация мозжечка	Часто (рак яичника, рак молочной железы)
Tr-рецептор [56]	Подострая дегенерация мозжечка	Лимфома Ходжкина
SOX-1 [57]	Синдром Ламберта-Итона	Мелкоклеточный рак легкого

Аутоиммунные энцефалиты с антителами к поверхностной нейрональной мембране (обобщены в Таблице 2)

Следующая волна исследования энцефалитов началась в 2005 году, когда группа J. Dalmau и соавторов сначала по клиническим признакам описала паранеопластический синдром у молодых женщин с тератомой яичников, а затем выделила антитела к NMDAR [58; 59].

Идея о взаимосвязи NMDAR и шизофренических проявлений к тому моменту уже не была нова — она появилась в 80-х годах [60], когда после использования антагонистов NMDAR (таких, как кетамин) у пациентов наблюдались эпизоды возбуждения, психотические и когнитивные нарушения. Наблюдение за эффектом подобных препаратов привело к созданию теории гипофункции NMDAR при шизофрении, и даже была создана одна из животных моделей шизофрении с «выключением» гена, кодирующего D-серинрацемазу, которая необходима для продукции агониста NMDAR в ЦНС, D-серина [61]. Однако антитело – антиген зависимый ответ, приводящий к подобной симптоматике у пациенток, описал именно J. Dalmau.

Сначала клинически была описана группа из 12 женщин, у которых развились психиатрические поведенческие нарушения, амнезия, дискинезии, эпилептические приступы, вегетативные нарушения, а также снижение уровня сознания вплоть до комы и необходимостью вентиляционной поддержки. После проведения лабораторного обследования было выяснено, что сыворотка и ЦСЖ пациенток иммунореактивна по отношению к нейропиллю гиппокампа и переднему мозгу, причем свечение было наиболее выраженным на уровне мембраны и молекулярного слоя гиппокампа. Были выделены антитела и выявлено, что они реагируют с NR1/NR2 гетеромерами NMDAR. После дальнейшего обследования у 11 пациенток была обнаружена тератома яичника и у одной пациентки тератома средостения, все исследованные опухоли экспрессировали NR2B субъединицу NMDAR. Удаление опухоли и иммунотерапия привели к полному восстановлению у 8 из 9 пациенток, 3 пациентки без удаления опухоли погибли от неврологического ухудшения. При аутопсии были выявлены глиотические изменения в ткани головного мозга, редкие Т-клеточные инфильтраты и дегенерация нейронов, более выраженная в гиппокампе.

Помимо описания NMDAR-энцефалитов, в 2005 году было описано 6 пациентов с новыми антителами к калиевым каналам, в дальнейших исследованиях разделенные на два подтипа — с антителами у CASP2R и LGI1 [62], у которых был выявлен хороший ответ на терапию и удаление опухоли.

Уже в течение нескольких лет после описания клинической картины и антител к NMDAR стало ясно, что случаев АЭ достаточно много и многие из них остаются нераспознанными в связи с началом заболевания с психиатрических симптомов, нормальной МРТ картиной или незначительными изменениями. С учетом возможности лечения данных

синдромов поиск новых антител стал крайне активным, а антитела, подобные антителам к NMDAR, CASP2R и LGI1 выделены в отдельную группу антител к поверхностной нейрональной мембране. В 2008 при прогрессирующем энцефаломиелите с ригидностью и миоклонусом были описаны антитела к GlyR [63]. Интересно, что в данном случае именно клиническая картина энцефалита с гиперэксплексией, которая описана как заболевание, генетически обусловленное наличием мутации в гене глицина, привела к идее о наличии антител к GlyR при данном заболевании, что и было подтверждено. В 2009 году при лимбическом энцефалите Lai и соавторами описаны антитела к AMPAR [64], которые были выявлены путем скрининга ЦСЖ и сыворотки крови пациентов на нейрональной культуре путем иммунопреципитации и иммуноблота. В 1994 году были описаны антитела к третьей субъединице глутаматного рецептора, которые выявляются при энцефалите Расмуссена и эпилепсии с частыми приступами, однако впоследствии патогенная роль данных антител не была подтверждена.

В 2010 году в исследовании E. Lancaster и соавт. [65] в ходе скрининга 410 пациентов у 15 был выявлен антительный ответ к гиппокампу, однако никаких других известных антител выявлено не было. Сыворотка и ЦСЖ этих пациентов была скринирована на культурах гиппокампа крысы и так же была выявлена иммунореактивность по отношению к культуре нейронов. При проведении электрофореза с иммунопреципитацией выявлены полосы 90 и 105 кДа, соответствующие GABA₁R и GABA₂R. В последующем GABA₂R был определен путем масс-спектроскопического анализа иммунопреципитатов. Методика, описанная в этой работе в 2010 году, стала достаточно стандартной схемой поиска антител при АЭ с небольшими модификациями. В 2011 году были выявлены антитела к mGluR5 при синдроме Офелии [66] и болезни Ходжкина, хотя сам синдром клинически был описан еще в 1982 психиатром I. Carr у его дочери-подростка [67]. При этом была использована методика, аналогичная предыдущей работе по выявлению антител к GABA₂R. В 2013 году Boronat et al. описаны антитела к дипептидил-аминопептидазоподобному белку-6 (DPPX) [68]. В 2014 году MarPetit-Pedrol et al описаны антитела к GABA_AR также в ходе скрининговой работы — у 6 человек из 140 пациентов с предполагаемым энцефалитом, приступами или эпилептическим статусом и аутоиммунным ответом к срезам мозга неизвестного генеза при иммунопреципитации были выявлены антитела к GABA_AR [69]. Однако до этого по клинической картине у 2х пациентов в 2012 году была предположена схожая картина заболевания, а также ранее было описано, что мутации в GABA_AR приводят к генерализованной эпилепсии [70] и эти данные клинически позволили предположить наличие антител к разным вариантам GABA-рецепторам при АЭ.

В 2015 году после клинического анализа нарушений сна и паттернов полисомнографии тем же методом были найдены антитела к IgLON5 [71], спектр клинических проявлений для

которых впоследствии был расширен [72]. В 2016 году та же группа исследователей [73] описала антитела к нейрексин-3: в ходе десятилетней работы были выявлены 5 пациентов со схожей клинической картиной в виде продромальных симптомов, головной боли и симптомов патологии ЖКТ, а затем развития эпилептических приступов и снижения уровня сознания, вплоть до комы и необходимости вентиляционной поддержки. Картину данного АЭ описывают как NMDAR-подобный, с учетом продромальных симптомов в виде повышения температуры, а также выраженного нарушения сознания. На сегодняшний день ведется дальнейший поиск антител, созданы концепции нейробиологии АЭ, в рамках которых возможно изучать патологию на различных уровнях [30], однако до сих пор критерии диагностики основаны больше на клинической картине, а терапия подбирается эмпирически, основываясь на мнении экспертов [74].

Таблица 2 — Аутоиммунные энцефалиты с антителами к поверхностной нейрональной мембране или синаптическим белкам

Антиген	Клинический синдром	Опухоль
NMDAR [26]	Продромальные симптомы, психиатрические нарушения, эпилептические приступы, нарушения памяти, пароксизмальные двигательные эпизоды, кататония, вегетативные нарушения, снижение уровня сознания, кома, гиповентиляция	Тератома яичника, редко - карцинома (10-45 % всех случаев, зависит от возраста) после перенесенного HSV-энцефалита. Бывает идиопатически.
AMPA [64]	Лимбический энцефалит, психиатрические нарушения	70% (рак легких, груди, тимомы)
GABA _b R [65]	Лимбический энцефалит, частые приступы	50% (рак легких, нейроэндокринный рак)
GABA _a R [69]	Рефрактерные приступы, эпилептический статус или эпилепсия Кожевникова, синдром ригидного человека, опсоклонус	Редко, описаны при тимоме.
LGI1 [62]	Лимбический энцефалит, 60 % гипонатриемия, приступы по типу лицо-рука	<10% (рак легких, тимомы)
CASPR2 [62]	Энцефалит, синдром Морвана, нейромиотония	<40 % (тимомы)
GlyR [63]	Синдром ригидного человека, прогрессирующий энцефаломиелит с ригидностью и миоклонусом,	Редко

	лимбический энцефалит, дегенерация мозжечка, оптический неврит	
IgLON5 [72]	Двигательные нарушения во сне, поведенческие нарушения, обструктивное апноэ во сне, нарушения дыхания, дизартрия, дисфагия, атаксия, хорей	Нет
DPPX [68]	Диарея, снижение уровня сознания, психиатрические нарушения, тремор, миоклонус, эпилептические приступы, нистагм, гиперэксплексия, атаксия, энцефаломиелит с ригидностью и миоклонусом	Нет
mGluR5 [66]	Лимбический энцефалит, синдром Офелии	Часто, лимфома Ходжкина
D2R [31]	Энцефалит с вовлечением базальных ганглиев, хорей Сиденгама	Редко
Нейрексин 3 [73]	NMDA-подобная картина энцефалита, орофациальные дискинезии	Описан идиопатически и после малярии

Поиск и характеристика антител при АЭ, подтверждение их патогенности

С момента описания хорей Сиденгама до первого открытия анти-Hu антител АЭ описывались клинически, затем изучалась макро и микроскопическая картина патологии головного мозга, причем в ряде случаев каких-либо значимых изменений не находили. Интересно заметить, что первые антитела получили название по первым буквам фамилии и имени пациентов (Hu, Ri и др.), что подчеркивает еще раз первоочередность клинической картины при поиске новых антител и описании синдромов. Вся группа паранеопластических антител была выделена и изучена при помощи стандартной схемы [50]:

1) проводился скрининг биологических жидкостей (ЦСЖ и сыворотка крови) на замороженных срезах мозга умерших людей без каких-либо неврологических заболеваний, как правило, зоны нейропилия гиппокампа и коры [48], или на ткани мозга мышей или крыс [75]. Иногда антиген можно было предсказать даже на этом этапе с учетом характерной локализации антител на мембране или связывания антител с определенным участком мозга. Так получилось, например, в случае определения антител к D2R после выявления иммунореактивности по отношению к базальным ядрам.

2) при выявлении иммунореактивности отдельных сывороток или ЦСЖ данные образцы параллельно с контрольными анализировались с помощью иммуноблотинга. При этом оценивалась реактивность различных разведений ЦСЖ и сыворотки пациентов по отношению к белковым экстрактам, полученным из гомогенизированной ткани мозга или из предварительно

изолированных кортикальных нейронов. Отличающиеся от контроля полосы подвергались дополнительному анализу. Так, анти-Nr1 антитела были описаны к антигену 35–38 кДа. На тот момент масс-спектрометрическое определение подобных количеств антигена было технически затруднено, поэтому антиген определяли при помощи иммуноаффинной хроматографии. Выделенные IgG к антигену наносились на колонку и через нее пропускали белковый экстракт из нейронов коры головного мозга, что позволяло получить сконцентрированный антиген и подтвердить его массу на вестерн-блоте и провести масс-спектрометрический анализ сконцентрированного белка [50]. В ряде случаев (например, описание антител к Ma2) применялись модификации метода: проводилось определение антигена при помощи метода «фагового дисплея» [55]. С 2010 года, когда стало доступно определение антигена масс-спектрометрически и была опубликована работа E. Lancaster и соавт. [65], все дальнейшие исследования проводились по стандартной методике и преимущественно как скрининговые. Только для двух антител заранее был предположен антиген по клиническому проявлению (гиперэксплексия в случае энцефалита с антителами к глициновому рецептору) и возможное общее патогенное антитело для группы пациентов по паттерну нарушений сна при полисомнографии в случае IgLON5.

На Рисунке 1 представлена стандартная методика поиска антител.

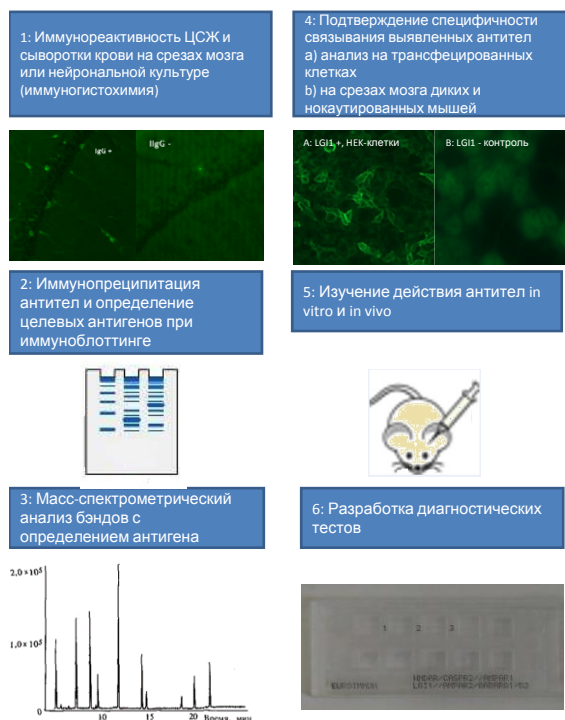


Рисунок 1 — Стандартная схема поиска патогенных антител

Первый этап — определение иммунореактивности сыворотки или ЦСЖ пациентов на культуре нейронов и/или иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга грызунов. Иммуноцитохимический анализ обычно выглядит следующим образом: культуру нейронов гиппокампа крысы инкубируют с антителами к NR1 субъединице NMDAR (контроль) или с

ЦСЖ пациентов. После этого оценивают, совпадает ли локализация свечения [59]. Комплекс, содержащий аутоантитело, выделяют из культуры клеток и идентифицируют белок методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. При этом важно учесть, что выявленные белки могут представлять собой комплексы антител с другими белками. Поэтому прямое связывание антител оценивают на трансфицированных культурах клеток, экспрессирующих антигены-кандидаты. К сожалению, выделить антигены из культур нейронов удается не всегда, несмотря на стремительное развитие иммунопротеомики. Биохимические свойства ряда белков, такие как нерастворимость в детергентах (NMDAR), или посттранскрипционные модификации (выраженное липидирование или фосфорилирование) затрудняют очистку и масс-спектрометрический анализ. Кроме того, некоторые антитела пациентов слабо связываются с антигенами-ортологами грызунов, что приводит к ложноотрицательным результатам [30]. Второй этап — окрашивание антителами, выделенными у пациентов, срезов мозга или культур нейронов грызунов. В отличие от первого метода, упомянутого выше, в данном случае используют две линии животных (или два типа культур). Первая — контрольная, вторая — нокаутная по интересующему гену (аналогично для культур клеток: например, сравнивают окрашивание контрольной линии и линии с нокаутом интересующего гена). Если нокаут или нокаун приводят к исчезновению свечения, это подтверждает, что у пациента имеются антитела, специфичные по отношению к данному конкретному белку. Однако наличие аутоантител в сыворотке/ЦСЖ пациента само по себе не свидетельствует об их патогенности. Поэтому третий обязательный этап изучения выявленных антител — это подтверждение их патогенности. Простейшим косвенным подтверждением патогенности считают корреляцию между титром антител и тяжестью симптомов. Другие, более надёжные доказательства можно получить *in vitro* и/или *in vivo*. Распространённым инструментом для *in vitro* анализа являются клеточные культуры, которые используют уже на этапе иммуноцитохимии; обычно это культуры нейронов крыс или мышей, методы получения которых подробно описаны в литературе [76], либо эмбриональные клетки почки человека линии 293 (HumanEmbryonic Kidney, HEK293). На клеточных линиях, трансфицированных плазмидами с генами изучаемых антигенов, удобно не только оценивать прямое связывание антител, но и охарактеризовать их реактивность по отношению к отдельным субъединицам рецепторов. Так, J. Dalmau и соавт. [58] использовали клеточную линию HEK293, чтобы изучить реактивность аутоантител по отношению к субъединицам NMDAR. Клетки были трансфицированы плазмидами, содержащими гены NR1, NR2A или NR2B (по отдельности или в комбинации), а также контрольной плазмидой без вставок. В результате клетки экспрессировали отдельные субъединицы NMDAR (NR1, NR2A или NR2B), а также их функционально активные комбинации (NR1/NR2B и NR1/NR2A). Полученные клетки

инкубировали с сывороткой или ЦСЖ пациентов, после чего проводили иммуноцитохимический анализ. Все 12 образцов сывороток и ЦСЖ пациентов были реактивны по отношению к NR1/NR2 гетеромерам, содержащим NR2B. Образцы сыворотки и ЦСЖ, полученные от восьми пациентов, были также реактивны по отношению к гетеромерам NR1/NR2A. При этом образцы сыворотки не были реактивны по отношению к клеткам, экспрессировавшим отдельные субъединицы рецептора. Также отсутствовала реактивность по отношению к иммуноблотам белков из клеток, экспрессировавших функциональные рецепторы; то есть для связывания антител требовались интактные функциональные гетеромеры. Все эти данные позволили предположить, что основные эпитопы, вероятно, находятся на внеклеточных доменах субъединиц NR2B и NR2A и являются конформационными. Интересно, что в дальнейшем (особенно при увеличении выборки) эта гипотеза перестала согласовываться с клиническими данными [59]. NR2B субъединица NMDAR экспрессируется преимущественно в гиппокампе и других зонах переднего мозга. Поэтому нарушение функции рецепторов NR1/NR2B будет относительно локальным, и вряд ли вызовет клиническую картину обширного неврологического дефицита. Несоответствие между предполагаемым молекулярным механизмом и клинической картиной заставило высказать новую гипотезу: исследователи предположили, что основные эпитопы для связывания аутоантител локализованы в гораздо более распространенной субъединице NR1. Эта гипотеза подтвердилась в ряде экспериментов: клетки HEK293 трансфецировали плазмидами, несущими гены NR1 и/или NR2. Было показано, что сыворотка и ЦСЖ пациентов реактивны не только по отношению ко всем гетеромерам NR1/NR2, но и по отношению к гомомерам NR1/NR1, то есть аутоантитела распознают именно субъединицу NR1. Чтобы определить локализацию эпитопа, клетки трансфецировали плазмидой, несущей ген модифицированной субъединицы NR1 (NR1d4): в ней отсутствовали аминокислотные остатки 25-380, однако она, тем не менее, образовывала комплекс с NR2B. Иммунореактивность ЦСЖ и сыворотки пациентов по отношению к комплексу NR1d4/NR2B практически отсутствовала. Так было доказано, что основной эпитоп располагается во внеклеточном регионе субъединицы NR1 [59]. Также с помощью клеточных культур было выявлено, что аутоантитела к рецептору GABA_A уменьшают плотность синаптических и внесинаптических GABA_A-рецепторов [77]. Биохимический эксперимент углубил полученные результаты: исследователи предположили, что аутоантитела к GABA_A усиливают интернализацию рецепторов, что и приводит к снижению их плотности. Эксперимент заключался в следующем: нейроны гиппокампа крыс инкубировали с сывороткой пациентов или участников из контрольной группы, после чего поверхностные белки биотинилировались и выделялись при помощи гранул, конъюгированных с авидином. В нейронах, которые инкубировали с сывороткой пациентов, количество поверхностных β3

субъединиц GABA_A-рецептора уменьшалось, а общее количество $\beta 3$ субъединиц не изменялось. Чтобы проверить, является ли этот эффект специфичным для GABA_A-рецептора, параллельно оценивалось содержание CluA1 и N-кадгерина и изменений выявлено не было. Данный эксперимент позволил выдвинуть гипотезу об интернализации рецепторов под воздействием аутоантител.

На нейрональных культурах также проводятся электрофизиологические эксперименты, в ходе которых было показано, что антитела изменяют потенциалы и токи в нервных клетках: например, антитела к GABA_A-рецептору селективно снижают амплитуду и частоту миниатюрных тормозных постсинаптических потенциалов [77], а также уменьшают синаптические токи, опосредованные GABA-рецептором [30]. В другом эксперименте на срезах мозжечка мышей было показано, что входящий ток, индуцированный селективным агонистом рецепторов метаботропных глутаматных рецепторов, значительно уменьшался при наличии IgG, выделенных из сыворотки пациентов. После отмывки антител ток восстанавливался [78].

Не менее интересны методы, которые используются для подтверждения патогенности *in vivo*. Пионерами в этой области можно назвать М. Coesmans и соавторов [78]. Сначала в соответствии со стандартной процедурой [79] анализировали движения глаз у лабораторных мышей. После базовых измерений (контрольные данные) животным имплантировали помпу, которая содержала очищенный и концентрированный раствор IgG, полученный от пациента или здорового участника, и подавала раствор IgG в мозжечок животных (зона клочка) с заданной скоростью. У всех мышей, которым вводили IgG пациента, регистрировалось уменьшение амплитуды компенсаторных движений глаз.

В 2004 г. Н Pellkofer с группой исследователей [80] ввели самкам крыс рекомбинантные линии Т-хелперов 1 типа (Th1), специфичные по отношению к аутологичному онконейрональному антигену Pnma1. Через шесть дней после введения Pnma1-специфичных CD4⁺Th1 у крыс наблюдался воспалительный ответ в ЦНС. При этом у животных энцефаломиелит был локализован в тех же областях, что и у пациентов при паранеопластическом синдроме, ассоциированном с данными антителами. Так было подтверждено, что реактивность CD4⁺Т-клеток по отношению к онконейрональным антигенам является патогенной и аутоиммунный компонент с участием Т-клеток является одним из механизмов поражения ЦНС при паранеопластических синдромах.

Так же была показана патогенность отдельных антител: при введении IgG пациентки с высоким титром антител к амфифизиону у крыс наблюдались мышечные спазмы (их выраженность коррелировала с дозой полученных антител), сходные с теми, которые характерны для синдрома ригидного человека [81]. В 2010 году в подобном эксперименте была подтверждена патогенность антител к NMDAR [82]. В 2012 году изучение *in vivo* перешло на

новый уровень — были созданы модели хорей Сиденгама, а также стрептококк-ассоциированных расстройств на крысах при помощи иммунизации стрептококковым антигеном группы А. В ходе исследований было показано, что при данной патологии вырабатываются антитела к D2R, что позволяет рассматривать данную группу патологий в рамках энцефалита к D2R [83]. Описанные выше эксперименты трудоемки и технически сложны. Однако в *in vivo* моделях можно получить важнейшие результаты, которые наиболее достоверно подтверждают патогенность отдельных аутоантител.

Существует несколько наиболее важных причин поиска новых антител и изучение маркеров нейровоспаления и нейродегенерации при АЭ на сегодняшний день:

1) уточнение патогенеза заболевания, так как большинство из антител являются патогенными, что было доказано в экспериментах на животных [64],

2) найденное антитело позволяет использовать иммунотерапию и в ряде случаев предсказать ответ на терапию и прогноз заболевания,

3) с учётом рефрактерности к препаратам первой линии стать основанием для назначения более эффективных, но имеющих больше серьезных побочных эффектов препаратов второй линии [73],

4) поиск дополнительных маркеров воспаления для клинической диагностики и оценки прогноза.

Кроме того, существует несколько проблем определения антител при диагностике АЭ. Выявление и определение всех известных антител доступно только маленькому числу лабораторий. Возможна детекция низких титров антител при других неврологических заболеваниях, хотя это не основная причина развития патологии. Gly-рецептору и NMDA антитела зарегистрированы при болезни Крейтцфельдта-Якоба [84; 85] и митохондриальной энцефалопатии с лактат-ацидозом и инсультоподобными эпизодами [86], GABA_A-антитела при генетически подтвержденной болезни Гентингтона [87], кроме того, иногда антинейрональные антитела выявляются у здоровых добровольцев [88]. Большинство имеющихся работ сосредоточены на детекции IgG, тогда как роль иммуноглобулина А и иммуноглобулина М (IgM) антител неизвестна, хотя на клеточных культурах показано изменение презентации рецептора NMDA под действием данных антител [89]. Нет корреляции для титра антител и тяжести клинических проявлений, нет четких протоколов лечения (выбор цитостатика и т.д.), лечение большей частью эмпирическое.

Основные проблемы диагностики АЭ на сегодняшний день представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Проблемы диагностики АЭ

Клинические критерии	Проблема	Дифференциальный диагноз
----------------------	----------	--------------------------

Клиническая картина	Неспецифическая во многих случаях	Инфекционный энцефалит, нейросифилис,
Данные МРТ	Позитивность только у 10-50 % пациентов. NMDAR энцефалит — позитивны 30 % пациентов. CASPR2R и LGI1 — большинство МР-негативны.	нейроборрелиоз, ВИЧ-ассоциированные заболевания, демиелинизирующие заболевания ЦНС,
Цитоз >5 клеток/мкл, наличие олигоклональных антител	Олигоклональные антитела положительны только в 30–50 % случаев.	энцефалит Биккерстафа, опухоли ЦНС, эпилепсия, васкулиты ЦНС, нейросаркоидоз,
Наличие известных антител	Только 50–60 % АЭ имеют известные антитела поскольку - есть неизвестные антитела, - спектр антител очень широкий, - специфичность и селективность различных тестов (ИФА и основных на клеточных культурах) разная, - исследования требуют оборудования и обученного персонала	болезнь Хашимото, болезнь Крейцфельта-Якоба, В-клеточная лимфома ЦНС, токсические и метаболические энцефалопатии, нейродегенеративные заболевания, психиатрическая патология

Таким образом, понимание физиологических механизмов нейроиммунных взаимодействий при АЭ и поиск новых маркеров нейровоспаления и нейродегенерации является крайне актуальным.

1.1.2. Рассеянный склероз (РС)

Рассеянный склероз (РС) — самое распространенное хроническое воспалительное демиелинизирующее заболевание ЦНС, поражающее в основном молодое, трудоспособное население и неминуемо приводящее к инвалидности [90]. Изначально считалось, что РС — «заболевание белой расы», но на данный момент описано достаточное количество случаев заболевания РС среди других рас. Первое проявление РС возможно в любом возрасте, женщины болеют в полтора-два раза чаще мужчин. Среди пациентов, заболевших до 15 или после 50 лет, соотношение между полами другое (3 к 1). У мужчин заболевание протекает

тяжелее, характерно первично-прогрессирующее течение [91]. Причиной смерти при РС, как правило, являются его осложнения: почечная недостаточность на фоне уроинфекции, пневмония и сепсис у обездвиженных больных, нарушение дыхания и глотания при множественных поражениях в стволе мозга. Средняя продолжительность жизни пациентов с РС на 5–7 лет короче, чем в общей популяции. Точная причина РС до сих пор не установлена, но показан вклад следующих факторов:

1) генетическая предрасположенность — женский пол и наличие определенных генетических полиморфизмов, связанных с развитием РС. По ряду исследований семейные формы занимают 13 % от всех форм РС [92]. При анализе GWAS выявлено более 200 аллелей риска для РС, однако данные мутации в основном ассоциированы с предрасположенностью к РС, нежели точным его наследованием. Показана роль локуса HLA-DRB1 в развитии заболевания [93], а также HLA-A2 и около 10 не-HLA генов (такие как интерлейкин 2 и рецептор интерлейкина 17). Курение показано в качестве HLA-ассоциированного фактора риска [94].

2) вклад вирусов — повреждение ЦНС развивается в результате острой или персистирующей вирусной инфекции, в ходе которой развивается аутоиммунный ответ на антиген (АГ). Описаны эндемичные вспышки РС, связь дебюта и обострения с перенесенной вирусной инфекцией, идентификация вирусов и противовирусных антител у больных. Показана роль вируса Эпштейн-Барр [95], РС-ассоциированного ретровируса [96], вируса ветряной оспы [97], есть работы по увеличению уровня противокоревых антител у больных РС и КИС в ликворе и сыворотке крови [98]. MRZ-реакция — одно из используемых лабораторных исследований наряду с олигоклональными антителами для подтверждения РС, ассоциирована с выявлением антител к кори, краснухе и ветряной оспе [99]. Достаточно часто обострению РС предшествует инфекционное заболевание [100; 101].

3) графическая широта — РС более характерен для северных стран, располагающихся в далеких от Экватора широтах.

4) уровень витамина Д — витамин Д участвует в регуляции иммунного ответа, снижает продукцию провоспалительных цитокинов и высокий уровень этого витамина в крови связан со снижением риска развития РС [102]. Сниженный уровень витамина Д в крови может быть одной из причин частой встречаемости РС в северных широтах. Также найдена клиническая ассоциация рассеянного склероза и редкого варианта гена цитохрома 27В1, участвующего в превращении витамина Д в его активную форму [103].

5) участие микрофлоры кишечника: изменение микрофлоры кишечника связано с экспрессией Т-регуляторных клеток, регулирующих процесс демиелинизации при РС.

Показано, что наличие в кишечнике любого штамма *Bacteroides fragilis* препятствует развитию ЭАЭ и РС [104].

б) ожирение в детском и подростковом возрасте [105].

При РС может наблюдаться практически любая неврологическая симптоматика, также и любая функциональная система может оказаться вовлеченной в патологический процесс. Существует оценка выраженности неврологического дефицита EDSS — расширенная шкала инвалидизации по Куртцке [106; 107] в модификации Каррос. Данная шкала признана наиболее информативной при оценке выраженности неврологического дефицита и прогрессирования РС. В ней учитывается степень отклонений от нормы во всех системах неврологического статуса и оценка функциональных возможностей пациента (способности передвигаться, обслуживать себя). Главным образом, шкала служит для долговременной оценки прогрессирования РС и оценки тяжести обострений. Более благоприятный прогноз наблюдается при сенсорных или зрительных нарушениях, вплоть до полного восстановления, и менее — при координаторных или двигательных [108].

На сегодняшний день диагноз РС выставляется согласно критериям McDonald с дополнением от 2017 года, которые включают в себя критерии диссеминации в пространстве и времени, данные МРТ и олигоклональные синтез ЦСЖ [109].

На основе типа течения заболевания выделяют следующие формы РС [110]:

1) Ремиттирующий (РРС) — наиболее частый тип течения (до 70 % случаев), характеризуется эпизодическими обострениями с практически полным клиническим восстановлением и стабильной фазой между обострениями (фаза ремиссии). С течением времени ремиссии становятся все более короткими и менее полными, а заболевание переходит в стадию вторичного прогрессирования более чем у половины больных через 10 лет и практически у всех больных через 25 лет [111]. Наименее благоприятный прогноз у пациентов с пирамидными нарушениями, тогда как течение заболевания, начавшегося с сенсорных или зрительных нарушений, более благоприятное.

2) Вторично-прогрессирующий (ВПРС) — по сути, представляет собой логичное продолжение ремиттирующего течения и характеризуется постепенным нарастанием неврологического дефицита у пациентов, ранее имевших РРС. Как правило, эта фаза наступает через 5–10 лет у пациентов с уже имеющимся тяжелым неврологическим дефицитом, причем момент перехода РРС в ВПРС не бывает четким, а устанавливается ретроспективно по клиническим данным о течении заболевания. Лабораторных маркеров перехода РРС в ВПРС не существует. Достаточно быстро РРС переходит в ВПРС у пациентов с поздним началом заболевания, причем у мужчин переход осуществляется быстрее. Две трети пациентов с ВПРС составляют женщины, как характерно для большинства аутоиммунных заболеваний и

РС в его начальной фазе [112]. ВПРС может протекать с периодами обострений или приобретать неуклонно прогрессирующее течение, в том числе с обострениями. Эффективность иммуномодулирующей и иммуносупрессивной терапии при ВПРС крайне низкая, ввиду преобладания процессов нейродегенерации [113]. Для МРТ при ВПРС характерна выраженная атрофия коры головного мозга и спинного мозга, появление так называемых «черных дыр» — необратимо поврежденных зон мозга, ремиелинизация в которых невозможна, — а также большое количество Т2-гиперинтенсивных очагов в ЦНС, тогда как количество очагов, накапливающих контрастное вещество, значительно снижается.

3) Первично-прогрессирующий (ППРС) — встречается в 10-15 % случаев, характеризуется более поздним началом (около 40 лет), неуклонным нарастанием симптоматики и преимущественным поражением спинного мозга, критерии постановки диагноза ППРС включены в модифицированные критерии McDonald от 2017 года [12; 109]. Среди пациентов с ППРС не наблюдается преобладания женщин. ППРС, как и ВПРС, плохо поддается терапии и характеризуется выраженностью процессов нейродегенерации. На сегодняшний день показана эффективность анти-В клеточной терапии окрелизумабом при ППРС, а также проводится ряд других исследований [114].

4) На данный момент выделяют клинически изолированный синдром (КИС, дебют заболевания) — первый эпизод неврологических расстройств, заставляющий предполагать РС, а также радиологически изолированный синдром (РИС). КИС развивается за несколько часов или дней и имеет все клинические черты обострения РС. В связи с высоким риском перехода КИС в РС при наличии в ЦСЖ второго типа синтеза олигоклональных антител (72 %) в рамках последней ревизии критериев McDonald при в ряде случаев при наличии КИС, определенной картины на МРТ и наличия олигоклональных антител может быть выставлен диагноз РС и начато своевременное лечение [109]. Кроме того, выделяют атипичные формы демиелинизации, которые нередко относят к вариантами РС — склероз Бало, болезнь Марбурга и Шильдера [115], течение которых крайне драматичное, а данные — разрозненные ввиду небольшого числа наблюдений. В последнее время описывается форма «единичного склероза», которого так же принято рассматривать в рамках РС [116].

1.1.3. Острый рассеянный энцефаломиелит (ОРЭМ)

ОРЭМ — это отдельное заболевание, сходное с РС по патогенезу и типу повреждения, является также аутоиммунным воспалительным демиелинизирующим заболеванием ЦНС и связано с предшествующей инфекцией, вакцинацией [117], употреблением иммуностимулирующих препаратов (например, левамизола) [118], и имеющее сходные с РС патофизиологические характеристики. ОРЭМ принято считать остро или подостро развившееся

множественное поражение ЦНС воспалительно-демиелинизирующего характера, причем многоочаговая двигательная и сенсорная симптоматика, как правило, должна сочетаться хотя бы с одним симптомом нарушения психических функции или нарушением сознания (вплоть до комы). Нарушения подобного характера позволяют отличить ОРЭМ от дебюта РС, кроме того, ОРЭМ встречается преимущественно в детском возрасте, причем по частоте встречаемости различий по полу не выявлено. Тем не менее, всегда требуется длительное наблюдение за больным, так как нередко ОРЭМ приобретает характерное для РС течение. При ОРЭМ в головном и реже спинном мозге образуется большое количество очагов демиелинизации, накапливающих контраст с поражением белого (и иногда серого) вещества ГМ. В ЦСЖ наблюдаются такие же изменения, как и при РС (увеличение уровня белка и незначительное увеличение уровня лимфоцитов), олигоклональные антитела выявляются редко [13]. Достоверных маркеров заболевания не существует, поэтому диагностика заболевания основывается на клинических данных и данных нейровизуализации. При МРТ очаги повреждения подобны очагам при РС, но не наблюдается «старых» очагов, все очаги интенсивно накапливают контраст, часто локализованы в таламусе и базальных ганглиях и сопровождаются перифокальным отеком и масс-эффектом. К сожалению, до сих пор не существует четких диагностических критериев для ОРЭМ у взрослых, они разработаны только для детской популяции [119]. Диагноз выставляется в соответствии с существующими клиническими рекомендациями [120]. Прогноз для больного благоприятный: как правило, течение заболевания монофазное и неврологический дефицит успешно восстанавливается (60–80 % случаев), однако в ряде случаев (острый геморрагический лейкоэнцефалит) или при тяжелых соматических осложнениях на фоне терапии возможен летальный исход.

1.1.4. Оптикомиелит Девика и заболевания из спектра оптикомиелит-ассоциированных расстройств (ОМ)

В настоящее время ОМ является единственной нозологией среди аутоиммунных заболеваний нервной системы, при которой идентифицирован специфический маркер, аутоантитела к AQP4. AQP4 — селективный водный транспортер, расположенный на мембране астроцитов. Антительное поражение каналов астроцитов приводит к интернализации каналов внутрь клетки, развитию воспалительной реакции, нарушению клеточных механизмов транспорта воды, повреждению ГЭБ и активной инфильтрации периваскулярного пространства клеточными элементами крови [121]. AQP4- антитела связываются с астроцитами, приводят к активации комплемента и последующей инфильтрации тканей лейкоцитами (эозинофилами и нейтрофилами), Т-лимфоцитами (CD3 и СВ8 +) и NK-клетками. Разрушение олигодендроцитов (процесс демиелинизации) носит при ОМ вторичный характер по отношению к антителам к

аквапорином-4, и служит триггерным фактором для повреждения аксонов и нарушения передачи сигнала. ОМ, как правило, развивается спорадически, хотя описано несколько семейных случаев и относится к редким заболеваниям (ORPHA:71211), распространенность которого в зависимости от региона и социально-экономических показателей варьируется от 0.52 до 4.4 на 100000 населения по данным различных исследований [122]. При расстройствах спектра ОМ ведущими клиническими симптомами бывают оптические невриты, миелиты и синдромы поражения ствола и *area postrema*, однако на сегодняшний день описаны различные атипичные клинические течения, особенно в сочетании с другими аутоиммунными заболеваниями [123]. Для постановки диагноза ОМ используются критерии Wingerchuk D.M. и соавторов [124], которые претерпели ряд модификаций с 2006 по 2015 год. В последнее время ОМ подобным расстройствам относят группу с антителами к МОРГ, часть из которых имеет клинические характеристики серонегативных оптикомиелитов, однако спектр описанных клинических проявлений настолько широк, что на сегодняшний день стараются выделить отдельную группу МОРГ-ассоциированных энцефаломиелитов [125].

1.2. Нейровоспаление и нейродегенерация при аутоиммунных заболеваниях ЦНС

Наиболее полно с физиологической точки зрения данные процессы изучены у пациентов с РС и на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у грызунов.

Изучение данных процессов имеет важное клиническое и физиологическое значение, так как позволяет выстроить концепцию функционирования нервных клеток и всей нервной системы в условиях различных патологий, сформировать представление о патогенезе данных заболеваний и их различии, а также сформулировать возможные стратегии лечения данных заболеваний.

1.2.1. Нейровоспаление и нейродегенерация при РС

Ведущими в патогенезе РС являются процесс воспаления с образованием периваскулярных воспалительных инфильтратов в головном и спинном мозге и процесс нейродегенерации. Клиническими проявлениями активного воспалительного процесса являются обострения с образованием новых очагов в головном и спинном мозге, накапливающих контраст при МРТ-исследовании. По теории иммунопатогенеза РС на периферии происходит активация Th1 – лимфоцитов чужеродным антигеном (как правило, вирусной природы), в результате чего лимфоциты становятся аутоагрессивными и атакуют собственные клетки [91]. Данная активация может происходить из-за структурной схожести коротких аминокислотных последовательностей вируса и аутоантигенов ЦНС, наличия на Th1-клетке нескольких рецепторов: рецептора к вирусному антигену и рецептора к аутоантигену, наличия суперантигенов (белков бактерий и вирусов), способных связываться с комплексом

гистосовместимости 2 класса и Т-клеточным рецептором независимо от того, к какому антигену была специфична данная Т-клетка. Существует мнение, что подобной активации подвержены Т-клетки на периферии, которые начинают избыточно пролиферировать при снижении количества наивных CD4⁺ Th клеток [126]. Активированные Th1-лимфоциты проникают через ГЭБ, выделяют ряд провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли, гамма-интерферон, интерлейкины 1 и 2), которые активируют микроглию, в свою очередь выделяющую провоспалительные цитокины. Активированные макрофаги путем фагоцитоза поглощают миелин и представляют аутоантигены на своей поверхности. Аутоантигенами ЦНС являются основной белок миелина (ОБМ), протеолипидный протеин (ПЛП), миелин-ассоциированный гликопротеин (МАГ), миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (МОГ) [127].

Кроме того, на сегодняшний день активная роль в патогенезе РС отводится дисбалансу между Th17 и Т-регуляторными клетками, который приводит к активации воспалительного ответа и продукции цитокинов [128].

Помимо Т-клеточного иммунитета в патогенезе РС задействован также и В-клеточный иммунитет. Активированные В-клетки синтезируют аутоантитела к аутоантигенам. Это подтверждается тем, что у 95 % больных РС в ЦСЖ обнаруживаются специфические олигоклональные антитела, преимущественно, IgG 1 и 3 классов, а у 40 % — специфические иммуноглобулины М (IgM) [129]. Кроме того, в менингеальной оболочке больных РС обнаруживаются В-клеточные фолликулярные структуры, а при использовании препарата ритуксимаба, снижающего количество В-лимфоцитов, наблюдается выраженный клинический эффект [130]. Особенно уязвим для аутоантител МОГ, расположенный на внешней стороне миелиновой оболочки. Данные антитела в течение длительного времени рассматривались в качестве маркеров течения заболевания, однако сейчас выделена отдельная группа антиМОГ позитивных энцефаломиелитов и описана их клиническая характеристика [131]. В-клетки способны активировать систему комплемента, осуществлять костимуляцию Т-клеток, продуцировать антитела и нейротрофические факторы, запускать процессы гибели клеток.

Большинство данных по механизму РС получено на модели ЭАЭ (ЭАЭ — принятая экспериментальная модель РС — вызывается путем введения антигенов, содержащихся в миелине ЦНС). Через 1–2 недели после аутоиммунизации у животных развивается энцефаломиелит, характеризующийся образованием периваскулярных инфильтратов в белом веществе ЦНС и демиелинизацией. Здоровые животные могут быть заражены путем пересадки антиген-специфичных CD4⁺ Th1-клеток [132]. В основе ЭАЭ лежит реакция отсроченной гиперсенситивности, которая обусловлена активацией CD4⁺ Т-клеток Th1-клеточной популяции, CD8⁺клеток, Th17 –подкласса, которые секретируют цитокины, активирующие

микроглию и процессы воспаления, и инфильтрируют ЦНС [95], но данная модель, по сути, отражает только процесс воспаления, а не нейродегенерации: многие препараты, успешно применявшиеся для лечения ЭАЭ у животных, не показали положительного результата в клинических испытаниях. Тем не менее, повреждение аксонов, апоптоз нейронов и гибель глиальных клеток имеет огромное значение в развитии заболевания. В последнее время на процессах нейродегенерации при РС сосредоточен пристальный взгляд исследователей: если раньше считалось, что гибнут преимущественно аксоны и только на поздних стадиях заболевания, то в последние два десятилетия многочисленные нейровизуализационные и патологоанатомические исследования показали повреждение клеток на самых ранних стадиях [133], причем, кроме гибели белого вещества, отмечается гибель серого вещества коры головного мозга. Выявлено, что очаги повреждения серого вещества массивнее, чем белого. В ходе развития заболевания происходит формирование стойких «черных дыр» (участков необратимой гибели аксонов), развитие атрофии головного и спинного мозга (данные МРТ) и снижение N-ацетиласпартата — основного маркера сохранности аксонов и нейронов. Роль гибели серого вещества в прогрессировании заболевания на данный момент является общепризнанным фактом, и именно его повреждением, сопровождающимся нарастанием когнитивных (наиболее массивные очаги отмечены в гиппокампе и лобной доле), моторных и сенсорных нарушений, определяется переход от РРС к ВПРС. Основная роль в повреждении ткани мозга отводится активации микроглии, в результате которой происходит повреждение митохондрий и гибель аксонов и олигодендроцитов.

Существует 3 модели взаимодействия активированной микроглии и последующей гибели нейронов [134]. В первой модели активированные клетки выделяют провоспалительные цитокины (интерлейкин 1, Ил-6, TNF- α и другие), происходит выброс активных форм кислорода и азота, в результате чего происходит повреждение олигодендроцитов и аксонов. Во второй модели выброс провоспалительных цитокинов и активация комплемента приводит к разобщению щелевых контактов между астроцитами и олигодендроцитами, в результате чего развивается гибель клеток. В третьей модели TLR-лиганды взаимодействуют непосредственно с олигодендроцитами и вызывают митохондриальные повреждения. И хотя третья модель на сегодняшний день является основной, роль первых двух также очевидна. С другой стороны, отмечена роль определенных внутриклеточных путей (например, показана роль антител к аминокислотной последовательности, отвечающей за транспорт белка в ядро, в гибели нейронов, повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в результате активации AMPA-рецепторов, изменения в экспрессии белков семейства белков из В-клеточной лимфомы-2, активации комплемента и каспаз-опосредованной гибели олигодендроцитов [135]. В соответствии с существующими взглядами, процесс нейродегенерации при РС происходит

постоянно, начиная с ранних стадий заболевания, но, в отличие от болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера, он вторичен по отношению к воспалению.

Таким образом, в первой фазе РС преобладают процессы воспаления: заболевание протекает с обострениями и ремиссиями, сопровождающимися образованием очагов в головном и спинном мозге, и частичным повреждением аксонов. За демиелинизацией следует восстановительная стадия ремиелинизации и нейрогенеза, которые активно выражены на начальных стадиях РС, но механизм их до конца неясен. Во второй фазе РС ведущими становятся процессы нейродегенерации. На сегодняшний день нейродегенерация при РС, в том числе на ранних стадиях, подтверждена рядом дополнительных методов:

1) при МРТ показано уменьшение объема ГМ уже на ранних стадиях заболевания, еще на доклинической стадии заболевания описано уменьшение объема спинного мозга у пациентов с очагами демиелинизации в ГМ [136].

2) При МР-спектроскопии выявлено снижение N-ацетиласпартата в участках без очагов на T2, что подтверждает раннюю гибель клеток вне воспалительных очагов [137].

3) При оптической когерентной томографии показано поражение аксонов сетчатки у пациентов без предшествующего ретробульбарного неврита [138].

При цитологическом и гистологическом исследовании бляшек демиелинизации можно выявить патологию аксонов на ранних стадиях заболевания. Исследователи разделяют острое аксональное повреждение при РС, происходящее непосредственно в острую стадию воспаления, и хроническую аксональную дегенерацию, которая происходит уже на последующих стадиях заболевания [139].

В ЦСЖ и крови пациентов с РС определяют ряд биомаркеров нейровоспаления и нейродегенерации. В качестве маркеров нейровоспаления используют провоспалительные цитокины (Ил-6, Ил-2, Ил-23 и др.), уровень белков адгезии (sVCAM, sICAM, VLA4, LFA1 и др.), матриксные металлопротеиназы (MMP2, MMP*, MMP9) [140]. В ряде случаев показана связь уровня данных маркеров с активностью заболевания и активностью по МРТ, однако в части случаев данную взаимосвязь подтвердить не удалось [141]. Для оценки активности В-клеточного звена используют олигоклональные антитела, легкие цепи иммуноглобулинов, которые так же в ряде случаев имеют свою клиническую и прогностическую значимость [142], а так же антитела к различным маркерам – белкам миелина, EBNA, цереброзидам, сульфатидам, ганглиозидам, фосфолипидам, однако их диагностическая и патофизиологическая значимость не подтверждена.

В качестве оценки изменений метаболизма оценивается уровень бета-амилоидов 40 и 42, в ряде случаев показана их ассоциация со скоростью прогрессирования заболевания [143]. Были

предприняты оценки уровня белка 14-3-3 и нейроспецифической енолазы, однако при РС не было получено значимых данных [144].

В качестве показателей активности нейродегенерации используются продукты гибели аксонов и специфические белки цитоплазмы нейронов, продукты метаболизма нервных клеток.

При гибели клеток в межклеточное пространство в большом количества попадают фрагменты цитоскелета, и в виду этой гипотезы одними из маркеров нейродегенерации на сегодняшний день оцениваются цепи нейрофиламентов (НФ) – легкие и тяжелые, компоненты микротрубочек, состоящие из субъединиц тубулина, тау – белок. Отмечалось повышение последних при прогрессирующем течение РС [144], тогда как при ремиттирующем течении в фазу острого процесса наиболее значимые различия наблюдаются в уровне различных типов НФ.

Тяжелые, средние и легкие цепи нейрофиламентов содержатся в нейронах взрослого организма: на С-конце тяжелых и средних нейрофиламентов в аксонах находятся повторы лизин-серин-пролин (выскоконсервативные KSP – повторы), которые могут подвергаться фосфорилированию [145]. Наибольшая степень фосфорилирования наблюдается у НФ с формированием фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов (фНФТ), наименьшая – у легких. Фосфорилирование нейрофиламентов приводит к их избыточному накоплению, а также формированию агрегатов и замедлению их транспорта по аксону, а также запуску дальнейших процессов гибели нервных клеток и воспалительной активности. Повышение данных маркеров было зарегистрировано при многих нейродегенеративных заболеваниях – боковой амиотрофической склероз, болезнь Альцгеймера, в том числе проводились попытки оценки степени нейродегенерации при РС в сыворотке крови и ЦСЖ. Получены данные по повышению фНФТ (в основном, в сыворотке крови) и легких НФ (преимущественно в ЦСЖ, так как на сегодняшний день нет коммерческой ИФА, позволяющей доступно диагностировать легкие НФ в сыворотке крови, хотя часть исследователей использует –SIMOA – метод исследования отдельных молекул [146].

В целом, считается, что легкие НФ наиболее выражено коррелируют с острой нейродегенерацией в период обострения, а также появлением новых очагов, их уровень коррелирует с вероятностью перехода КИС в РС и скоростью прогрессирования заболевания [146], тогда как для фНФТ характерно более выраженное повышение при ППРС и ВПРС при сравнении с РРС, и хроническом процессе нейродегенерации [147]. По данным исследований, НФЛ более динамичный показатель при сравнении с фНФТ, а также зачастую рассматривается как лучший маркер активности процессов, однако измерение его в сыворотке крови затруднено [148].

1.2.2. Нейровоспаление и нейродегенерация при ОРЭМ

При описании патогенеза ОРЭМ можно отметить, что механизм развития заболевания неясен, большинство данных получено также на модели ЭАЭ, который по течению более схож с ОРЭМ, чем с РС, или модели энцефаломиелита мышей, вызываемого вирусом Тейлера [149]. В связи с тем, что данные были получены на одних и тех же моделях, представления о патогенезе РС и ОРЭМ практически одинаковое. Считается, что на ранней стадии демиелинизация происходит также в результате активации Th-клеток, сенсibilизированных к белкам миелина, кроме того, происходит активация макрофагов, микроглиальных клеток. Как выявлено в исследовании Т. Ischizu и соавт. [150] при ОРЭМ в ЦСЖ выявлено увеличение уровня интерлейкинов-1 β , 2, 4, 6, 8, 10, IFN- γ , TNF- α . D. Franciotta с соавт. [151] показали увеличение в ЦСЖ уровня хемокинов, способствующих активации нейтрофилов, моноцитов, Th1 и Th2 по сравнению с контрольной группой и группой пациентов с РС. Была показана связь ОРЭМ с рядом вирусов (Эпштейн-Барр, цитомегаловирусом, вирусом простого герпеса и др.), микоплазмой, установлена связь с введением вакцины против бешенства (вакцина Семпла, на данный момент не используется), реже ОРЭМ ассоциирован с вакцинами против коклюша, кори, столбняка и гриппа [152]. S.V. Alves-Leon и соавт. [153] был найден ряд генетических ассоциаций с ОРЭМ с мутациями в гене HLA. Описаны случаи левамизол-индуцированного ОРЭМ, когда после приема иммуностимулятора с противопаразитарными или другими целями развивался ОРЭМ, как правило, монофазного течения без олигоклональной секреции в ЦСЖ [118; 154; 155].

В ряде случаев, в том числе у детей, ОРЭМ рассматривается в рамках анти-МОГ ассоциированного энцефаломиелита, при котором также показана корреляция уровня антител с цитокиновой осью (Ил-6) [156]. В ряде исследований описана острая нейродегенерация при ОРЭМ и других формах острой демиелинизации – проводилась попытка оценить состояние аксонов по уровню белка-предшественника амилоида [157] и было показано их повреждение, а так же было показано увеличение НФЛ в острой фазе у детей, а также GFAP в ЦСЖ [158], однако данные работы единичны, так как ОРЭМ, как правило, процесс однофазный и нейровоспаление заканчивается успешной ремиелинизацией. Однако, оценка разницы между процессами нейровоспаления и нейродегенерации представляет собой значительный интерес при сравнении разных форм острых воспалительных заболеваний ЦНС как с физиологической, так и с клинической точки зрения.

1.2.3. Нейровоспаление и нейродегенерация при ОМ

С учетом исключительности данной патологии с наличием специфических антител к AQP4 и характером преимущественной астроцитопатии, при ОМ изучены патологические

процессы в астроцитах, которые происходят *in vivo* и *in vitro* при наличии воздействия антител к AQP4. Наличие нейродегенерации при ОМ так же подтверждена клинически – с использованием МРТ и оптической когерентной томографии, как и при РС, однако ее механизм отличается. Наиболее полно сравнительный анализ патологий у пациентов с РС и ОМ представлен в обзоре I. Kawachi и соавт. [14], в котором описано различие характеристик нейровоспаления и нейродегенерации у пациентов с ОМ и РС. Поражение каналов астроцитов антителами к AQP4 приводит к их интернализации внутрь клетки и формированию зоны воспаления в виде конгломератов иммуноглобулинов и компонентов комплемента, их активации и запуска процесса воспаления, в ходе которого происходит инфильтрация нервной ткани клетками иммунной системы, дальнейшее повреждение митохондрий и нарушение работы каналов, обеспечивающих метаболизм нервных клеток. В соответствии с данной теорией при ОМ выделяют 6 типов поражения ЦНС [159]:

- Тип 1: активные очаги с активацией комплемента и инфильтрацией гранулоцитами
- Тип 2: некротические очаги с разрушением нервной ткани
- Тип 3: вторичная валлеровская дегенерация в зонах и нервных путях, прилежащих к очагам
- Тип 4: очаги с селективным исчезновением AQP4 без дальнейшего структурного повреждения
- Тип 5: активные очаги с участками погибших астроцитов (вероятно, в ходе интернализации AQP4 и запущенного процесса апоптоза).
- Тип 6: очаги с дистрофией астроцитов и первичной демиелинизацией.

В отличие от РС, в ГМ пациентов при ОМ не находят инфильтрации менингеальных оболочек лимфоцитами, а также нейродегенерация происходит вследствие антероградной или ретроградной аксональной дегенерации вслед за образованием острых очагов ОМ, или может быть следствием метаболических нарушений в астроцитах. Данные об особенностях очагов поражения при ОМ подтверждены при высокопольном МРТ на томографах мощностью 7 Т при сравнении с РС [160]. При воспалении при ОМ ведущая роль отводится активации В-клеточного иммунитета и активации оси цитокинов Th17 ряда, а именно Ил-6 [161] и Ил-17, и Th2 в виде Ил-5 и Ил-13, увеличение которых наблюдалось в ЦСЖ и сыворотки крови [162].

В том числе, проводились попытки лечения ОМ моноклональными антителами – ингибиторами рецептора Ил-6 (тоцилизумаб) с положительным эффектом, что позволяет подтвердить значимое вовлечение данных цитокинов в патологический процесс [163]. Была показана способность Ил-6 обуславливать выживаемость плазмбластов (PBs, D19+CD27highCD38highCD180–) и активацию продукции аутоантител к AQP4 [164]. В ходе изучения нейродегенерации при ОМ наибольшая часть исследований посвящена маркерам глиальной гибели: показано увеличение GFAP у пациентов в ЦСЖ с ОМ, в том числе при сравнении с пациентами с РС и ОРЭМ.

При изучении маркеров нейродегенерации выявлено, что при ОМ в ЦСЖ:

- уровень фНФТ выше при ретробульбарном неврите при ОМ, чем при ретробульбарном неврите при РС [165]
- в ЦСЖ пациентов с ОМ уровень фНФТ выше, чем при РС [166]
- уровень легких НФ, S100 и GFAP выше при AQP4+ патологии при сравнении с AQP4 – патологией [161], однако получены и обратные данные [167].

Однако, количество существующих работ невелико, а также дизайн исследований и формирования контрольных групп и групп сравнения между исследованиями отличается, поэтому представляет значительный интерес оценка данных маркеров в сравнении с пациентами с разными аутоиммунными воспалительными заболеваниями ЦНС и оценки взаимосвязи воспалительных маркеров и нейродегенерации с целью понимания физиологических взаимосвязей и клинической значимостью данных процессов.

1.2.4. Нейровоспаление и нейродегенерация при АЭ

На сегодняшний день механизм процессов нейровоспаления и нейродегенерации при АЭ изучен фрагментарно: NMDA-энцефалит был описан в 2005 году, после чего началась эра изучения АЭ и открытия новых антител. Каждое из данных заболеваний характеризуется наличием конкретного антитела (а иногда и их совокупностью), для ряда из которых показана патогенность. Например, при введении антител к GAD или амфифизину у экспериментальных животных так же развивалась клиническая картина, характерная для синдрома ригидного человека [168]. Введение данных антител приводит к процессам нейродегенерации, вторичным по отношению к текущему нейровоспалению. Механизм патогенеза АЭ различен при наличии антител к внутриклеточным и поверхностным антигенам. При наличии антител к внутриклеточным антигенам ведущим считается механизм Т-клеточной гибели и зачастую необратимый процесс повреждения нервных клеток. В работе С. Vien и соавт. выявлен более высокий уровень CD8/CD3 и гранзим-В+ цитотоксических Т-клеток в ткани мозга при энцефалитах с антителами к внутриклеточным антигенам [169]. Антитела к внутриклеточным антигенам считаются только маркерами протекающего воспаления вследствие уже запущенного воспалительного процесса, а сами по себе они не являются патогенными. Однако выраженность нейродегенерации при данной патологии значительно выше, чем при антителах к поверхностным нейрональным антигенам или антителам к GAD. При наличии антител к поверхностным антигенам наблюдаются антител-опосредованное повреждение клеток — они вызывают нарушение работы клеток и клеточное взаимодействие путем множества механизмов, таких как изменения системы взаимодействия медиаторов агонистов и антагонистов с рецептором, интернализации рецепторов, активации системы комплемента и

запускание антител – опосредованной клеточной гибели. Данные процессы при вовремя начатом лечении могут быть обратимыми.

Спектр работ по нейродегенерации при АЭ крайне мал, кроме того, существует несколько парадигм анализа маркеров при АЭ. Во-первых, ввиду большой гетерогенности антител и групп предпринимаются попытки анализа в группе АЭ с конкретным антителом (например, NMDA [170], иногда в группе антител (например, антитела к поверхностным антигена), а иногда при спектре паранеопластических синдромов без деления на группы конкретных антител, однако данные дизайны могут быть использованы в зависимости от используемых маркеров и поставленных задач. Во-вторых, исторически в качестве группы сравнения использовалась группа инфекционных энцефалитов в связи с острым началом и течением заболевания [141], однако, после открытия новых антител и более подробного изучения клинического спектра проявления данной группы нозологий было выявлено, что в ряде случаев АЭ имеет постепенный прогрессирующий характер или волнообразное течение с эпизодами различной выраженности и тяжести, а также по патогенезу более сходно с аутоиммунными заболеваниями ЦНС, такими, как ОРЭМ, РС и ОМ. Например, в ряде случаев МОГ-ассоциированное поражение ГМ может рассматриваться как в рамках АЭ [161], так и заболевания из спектра серонегативных ОМ, или нескольких антител могут сосуществовать у одного больного (например, МОГ и NMDA [171]).

Таким образом, у пациентов с АЭ процессы нейровоспаления и нейродегенерации на настоящий момент изучены крайне неполно. Триггерами процесса, запускающими образование антител и нарушением иммунотолерантности ГМ на сегодняшний день считаются инфекции (для NMDA-энцефалита – вирус простого герпеса), опухоли, к антигенам которых вырабатываются антитела. Кроме того, описан ряд генетических предрасположенностей (специфические аллели HLA-DQB1 and HLA-DRB1 при IgLON5- энцефалите [71]).

Имеющиеся данные в основном получены при АЭ с антителами к NMDA-рецептору: антитела связываются с NMDAR и приводят к их интернализации, что, в свою очередь, приводит к нейрональной дисфункции. По такому же принципу работают антитела при AMPA-энцефалите, однако при других антителах механизмы могут быть другими: GABA_BR- антитела изменяют функцию рецепторов и действие ГАМК, GABA_AR антитела перемещают рецептор с синаптического в экстраинаптическое положение, LGI1- антитела связываются с ADAM22 и уменьшают количество AMPA-рецепторов [172].

Кроме того, большой вопрос исследователей вызывает отсутствие взаимосвязи между титром антител и выраженностью симптоматики: на сегодняшний день это объясняется высокой продолжительностью жизни плазматических клеток в ЦНС [169]. При гистологических исследованиях в основном исследователи сосредотачиваются на детекции

иммунологических процессов и воспаления, тогда как нейродегенерация при АЭ не изучается. Только в одном клиническом случае LGI1- антител позитивного пациента при аутопсии описывается наличие маркеров нейродегенерации – альфа-синуклеина, бета-амилоида, без изучения их физиологической роли [173]. Недавно описанные АЭ с антителами к IgLON5 по клиническому течению похож на нейродегенеративное заболевание, а также может быть рассмотрен в рамках атипичной таупатии. Данные клинических исследований с использованием нейropsychологических тестов и МРТ свидетельствуют об атрофии лобной и височной доли при длительно текущем NMDA-энцефалите, височной доли – при LGI1-энцефалите .

Было проведено несколько исследований с использованием биологических жидкостей (сыворотка крови и ЦСЖ) , однако их количество ограничено. В ряде исследований у пациентов с АЭ выявлены олигоклональные антитела (30-50 % при различных АЭ согласно данным исследований), чаще всего согласно ряду работ данные антитела встречаются при паранеопластических синдромах, однако в исследовании R. Constantinescu и соавт. разницы между аутоиммунными и паранеопластическими энцефалитами выявлено не было [174]. В этой же работе было показано увеличение Т-тау и легких НФ у пациентов с аутоиммунными и паранеопластическими синдромами, причем их уровень в ЦСЖ был прогностическим фактором негативного исхода. Уровень GFAP от нормальных значений не отличался. В работе P . Körtvelyessy и соавт. [170] был показан высокий уровень програнулина в ЦСЖ пациентов с NMDA в острой фазе и нормализовался после лечения, тогда как в группах других АЭ с антителами к поверхностным нейрональным антигенам , Т-тау был выше у пациентов со склерозом гиппокампа по МРТ, легких НФ – у пациентов с АЭ паранеопластической или параинфекционной этиологии и нормализовался после лечения, однако не коррелировал с тяжестью течения заболевания. Данные авторы предлагают использовать уровень програнулина как маркера острой фазы АЭ, а уровень т-тау как возможный предиктор развития склероза гиппокампа. Также описывалось повышение НФЛ, Т-тау у пациентов с АЭ после эпилептического статуса, однако возможно данная гибель нейронов связана с самим эпилептическим статусом, что показывалось в различных исследованиях и ранее, а не с физиологическими процессами, протекающими при АЭ. Более высокий уровень легких НФ до лечения был показан в ЦСЖ у пациентов с опсоклонус-миоклонус синдроме, что свидетельствует об активном процессе нейродегенерации у этих пациентов [175].

Несмотря на достаточно кратковременное существование данного заболевания как клинической нозологии, АЭ на сегодняшний день можно рассматривать как уникальное заболевание с физиологической и клинической точек зрения. Во-первых, антитела, выявляемые при АЭ и проявляющиеся различной психиатрической симптоматикой — один из возможных

«молекулярных субстратов» психиатрических заболеваний, или, по крайней мере, могут привести к идее поиска новых концепций психиатрических заболеваний, а также сделать возможным изучение ряда когнитивных процессов, например, кратковременной памяти. Во-вторых, достаточно интересно рассмотрение АЭ с точки зрения выключения функции данного рецептора: в настоящее время рассматривают вместе с АЭ их «генетические близнецы» - заболевания с генетической мутацией в гене рецептора или другого белка, являющегося антигеном. Например, выявленные мутации в GRIN1, а также GRIN 2A (NR 2A) и GRIN 2B (NR 2B) приводят к развитию эпилептических энцефалопатий. Клинический фенотип для GRIN1-энцефалопатии описан как сочетание гиперкинезов, эпилептических приступов и нарушений цикла сон-бодрствование, что крайне схоже с картиной АЭ с антителами к NMDAR [176]. Наличие АЭ с антителами к глициновым рецепторам и гиперэксплексией, и мутацией в гене GlyR, приводящего к гиперэксплексии, описание мутации в гене нейрексина при аутизме и других поведенческих нарушениях [30], вовлечение именно височной доли при энцефалите с антителами к LGI1 и наследственной височной эпилепсии с мутацией в этом гене [177] — все это делает АЭ уникальным заболеванием, где не только на животных моделях, но и непосредственно у разных пациентов можно оценить нарушения во взаимодействии оси «антитело – рецептор – ген».

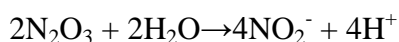
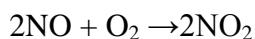
Таким образом, помимо рутинной клинической задачи постановки диагноза и определения оптимальной тактики лечения, АЭ — очень интересное заболевание для дальнейшего изучения нейробиологии когнитивных и поведенческих процессов, а также иммуногенетических взаимодействий.

1.2.5. Система оксида азота (NO) при РС

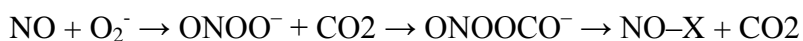
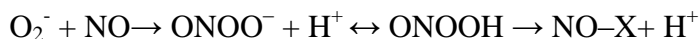
NO синтезируется из аминокислоты L-аргинина при помощи NO-синтазы. Существует три изоформы NO-синтазы: нейрональная (nNOS), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS). nNOS экспрессируется в нервных клетках ЦНС и ПНС, а также некоторых эпителиальных клетках. eNOS экспрессируется в эндотелиальных клетках. nNOS и eNOS экспрессируются постоянно и активируются при наличии в среде ионов кальция и кальмодулина, тогда как iNOS активируется провоспалительными цитокинами независимо от кальмодулина [178]. В норме iNOS выявляется в макрофагах, гепатоцитах, фибробластах, клетках гладкой мускулатуры, а также в олигодендроцитах, микроглии и астроцитах [179]. Активация nNOS и eNOS показана при ЭАЭ [179; 180], а также в аксонах нервных клеток при РС [181], но, тем не менее, наибольший вклад в продукцию NO вносит iNOS [182; 183]. При РС, как и при любом воспалении, происходит увеличение экспрессии mPDK, фермента и его активности в астроцитах, клетках микроглиально-макрофагального ряда, эндотелиальных

клетках [[104; 184; 185], причем, как правило, подобные изменения характерны для активных очагов, тогда как в старых очагах и очагах у пациентов с ВПРС подобной активности не наблюдается. NO — соединение с высокой биологической активностью — в свободном виде существует недолго (в крови — менее 1 секунды). Основной путь метаболизма NO — взаимодействие с гуанилатциклазой и последующее окисление до нитритов/нитратов. Но на самом деле, данный путь объясняет только малую часть всех эффектов NO *in vivo*. Взаимодействие NO и продуктов его метаболизма с белками приводит к образованию нитрованных аминокислотных остатков, S-нитрозотиолов (RSNOs), N-нитрозаминов (RNNOs), нитрозогемоглобина, действие которых не связано с циклическим гуанозинмонофосфатом (цГМФ).

NOx -нитриты, образующиеся в крови по следующей реакции,

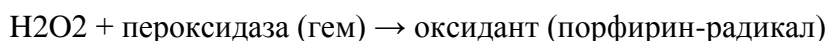


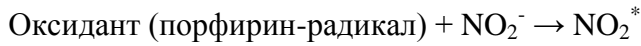
стабильны в цельной крови в течение нескольких минут, а затем, в свою очередь, окисляются до нитратов [186]. N₂O₃, образующийся в виде промежуточного продукта, может образовывать NO⁺ - активный нитрозилирующий агент. Кроме того, оксид азота может взаимодействовать с супероксид – анионом (с образованием пероксинитрита) и с CO₂ (с образованием нитрозопероксикарбонат-аниона). И тот, и другой являются активными нитрующими агентами [187].



Увеличение NOx в сыворотке, ЦСЖ, моче пациентов с РС было показано в ряде исследований. Основные из них приведены в таблице 1, приложение 1. В большинстве исследований показано увеличение уровня NOx в биологических жидкостях по сравнению с группой контроля: уровень NOx выше при обострении, зависит от типа течения РС, хотя корреляция с уровнем EDSS, полом, возрастом и другими клиническими данными не получена. С другой стороны, есть работы [188; 189], в которых подобное превышение не показано, как противоречивы данные и для КИС [190; 191].

3-нитротирозин и нитрованные по тирозину белки (ЗНТ и НТБ) Считается, что образование нитрозопероксикарбонат-аниона и пероксинитрита приводит к нитрованию ортоположения в молекуле тирозина с образованием 3-нитро-L-тирозина (ЗНТ), поэтому ЗНТ является маркером образования пероксинитрита *in vivo*. Кроме того, образование ЗНТ может происходить в реакции:





В качестве пероксидазы может выступать гемовая часть молекулы гемоглобина, миелопероксидаза. Миелопероксидаза вносит еще один вклад в генерацию ЗНТ за счет образования хлорноватистой кислоты: HClO при взаимодействии с нитритами образует нитрилхлорид, который также способен нитровать тирозин. Нитрование тирозина приводит к изменению активности ферментов, образованию белковых агрегатов, активации иммунной системы: белки, содержащие нитрованные участки, являются ААГ и происходит выработка ААТ. Возможные пути деградации белков с ЗНТ и их эффекты представлены на Рисунке 1 [192]. Некоторые эффекты подлежат обсуждению: хотя существует множество работ по исследованию эффектов свободного ЗНТ, синтез подобной аминокислоты в норме не происходит, а образование свободного ЗНТ при деградации нитрованных белков показано только в экспериментах *in vitro*. Мочевая кислота, конкурентный ингибитор реакции нитрования аминокислотных остатков при помощи пероксинитрита [193] и FeTPPS, катализирующий реакцию распада пероксинитрита [194], замедляют развитие ЭАЭ [195–198]. Эти экспериментальные результаты соотносятся с тем, что сочетание гиперурикемии и РС крайне редко [199; 200]. Пероксинитрит и активные формы кислорода приводят к повреждению митохондрий [201; 202], которое лежит в основе одного из возможных механизмов нейродегенерации при РС [203].

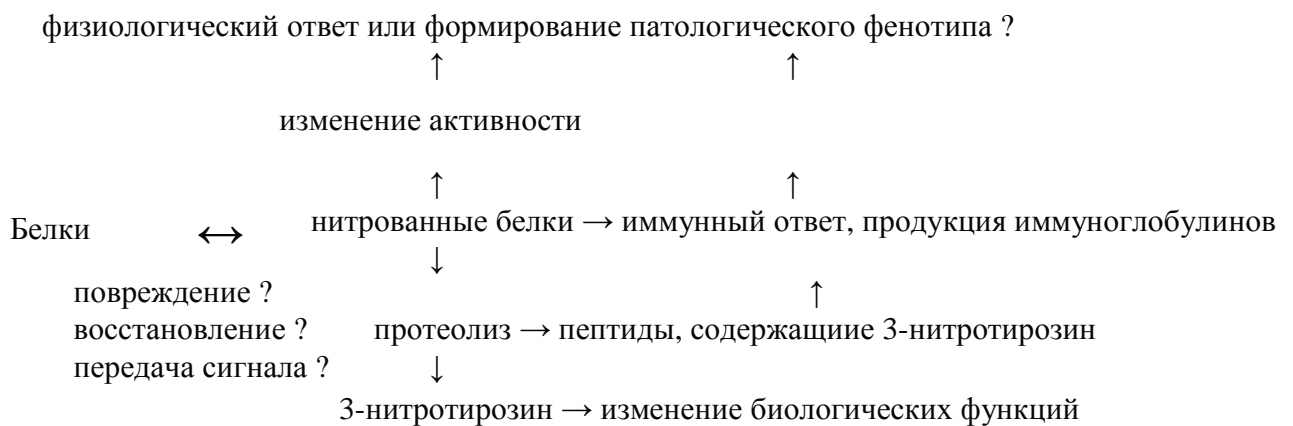
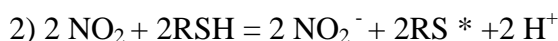


Рисунок 2 — Роль нитрованных белков в развитии патологических состояний [69]

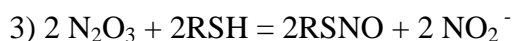
Энергетический дефицит приводит к нарушению аксонального транспорта, изменению направления работы Ca^{2+} - Na^+ обменника и активации кальпаина, что в итоге заканчивается апоптозом олигодендроцитов [204; 205]. Кроме того, в хронических повреждениях возникают повреждения митохондриального генома [206], что может быть причиной гибели нейронов на поздней стадии заболеваний, и нарушению ремиелинизации. При РС происходит окисление

ДНК и липидов в активных очагах воспаления: показано наличие 8-гидрокси-d-гуанозина — маркера окисления ДНК — в цитоплазме астроцитов, и 4-гидрокси-ноненаля — маркера перекисного окисления липидов — в макрофагах и астроцитах [207]. Математическая модель, разработанная с учетом вклада в патогенез РС активных форм оксида азота, апоптических факторов и факторов гибели олигодендроцитов, дает результаты, соответствующие экспериментальным данным, что еще раз подтверждает вклад NO в патогенез РС [208]. Увеличение ЗНТ показано при ряде неврологических заболеваний: свободного ЗНТ в ЦСЖ при инсульте [209], болезни Альцгеймера [210], боковом амиотрофическом склерозе [211], болезни Хантингтона, хотя есть и обратные результаты [212]. У больных РС в ряде работ показано увеличение уровня 3-НТ в аутопсийном материале [185; 197; 207; 213]. В активных очагах воспаление иммунореактивность с антителами к iNOS показана преимущественно в астроцитах, периваскулярных инфильтратах и эндотелиальных клетках. ЗНТ — иммунореактивность была выявлена в активных очагах около сосудов, что свидетельствует о нарушении проницаемости ГЭБ при обострении. В работах Calabrese и соавт., Zabaleta и соавт. [214–216] показано увеличение уровня ЗНТ в ЦСЖ по сравнению с контролем. Тем не менее, есть работа, в которой не выявлено повышения уровня ЗНТ в белом веществе, хотя показано, что уровень нитритов и нитрозотиолов в белом веществе больных РС выше, чем в контрольной группе и сером веществе [217]. Авторы полагают, что формирование пероксинитрита происходит только в массивных очагах повреждения.

Нитрозотиолы (RSNO). Нитрозилирование SH-группы — один из путей передачи сигнала с NO. Изменение процессов S-нитрозилирования показано при многих нейродегенеративных заболеваниях. Более того, по значимости процесс S-нитрозилирования в посттрансляционной модификации белков приравнивается к фосфорилированию [218]. Данный процесс активно протекает *in vivo* и участвует в регуляции активности ГТФаз, протеаз, фосфатаз, ионных каналов и транскрипционных факторов [219]. Основная часть нитрозотиолов в крови составляют S-нитрозоглутатион (GSNO), S-нитрозоальбумин и S-нитрозогемоглобин. В физиологических условиях образование RSNO происходит по следующей реакции [220]:

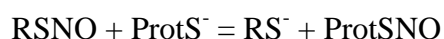


При больших концентрациях NO возможны реакции:



Кроме того, показана возможность образования RSNO непосредственно при взаимодействии с нитритами [221], реакции с участием нитрозильных комплексов железа и реакции транснаитрозилирования. По данным большинства работ, [222] уровень RSNO в биологических жидкостях находится в области микромолярных концентраций, хотя есть и другие данные [223]. Уровень RSNO — динамический показатель, зависящий от активности процессов образования и распада, корреляции с NOx — конечными продуктами метаболизма NO — не наблюдается [224]. RSNO связывают NO, буферизируют и транспортируют в места действия NO. В сыворотке крови основным нитрозилированным соединением становится альбумин, тогда как среднее время жизни GSNO и S-нитрозоцистеина составляет 120 и 50 секунд соответственно. Но по некоторым данным содержание нитрозоальбумина в плазме крайне низкое, а основная роль связывания NO *in vivo* отводится нитрозамин- и нитрозильным комплексам с гемоглобином [225].

Реакции S-нитрозилирования задействованы в регуляции транскрипции генов (изменение активности эстрогенового рецептора, ядерного фактора каппа b, гипоксия-вызванного фактора, CREB), синаптической передаче (снижение активности при нитрозилировании NMDA-рецепторов, увеличение экспрессии AMPA-рецепторов [226]. Показана роль нитрозилирования отдельных белков при нейродегенеративных заболеваниях: нитрозилированной глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы при БАС [227], регуляторов экспрессии parkin-гена при болезни Паркинсона, циклинзависимой киназы 5 при болезни Альцгеймера [228]. Разрушение RSNO происходит с участием металлов переходной валентности, аскорбата, тиолов и различных ферментов. В разрушении RSNO могут участвовать ферменты из глутатион-связанной системы, такие как глутатион пероксидаза — высвобождает NO из GSNO, гамма-глутамилтранспептидаза — превращает GSNO в S-нитрозоцистеинилглицин, глутатион-S-трансфераза и независимые от GSH — тиоредоксин (Trx), алкогольдегидрогеназа III (ADHIII), дисульфид-изомераза. По мнению других исследователей [229], данные пути разрушения практически не реализуются для низкомолекулярных RSNO в биологических жидкостях, а происходит реакция транснаитрозилирования.



При РС выявлена повышенная активность глутатионредуктазы, тогда как активность глутатион пероксидазы и трансферазы не отличалась от контроля [230], или была ниже, чем в контрольной группе [231]. На данный момент внимание исследователей привлекает активность тиоредоксина и ADHIII, так как помимо участия в окислительно-восстановительных реакциях, показана их роль в регуляции работы иммунной системы.

Тиоредоксин-тиоредоксинредуктазная система участвует в процессах регуляции экспрессии факторов транскрипции, процессах роста клеток, синтеза и репарации ДНК, выступает в качестве кофактора ферментов и выполняет ряд других жизненно важных функций в клетке. Trx — низкомолекулярный белок, имеющий в своей структуре активный дитиол/дисульфидный участок и обладающий оксидоредуктазной активностью— поддерживается в активной форме NADPH-зависимой тиоредоксинредуктазой (TrxR), которая восстанавливает S-S связь между Cys 32 и 35. Основные изоформы тиоредоксина — цитозольная форма Trx1 и митохондриальная форма Trx2. В крови человека содержится Trx1 — низкомолекулярный белок (12 кДа), состоящий из 105 аминокислотных остатков, активно синтезируемый и секретируемый лимфоцитами — и Trx80 (продукт протеолиза Trx1), состоящий из 80 N-концевых аминокислотных остатков и не обладающий ферментативной активностью [232]. Trx 80 секретируется из клетки и обладает цитокин-подобной активностью. Trx 80 может запускать классический и альтернативный пути активации комплемента и участвовать в активации воспалительных реакций, тогда как длинной изоформе Trx 1 предписываются преимущественно противовоспалительные функции. Считается, что секреция Trx из клеток активируется воспалением и повышенный уровень Trx в плазме приводит к ингибированию хемотаксиса нейтрофилов, инициированного введением ЛПС. TrxR, которая восстанавливает активный центр дисульфида в окисленном Trx, является НАДФН-зависимым гомодимером оксидоредуктазы. У человека выявлены и охарактеризованы три изоформы TrxR: цитоплазматическая (TrxR1), митохондриальная (TrxR2) и TrxR3, катализирующая восстановление как Trx, так и GSSG и называемая тиоредоксинглутатионредуктазой (TGR).

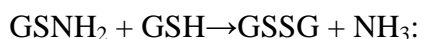
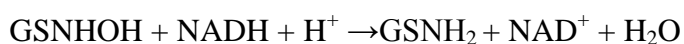
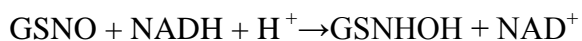
Суммарный процесс протекает по следующей реакции:

$GSNO + Trx(SH)_2 = HSTrxSNO = TrxS_2 + SNO$, TrxS₂ восстанавливается в Trx(SH)₂ под действием TrxR.

В плазме крови отмечалось повышение уровня Trx1 при таких заболеваниях, как ВИЧ, ревматоидный артрит, астма, гепатит С [233]. При РС показано увеличение экспрессии Trx и снижение экспрессии TrxR1 методом вестерн блоттинга в лимфоцитах периферической крови [234].

ADHIII, иначе называемая как S-нитрозоглутатионредуктаза или формальдегиддегидрогеназа, в качестве субстрата может использовать только GSNO (SNAP, нитрозоцистеин и нитрозилированный человеческий альбумин не являются ее субстратами), но тем не менее, снижение/увеличение активности ADHIII приводит к изменению содержания нитрозилированных белков, так как в биологических жидкостях низкомолекулярные тиолы существуют в равновесии с высокомолекулярными.

Процесс денитрозилирования протекает по реакции:



ADHIII преимущественно содержится в печени и почках, и во внутриклеточных компартментах ее активность выше, чем в внеклеточных. Тем не менее, показана активность ADHIII в сыворотке крови при ряде патологий ЖКТ и в контрольной группе [235]. Хотя при РС изучения активности S-нитрозоглутатион редуктазы не проводилось, данная система заслуживает особого внимания ввиду наличия исследований о связи активности данного фермента и регуляции работы клеток иммунной системы.

NO и его активные формы способны вызывать иммуносупрессию, ингибируя пролиферацию T- клеток, участвуя в элиминации активированных T-клеток путем апоптоза [236]. У мышей, нокаутных по ADHIII, в модели септического шока, вызванного ЛПС, смертность гораздо выше (37-47 %) по сравнению с контрольной группой (15%), причем у самок смертность возрастает в 10 раз, тогда как у самцов только в 2 раза. Можно предположить, что смертность возрастает ввиду массивного апоптоза клеток лимфоидной ткани и возможно, именно разница в активности ADHIII приводит к различному течению заболевания у мужчин и женщин. Мыши, нокаутные по гену ADHIII, страдают иммунодефицитом со сниженным уровнем CD4 и CD8 T- клеток в крови и CD4 и B-клеток в селезенке снижается. Причем у мышей с двойным нокаутом (по ADHIII и eNOS) подобные изменения сохраняются, и только нокаутирование по iNOS приводит к восстановлению уровня T-клеток и уменьшению уровня нитрозилированных белков в тимусе. Таким образом был сделан вывод, что подобные изменения – результат действия iNOS и ее активация может приводить к апоптозу лимфоцитов и вызывать иммуносупрессию, подобный же эффект наблюдается и при дефекте ADH III. В связи данными исследованиями можно предположить, что при РС нитрозилирование является процессом, регулирующим активность процессов воспаления. Тем более, в работе Duszczyszyn и соавт. показано, что у пациентов с PPC наблюдается ранняя инволюция тимуса с гибелью CD31hisjTREC клеток — наивных CD4 T-клеток, недавно вышедших из тимуса — и их уровень сравним с уровнем клеток у здоровых испытуемых на 25-30 лет старше [237].

Отдельного внимания заслуживает система глутатиона (GSH) в ЦНС. GSH является антиоксидантом, так как взаимодействует с супероксид-радикалом, гидроксил-радикалом, пероксинитритом. Он является кофактором многих ферментов, участвует в детоксикации веществ за счет реакции с глутатион-S-трансферазой. Смешанные дисульфиды, образующиеся в ходе этой реакции, выводятся из клетки: наиболее показательной является реакция с 4-гидроксиноненалем. Реакция образования дисульфидных групп GSH защищает SH – группы

белков от окисления. Кроме того, GSH является нейромодулятором и депо цистеина. Цистеин сам по себе обладает токсическим эффектом, активируя NMDA-рецепторы и увеличивая концентрацию внеклеточного глутамата, а в составе GSH возможно накопление цистеина в ЦНС в концентрациях 10–100 раз больше токсических [238]. Концентрация GSH больше в глиальных клетках (астроцитах) и может достигать 8 мМ. Они высвобождают около 10 % запасенного GSH в час и такое же количество синтезируют заново. По некоторым данным считается, что нейроны при помощи нейрональной дипептидазы расщепляют GSH и поглощают только цистеин, из которого заново синтезируют глутатион. Такой же механизм предполагался для CysSNO, который поступает в клетку через транспортер L-аминокислот [239]. Но по данным [240] предполагается свободное поступление GSNO в нейроны и последующее нитрозилирование белков преимущественно митохондриального пула. Возможно, GSNO проходит через каналы, образовавшиеся за счет нитрозилированных белков — коннексина-43 [241]. Достаточное количество глутатиона внутри и вне клетки, быстрое нитрозилирование при помощи NOS и N_2O_3/NO_2 , относительная стабильность GSNO позволяет предположить, что именно этот S-нитрозотрипептид обеспечивает эффекты NO в тканях. Кроме того, N_2O_3 слишком реакционноспособен и не диффундирует из клетки в клетку, а быстрее образует нитриты при взаимодействии с водой.

Вовлеченность системы RSNO в патологический процесс при РС была показана еще в работе Boullenne и соавт. [242], в которой были выявлены ААТ к нитрозоцистеину у больных и в модели ЭАЭ на различных стадиях его развития. Затем у больных с РС было найдено повышение RSNO в ЦСЖ [243], причем уровень глутатиона в ликворе был снижен, тогда как в крови уровень глутатиона был сравним с контролем. Показано увеличение RSNO в белом веществе головного мозга [217].

Но несмотря на то, что многие исследования показывают положительный эффект ингибиторов iNOS при ЭАЭ [244; 245], у мышей, нокаутных по iNOS, наблюдается более агрессивное течение ЭАЭ [246]. Кроме того, выявлено, что у мышей с мутацией, приводящей к изменению структуры каталитического центра NADPH оксидазы, не развивается ЭАЭ и не выявляется увеличения уровня нитротирозина в ткани ЦНС [239]. Таким образом, предполагается двойная роль NO: токсическое действие обуславливает пероксинитрит, тогда как NO сам по себе препятствует повреждению [247]. Таким образом, NOx, ЗНТ и RSNO служат маркерами действия NO, а их оценка в клинико-биохимическом исследовании необходима для понимания патогенеза NO при РС.

Таким образом, анализ литературы показал, что в настоящее время изучение нейроиммунного репертуара и взаимодействия процессов нейровоспаления и нейродегенерации важен как с физиологической точки зрения, так и с точки зрения поиска маркеров

аутоиммунных заболеваний ЦНС, способных предсказать и оценить темп прогрессирования заболевания, помочь в определении тактики лечения и оценить эффективность, прояснить во многом еще неизученный патогенез заболевания и, наконец, выявить новые мишени для терапии. Группа аутоиммунных заболеваний ЦНС является крайне гетерогенной группой заболеваний, однако главными факторами гибели клеток и развития новых очагов являются процессы нейровоспаления и нейродегенерации. Изучение их взаимоотношений, а также факторов гибели нейронов и аксонов – один из важных шагов в понимании изменения физиологических процессов при данных заболеваниях, установление всех звеньев патологического звена и – как следствие – решение клинических задач в виде своевременной диагностики и разработки новых лекарственных препаратов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика исследуемых групп больных и контрольной группы

Всего в исследование были включены 226 больных и 79 участников контрольной группы. В группу пациентов входили больные с РС (n=169), ОРЭМ (n=21), ОМ (n=12), АЭ (n=24). Исследование проводилось на базе 1 неврологического отделения ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» (заведующий к.м.н. Брылев Л.В.).

Исследование биологического материала проводилось на базе лаборатории функциональной биохимии нервной системы Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии российской академии наук (заведующая д.м.н. проф. Гуляева Н.В.).

Первый этап исследования:

На первом этапе 102 больных, госпитализированных в ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» в период проведения исследования с подозрением на аутоиммунное неврологическое заболевание ЦНС (аутоиммунные энцефалит или обострение демиелинизирующего заболевания), были скринированы согласно критериям включения и исключения.

Дизайн исследования представлен на Рисунке 3.

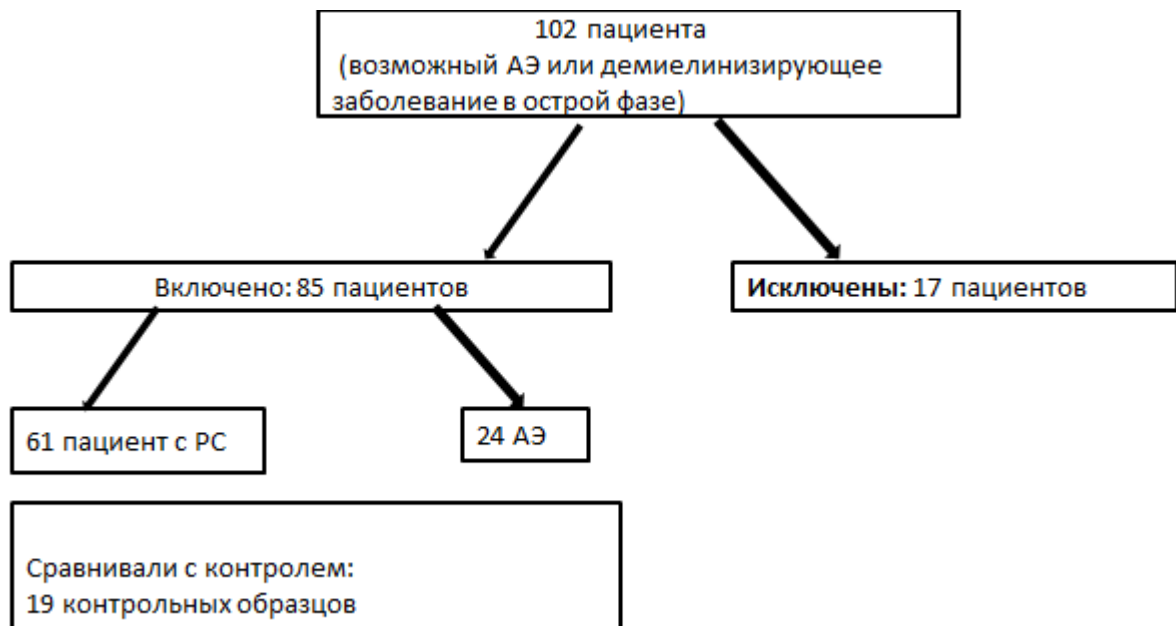


Рисунок 3 — Дизайн первого этапа исследования

Критерии включения:

- 1) возможный АЭ согласно критериям Grauss и др., 2016 [20]
- 2) достоверный РС согласно новому пересмотру критериев W. McDonald, 2017 [109] во время обострения

3) для всех пациентов, включенных в исследование, люмбальная пункция была показана с диагностической целью по медицинским показаниям после информированного согласия.

Критерии исключения:

1) для группы с РС все другие формы РС кроме РРС, пациенты с миелитами неясной этиологии, AQP4- положительные пациенты

2) острая соматическая или инфекционная патология, положительные анализы HCV, HBV, HIV, реакция Вассермана

3) иммуносупрессивная или иммуномодулирующая терапия в момент забора образцов и в течение трех месяцев до данной даты

4) сопутствующая нейродегенеративная патология, употребление наркотических препаратов или алкоголя в анамнезе, черепно-мозговая травма, сосудистые заболевания

5) пациенты с другим диагнозом, который был установлен в ходе обследования

После использования данных критериев 17 пациентов были исключены (12 из группы РС и 5 из группы АЭ).

Из группы РС были исключены следующие пациенты: митохондриальное заболевание (n=1), левамизол-индуцированная демиелинизация (n=1), , сосудистые очаги (n=1), MGUS-ассоциированный синдром (n=1), нейроборрелиоз (n=1), глиобластома с сопутствующими демиелинизирующими очагами (n=1), ОРЭМ (n=2), миелиты неясной этиологии (n=3), неуточненный диагноз (n=2). Дифференциальный диагноз для группы АЭ: гипопаратиреоз(n=1), шизофрения(n=1), васкулиты ЦНС(n=2), нейродегенеративное заболевание (n=1)

После скрининга мы включили 85 пациентов, 24 пациента с возможным АЭ и 61 пациента с РС.

У всех больных была детально изучена клиническая картина заболевания с использованием данных анамнеза, неврологического и соматического статуса, было выполнено МРТ головного и спинного мозга с контрастным усилением, всем пациентам с эпилептическими приступами был выполнен продолженный видео-электроэнцефалографический (ЭЭГ) мониторинг, рутинные биохимические анализы крови и ЦСЖ.

Неврологический дефицит оценивался по расширенной шкале двигательного дефицита Куртцке (приложение 1) для пациентов с РС и данный показатель использовался как индикатор тяжести обострения. Разница в уровне базового EDSS и EDSS через год после наблюдения использовалась как скорость прогрессирования заболевания.

Клинические характеристики больных представлены в Таблице 4, в Таблице 5 представлена характеристика группы аутоиммунных энцефалитов.

Таблица 4 — Клиническая характеристика больных (1 этап)

	Вероятный АЭ	РС
Пациенты, число	24	61
Возраст, лет	42,6 ($\pm 16,0$)	35,5 ($\pm 10,9$)
Пол (женщины/мужчины)	8/16	19/42
Эпилепсия	13	11
Средний уровень EDSS, баллы ($\pm SD$)	—	3,3 (± 1)
Средний уровень EDSS, баллы ($\pm SD$) через 1 год	—	3,4 (± 1)
Количество обострений в год	0,6 ($\pm 0,6$)	0,3 ($\pm 0,6$)
Число пациентов с обострением	7 (29 %)	17 (27,8 %)
Число умерших пациентов в течение года наблюдения	6	0
Нахождение в ОРИТ (число пациентов/количество дней)	9/1–14	3/0–1

Таблица 5 — Результаты клинического анализа ЦСЖ больных (1 этап)

	Вероятный АЭ	РС
Тип олигоклонального синтеза	тип 1 – 14, тип 2 – 3, тип 3 – 1, тип 4 – 2, 4 NA	тип 1 – 4, тип 2 – 53, 4 NA
IgG ЦСЖ (мг/л)	70,4 (± 60)	57,4 (± 44)
Цитоз ЦСЖ (клеток/мкл)	13 (± 27)	12,3 (± 7)
Уровень белка в ЦСЖ (г/л)	0,5 ($\pm 0,3$)	0,4 ($\pm 0,2$)
Уровень глюкозы в ЦСЖ (ммоль/л)	3,2 ($\pm 0,8$)	3,6 ($\pm 0,7$)

Таблица 6 — Клинические характеристики пациентов с АЭ

№	Возраст (г) ПОЛ	Клиническая картина	Сопутствующая патология	Выявленные антитела	ОГК	Локализация очагов по МРТ	Терапия	Исход (период наблюдения 1 год)
1	61 м	Эпилептические приступы, когнитивное снижение и атаксия	Рак мочевого пузыря	NMDA (сыворотка и ЦСЖ)	Тип 2	Корковые очаги, ствол, таламус	Пульс-терапия МП, плазмаферез	Кратковременное улучшение, далее смерть
2	56 ж	Атаксия	Нет	Нет	Тип 4	Ствол мозга	Пульс-терапия МП, МП per os	Частичное улучшение
3	62 м	Эпилептические приступы, когнитивное снижение и нарушение памяти	Мелкоклеточный рак легкого	GABA _B (сыворотка и ЦСЖ)	NA	Гиперинтенсивность гиппокампов	Пульс-терапия МП, плазмаферез	Кратковременное улучшение, далее смерть
4	44 м	Паранойя, депрессия	Рак почки	Нет	Тип 2	Мультифокальное поражение	Пульс-терапия МП, удаление опухоли	Восстановление
5	38 ж	Стереотипичные двигательные пароксизмы после вирусного продрома, когнитивное снижение	Нет	Нет	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП, плазмаферез	Восстановление
6	37 ж	Депрессия, агрессивное поведение	Карцинома маточных труб	Нет	Тип 4	1 кортикальный и 1 перивентрикулярный очаг	Пульс-терапия МП	Восстановление
7	32 ж	Кома, нарушение цикла сон-бодрствование (летаргический энцефалит)	Нет	Нет	Тип 1	Гипоталамус и базальные ганглии	Пульс-терапия МП, плазмаферез	Без улучшения, смерть
8	47 ж	Психоз, головная боль, когнитивные нарушения, эпилептические приступы	Рак груди	Нет	Тип 2	Нет очагов	Пульс-терапия МП,	Без улучшения, смерть

9	69 м	Когнитивное снижение, нарушение уровня сознания, гиповентиляция	Артериальная гипертензия, атеросклероз	Нет	NA	Многоочаговое поражение с накоплением контрастного препарата	Пульс-терапия МП, плазмаферез, внутривенные IgG	Улучшение после 2 обострений, после 3-го обострения смерть
10	46 ж	Фармакорезистентная эпилепсия, психоз	Ожирение	Нет	Тип 1	Двухсторонний склероз гиппокампа	Отказ от иммуносупрессивной терапии	Фармакорезистентные эпилептические приступы
11	28 ж	Миоклонические приступы, эпилептический статус	Нет	CASPR (сыворотка)	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП, плазмаферез, МП per os, азатиоприн	После 2-го обострения и начала терапии азатиоприном ремиссия
12	21 ж	Эпилептический статус	Нет	SSa-SSb	Тип 2	Гиперинтенсивность в височной доле	Отказ от иммуносупрессивной терапии	Фармакорезистентные эпилептические приступы
13	25 ж	Психотические эпизоды, нарушения памяти, фармакорезистентная эпилепсия	Нет	Нет	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП, плазмаферез, внутривенные IgG, ритуксимаб	Без улучшения
14	78 ж	Тетрапарез, мышечная ригидность, когнитивное снижение	Артериальная гипертензия, атеросклероз	GAD	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП, плазмаферез	Полное восстановление
15	28 м	Фармакорезистентная эпилепсия, когнитивное снижение	Нет	Нет	Тип 1	Многоочаговое поражение с накоплением контрастного препарата	Пульс-терапия МП, внутривенные IgG	Частичное улучшение
16	24 ж	Кататония, депрессия, когнитивное снижение	Нет	Нет	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП	Частичное улучшение

17	49 м	Тетрапарез, когнитивное снижение	Нет	Anti-Hu	Тип 3	Ствол мозга	Пульс-терапия МП, плазмаферез	Частичное улучшение
18	18 ж	Эпилептические приступы, когнитивное снижение и нарушение памяти	Нет	SSa-SSb	Тип 1	Очаг в правой лобной и левой затылочной долях без накопления контрастного препарата	Пульс-терапия МП, плазмаферез, внутривенные IgG	Полное восстановление
19	50 ж	Эпилептические приступы, когнитивное снижение и нарушение памяти	Нет	Нет	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП	Улучшение
20	34 ж	Фармакорезистентная эпилепсия	Нет	Нет	Тип 1	Гиперинтенсивность в правой височной доле	Пульс-терапия МП	Улучшение
21	52 ж	Когнитивное снижение и нарушение памяти, тетрапарез, мышечная ригидность	Артериальная гипертензия	GAD	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП, плазмаферез	Без улучшения, смерть
22	66 м	Эпилептические приступы, когнитивное снижение и нарушение памяти	Нет	LGI1 (сыворотка)	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП, МП per os	Улучшение
23	50 м	Эпилептические приступы, когнитивное снижение и нарушение памяти	Патология щитовидной железы	LGI1 (ЦСЖ и сыворотка), антитела к ТПО	Тип 1	Нет очагов	Пульс-терапия МП, МП per os	Частичное улучшение
24	36 ж	Эпилептические приступы, когнитивное снижение и нарушение памяти	Нет	NMDA (ЦСЖ и сыворотка)	NA	Множественные очаги	Пульс-терапия МП, плазмаферез, МП per os	Улучшение

Второй этап исследования

На данном этапе обследовались группа пациентов с РС в стадию обострения (n=52), критерии диагноза и включения аналогичны описанным ранее.

Группа пациентов с ОРЭМ была сформирована из 9 пациентов с монофазным течением заболевания и большими множественными демиелинизирующими заболеваниями ГМ, одномоментном накапливающими контрастный препарат, но ни у одного из них не было выявлено поражения спинного мозга. Так как на сегодняшний день критерии диагноза ОРЭМ существуют только для детской популяции, диагноз был выставлен соответственно клиническим рекомендациям [120]: острое начало мультифокальной неврологической симптоматики, иногда с предшествующим анамнезом инфекции или вакцинации, быстрое прогрессирование заболевания, потребовавшее госпитализации, наличие неспецифических симптомов, которые часто сопровождают развитие ОРЭМ (головная боль, тошнота, рвота, повышение температуры, снижение уровня сознания и выраженный неврологический дефицит), многоочаговое поражение головного мозга по МРТ с накоплением контрастного препарата и данные анализа ЦСЖ, не противоречащие диагнозу.

Включенные нами пациенты наблюдались в течение двух лет и течение заболевания было монофазным.

Группа больных из спектра оптикомиелит-подобных заболеваний с положительными антителами к AQP4 состояла из 12 человек. Диагноз был установлен согласно критериям Wingerchuk и соавт. [124] наличием положительных антител к AQP4 в сыворотке крови.

Клиническое обследование проводилось так же, как и на первом этапе, однако с учетом доминирования общемозговой симптоматики в клинике ОРЭМ шкала EDSS для оценки тяжести обострения в этой группе больных не использовалась. В Таблице 7 описаны пациенты этого этапа исследования.

Таблица 7 — Клиническая характеристика больных (2 этап)

	РС	ОМ	ОРЭМ
N	52	12	9
Возраст, годы	32,6 (±8)	36 (±6,5)	38 (±10,7)
Пол (мужчины/женщины)	22/30	2/10	5/4
Средняя длительность заболевания (диапазон), месяцы	24 (2–36)	17 (3–32)	3,5 (0,5–12)
Средний уровень EDSS, баллы(±SD)	3,1 (±1,6)	4,1 (±1,4)	—

Третий этап исследования

На данном этапе в группу больных РС были включены 56 человек, критерии диагноза и включения аналогичны описанным ранее, однако на данном этапе параллельно больным с РС

включались больные с ВПРС. Определение клинической формы заболевания проводилось с учетом частоты выявляемых обострений и темпа нарастания неврологического дефицита в соответствии с критериями Lublin и соавт. [248].

В качестве группы сравнения были включены 5 пациентов с ОРЭМ, критерии диагноза и включения аналогичны описанным ранее. Характеристика больных представлена в таблице 8.

Таблица 8 — Характеристика больных (клинические характеристики, данные МРТ и ЦСЖ) (3 этап)

	РРС	ВПРС	ОРЭМ
Пациенты	42	14	12
Возраст, годы	32,7 (\pm 7,9)	43 (\pm 8,0)	37,5 (\pm 10,6)
Пол (мужчины/женщины)	11/31	6/8	5/8
Средняя длительность заболевания, диапазон	27 месяцев, от 2 недель до 18,1 лет	14,3 лет, от 4 лет до 31 года	3,5 месяца, от 2 недель до 2,1 лет
Средний уровень EDSS, баллы (\pm SD)	3,2 (\pm 1,4)	6,1 (\pm 1,6)	—
Очаги в СМ (есть/нет)	29/13	14/0	0/12
Длина очагов в СМ (число позвонков)	1,6 (\pm 0,8)	2,8 (\pm 1,2)	0
Очаги в головном мозге (да/нет)	33/9	14/0	12/0
Цитоз ЦСЖ (клетки/3мкл)	14,7 (\pm 8)	—	22,1 (\pm 30)
Уровень белка в ЦСЖ (г/л)	0,26 (\pm 0,12)	—	0,39 (\pm 0,2)
Альбуминовый индекс	5,7 (\pm 2,3)	—	8 (\pm 0,3)

Контрольная группа

В качестве контрольной группы для первой и второй части исследования использовались неврологически здоровые добровольцы с ортопедической хирургической патологией, после получения и подписания информированного согласия. Контрольные образцы ЦСЖ забирались в ходе проведения спинальной анестезии при плановой операции, образцы крови забирались перед проведением хирургической операции (n=19, медиана возраста 35 лет, от 19 до 53 лет, и n=24, медиана возраста 34,5 лет, от 25 до 51 года, соответственно).

Для третьей части исследования, в которой использовалась только кровь, забор крови осуществлялся у здоровых добровольцев, чтобы исключить возможные эффекты наличия предоперационного стресса на показатели измеряемых маркеров крови, которые являются более лабильными при сравнении с маркерами ЦСЖ. С учетом возрастной разницы между пациентами с РРС и ВПРС сравнение проводилось с двумя контрольными группами. Суммарно

группу контроля молодого и старшего возраста составили 21 человек (n=10, средний возраст 29,3 (\pm 4,4) лет и n=11, средний возраст составил 47,9 (\pm 12,3) лет, соответственно). Контрольные группы не отличались от группы больных по полу и возрасту ($p > 0,05$).

2.2. Забор и хранение биологического материала

Забор крови осуществлялся из локтевой вены в утренние часы, натощак в пробирки с активатором свертывания (Vacutainer, BD). Сыворотку отделяли от клеток крови путем центрифугирования в течение 20 минут при 5000 оборотах/мин при 4 °С. Полученную надосадочную жидкость переносили в отдельные пробирки и замораживали при температуре – 70 °С. Во всех группах, кроме ВПРС, забор крови осуществлялся в период обострения до начала терапии метилпреднизолоном.

Люмбальная пункция была выполнена больным по медицинским показаниям с диагностической целью после получения информированного согласия. Пробы ЦСЖ собирались в стерильные пробирки (эппендорфы), далее проводилось центрифугирование образцов в течение 10 минут при 1500 g при комнатной температуре, надосадочная жидкость отбиралась в виде аликвот замораживалась при температуре –70°С.

Контрольные образцы ликвора были получены при выполнении спинальной анестезии больным с ортопедической хирургической патологией после получения информированного согласия.

У всех пациентов были выполнены рутинные тесты общего и биохимического анализа ЦСЖ и сыворотки крови. Для АЭ в обязательном порядке проводилось исследование ПЦР ЦСЖ на вирусы, все обследованные пациенты были ПЦР– негативны. Для всех пациентов проводилось исследование антител к AQP4 в сыворотке крови (для всех пациентов, кроме пациентов с ОМ, результаты были отрицательны), исследовались антинейрональные антитела, олигоклональные антитела, гормоны щитовидной железы, системные маркеры (СОЭ, СРБ, ревматоидный фактор, антинуклеарный фактор, антитела к двухспиральной ДНК, ANCA, ssA, ssB).

2.3. Биохимические методы исследования сыворотки крови и ЦСЖ

2.3.1. Определение метаболитов NO

Определение содержания нитратов и нитритов в сыворотке крови

Содержание в сыворотке крови метаболитов оксида азота, нитратов и нитритов, определяли по цветной реакции образования азокрасителя при взаимодействии нитритов с реактивом Грисса после неферментативного восстановления нитратов в нитриты хлоридом ванадия (III) [249].

Реактив Грисса был приготовлен из равных объемов 2% сульфаниловой кислоты и 0,1% α -нафтиламина в 5 % соляной кислоте. Перед проведением неферментативного восстановления осуществляли депротеинизацию пробы с помощью ацетонитрила. 30 мкл пробы смешивали с 30 мкл ацетонитрила. Затем проводили центрифугирование в течение 10 минут при 12000 оборотов/мин при температуре 4°C для осаждения белка. В ячейку плашки для спектрофотометрического исследования помещали 30 мкл надосадочной жидкости, 30 мкл 0,8% раствора хлорида ванадия (III) в 0,2М соляной кислоте и 30 мкл реактива Грисса. Полученную смесь инкубировали в течение 45 минут при 37 °С, затем измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм. Концентрацию нитритов рассчитывали по калибровочной кривой для разных концентраций (5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ, 80 мкМ) стандарта нитрата натрия

Определение содержания нитрованных по тирозину белков в сыворотке крови

Для определения содержания в сыворотке крови нитрованных по тирозину белков использовали иммуоферментный анализ (ИФА) в соответствии с методом, разработанным Jamshad и соавт. [250], и Li-Na и соавт. [251] с небольшими модификациями [252]. Выбор антител осуществляли в соответствии с данными [253] о том, что моноклональные антитела обладают низкой аффинностью к ЗНТ (предел детекции — 10 мкМ) и высокой аффинностью к нитрованному бычьему сывороточному альбумину (НТБСА, предел детекции — 500 нг/мл), что позволяет определять преимущественно нитрованные по тирозину белки. Тем не менее, данный метод является полуколичественным, так как

1) свободный ЗНТ, содержащийся в биологических жидкостях, может конкурировать за связывание с моноклональными антителами

2) пересчет производится на НТБСА, степень нитрования которого зависит от условий нитрования и нитрующего агента. В данной работе НТБСА получали по методике [254] с использованием в качестве нитрующего агента тетранитрометана. Определение количества нитрованных остатков в НТБСА проводилось с использованием методики [255]. Для полученного НТБСА количество нитрованных остатков равнялось 12. ИФА выполнялся в 96-луночном планшете по следующей схеме:

1) Инкубация НТБСА в концентрации 0,05 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере, pH=9,6, на ночь при 4° С (100 мкл на каждую ячейку).

2) Блокировка 3 % раствором фильтрованного БСА в течение 75 минут при 37° С (150 мкл на каждую ячейку).

3) Преинкубация моноклональных антител к НТБСА (CaymanChemical) в 2 % растворе БСА с добавлением Твин-20 в качестве неионного детергента в разведении 1 к 2000 смешиваются с образцом в соотношении 1 к 1, проводится преинкубация в течение 15 минут

при комнатной температуре. Затем смесь антител и образца наносится по 100 мкл в каждую ячейку, инкубация в течение 3 часов при 25 °С.

4) Инкубация со специфичными к иммуноглобулинам мыши антителами козы, конъюгированными с пероксидазой (JacksonImmunoResearch), в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина с добавлением Твин-20 (0,05 %) в разведении 1 к 5000 в течение 30 минут при 37 °С (100 мкл на каждую ячейку).

5) Детекция с использованием дигидрохлорида О-ортофенилендиамина в концентрации 0,4 мг/мл в 0,05 М фосфат-цитратном буфере с добавлением пероксида водорода в концентрации 0,25 мкл/мл (по 100 мкл в каждую ячейку), в темноте при комнатной температуре. После остановки реакции серной кислотой фотометрическая детекция проводилась на длине волны 490 нм, 1 с, на мультифокальном плащечном ридере (PerkinElmer).

Калибровочная кривая строилась по раствору НБСА в концентрации 0,0625 мкг/мл – 2 мкг/мл. Все измерения проводились в дубликатах. Обработка данных осуществлялась при помощи GraphPadPrism6.

Определение уровня RSNO в сыворотке крови

Определение RSNO проводили с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеина (DAF-2) [256], образующего в нейтральной среде комплекс с NO с характерным спектром испускания [257]. 100 мкл образца смешивали с 95 мкл раствора (DAF-2) в PBS, приготовленного на деионизованной воде, конечная концентрация DAF-2 1,38 мкМ. Затем добавляли 10 мкл 10 мМ раствора сульфата меди. Инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. Измерения проводились на спектрофлуориметре Hitachi F 3000 в режиме High PM Gain, Ex 480 нм, Em 515 нм. Ширина щели на стороне эмиссии — 5 нм, на стороне возбуждения — 10 нм. В кювету вносили по 200 мкл раствора. Калибровочную кривую строили с использованием различных концентраций раствора GSNO в деионизованной воде (конечная концентрация 0,125 мкМ – 4 мкМ). Синтез GSNO проводился в соответствии с методикой Stamler J. S. и соавт. [258] Растворы DAF-2 и GSNO готовили непосредственно перед экспериментом.

Для определения низкомолекулярных RSNO в первой части эксперимента использовалась предварительная обработка сыворотки ацетонитрилом в соотношении 1:1 на холоду и последующее центрифугирование при 12000 g в течение 10 минут для осаждения денатурированного белка. Определение содержания низкомолекулярной и белковой фракции RSNO проводилось с использованием фильтров AmiconUltra – 0,5 3K (Millipore, Ireland) по методике, описанной производителем.

2.3.2. Определение антител к поверхностным нейрональным антигенам

Определение антител к поверхностным нейрональным антигенам (NMDA, AMPA 1 и 2, GABA_B, LGI1, CASPR) проводилось при помощи коммерческого набора компании Euroimmune (Германия).

Анализ антител проводился по следующей схеме:

К имеющимся чипам с клетками, трансфицированными данными рецепторами, добавлялось 30 мкл ЦСЖ и сыворотки крови пациента в разведении 1:10, далее после отмывки в буферном растворе связавшиеся антитела выявляют при помощи инкубации стекол с антителами, мечеными флуоресцентной меткой, к иммуноглобулинам человека. Анализ характера свечения проводился при помощи флуоресцентного микроскопа.

2.3.3. Определение уровня показателей нейровоспаления и нейродегенерации

Для определения уровня биомаркеров в сыворотке и ЦСЖ в работе использовали коммерческие наборы для выполнения иммуноферментного анализа (ИФА)

- фНФТ (EnCorBiotchnology, США; Neuromics, США, и Biovendor, Чехия)
- для определения антител к рибосомальному белку Р- ИФА набор DrFookeLaboratory, GMBH, Германия
- Ил-6(Вектор-Бест, Россия)
- эритропоэтин (ЭПО, Вектор-Бест, Россия)
- растворимый рецептор Ил-6 (рИл-6Р, Affymetrix, eBioscience, Австрия)
- неоптерин (IBL International, Германия)

Определение показателей проводилось по стандартной схеме:

- 1) размораживание, перемешивание, разведение образцов ЦСЖ или сыворотки крови и стандартных разведений.
- 2) подготовка 96-луночной плашки, покрытой антителами к исследуемому антигену
- 3) нанесение образцов и стандартных разведений в ячейки плашки и инкубация на шейкере, промывка согласно инструкции
- 4) нанесение вторичных антител к исследуемому антигену, инкубация на шейкере, промывка согласно инструкции
- 5) детекция или нанесение третичных антител, конъюгированные с пероксидазой, инкубация на шейкере, промывка согласно инструкции
- 6) нанесение стоп-реагента и детекция в фотометре на длине волны по инструкции

2.4. Инструментальные методы обследования

2.4.1. ВидеоЭЭГ мониторинг

Исследование длительного видеоЭЭГ (от 4 до 24 часов) проводилось на компьютерном энцефалографе фирмы «Nicolet». Electroды располагались по международной схеме «10-20». Использовались фильтры частотой от 0,5 до 70 Гц. Запись ЭЭГ проводилась в состоянии расслабленного бодрствования и при функциональных нагрузках: открывание и закрывание глаз, ритмическая фотостимуляция, а также гипервентиляция в течение пяти минут. Визуальный анализ ЭЭГ проводился в биполярных и референциальных монтажах. Оценивалось наличие эпилептических разрядов, а также выраженность изменений основного ритма и фоновой ритмики, наличие/отсутствие паттерна «extreme delta brush».

2.4.2. Анализ МРТ изображений

МРТ выполнялось на базе ГКБ им В.М. Буянова на МРТ томографе 1.5 Тл. Проводилась оценка количества и характера очагов в головном и спинном мозге, наличие/отсутствие накопления контрастного препарата, МРТ картина соотносилась с существующими критериями McDonald [109] и Magnims [259] для РС. Для обследования пациентов с АЭ проводилось так же МРТ по протоколу эпилептологического сканирования [260] с целью исключения фокальной причины эпилептических приступов. Для части задач, помимо клинического анализа МРТ данных с целью измерения степени атрофии, объема очагов по FLAIR и определения типа патологии согласно классификации Tauhid и др. [261] использовалась программа Msmatrix (<https://icometrix.com>, Icometrix, Flanders, Belgium). Данная программа была аккредитована международными медицинскими агентствами для автоматического анализа МРТ пациентов с РС [262; 263] и на сегодняшний день широко используется в клинических и научных исследованиях [264]. Для определения типа патологии по Tauhid использовали данные, полученные при помощи программы Msmatrix по объему очагов и атрофии головного мозга.

Тип 1 = умеренная атрофия и небольшое количество очагов

Тип 2 = умеренная атрофия и большой объем очагов

Тип 3 = выраженная атрофия и небольшое количество очагов

Тип 4 = выраженная атрофия и большой объем очагов

Полученные данные использовались в анализе выраженности процессов атрофии и воспаления по данным при МРТ в сочетании с клинико-биохимическими показателями.

2.5. Статистическая обработка результатов исследования

Количественные переменные описывали следующими параметрами: числом пациентов, средним арифметическим значением (M), стандартным отклонением от среднего

арифметического значения ($M \pm SD$), в ряде случаев для непараметрических данных использовалась медиана и 25-75 процентиля ($Me [LQ; UQ]$).

Нормальность распределения количественных признаков проверялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Распределение большинства признаков отличалось от нормального, в связи с чем использовались методы непараметрической статистики. Для сравнения нескольких групп по количественному признаку применяли непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с апостериорными попарными сравнениями групп между собой с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони или использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным сравнением групп по критерию Ньюмена-Кейлса. Для выявления связи между признаками использовали коэффициент сопряженности Спирмена. Различия считали статистически значимыми при уровне ошибки $p < 0,05$.

Для сравнения качественных частотных показателей в части случаев использовали точный критерий Фишера. Для оценки исследованных показателей в качестве факторов риска прогрессирования заболевания использовалась логистическая регрессия и ROC-анализ.

Расчет выполнен на персональном компьютере с использованием:

- 1) приложения Microsoft Excel 2003
- 2) пакета статистического анализа данных Statistica 8.0 for Windows (StatSoftInc., США)
- 3) GraphPadPrism 6, США
- 4) SigmaPlot 11 (SSI, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клинические характеристики пациентов с АЭ

Нами были обследованы 24 пациента с возможным АЭ согласно критериям Graus et al (2016). Каждому пациенту проводился клинический и неврологический осмотр, скрининговое обследование по протоколу рекомендаций Европейской федерации неврологов по обследованию паранеопластических синдромов [265] и рекомендациям по обследованию АЭ [20].

Клинические характеристики, данные рутинного анализа ЦСЖ представлены в Таблицах 4 и 5, детальная клиническая картина представлена в Таблице 6.

Средний возраст больных составил 42,6 ($\pm 16,0$), женщин было в 2 раза больше, чем мужчин.

В ходе проведения дифференциального диагноза в нашем стационаре 5 человек были исключены из исследования (17 % всех пациентов). Дифференциальный диагноз для группы АЭ: гипопаратиреоз (n=1), шизофрения (n=1), васкулиты ЦНС (n=2), нейродегенеративное заболевание (n=1).

При анализе первичного направительного диагноза, который пациенты с АЭ имели в предыдущих клиниках при первом обращении в наш стационар, только 10 человек из 24 имели диагноз энцефалит, причем у двух пациентов ранее предполагался возможный инфекционный энцефалит, у одного пациента — болезнь Хашимото и для трех пациентов обращение в наш стационар было первичным (таким образом, 33,3 % пациентов имели диагноз возможного аутоиммунного энцефалита, 41 % диагноз возможного энцефалита).

Два пациента имели диагноз РС и одна пациентка демиелинизирующего заболевания ЦНС, таким образом, доля демиелинизирующих заболеваний составила 12,5 %.

Большую часть пациентов составляли пациенты с фармакорезистентной эпилепсией неуточненной этиологии (7 пациентов, 29 %), 3 пациента с цереброваскулярной патологией (12,5 %) и у одной пациентки предполагались психогенные нарушения (4 %).

На Рисунке 4 представлены первичные диагнозы, которые наблюдались в нашей группе пациентов с АЭ.

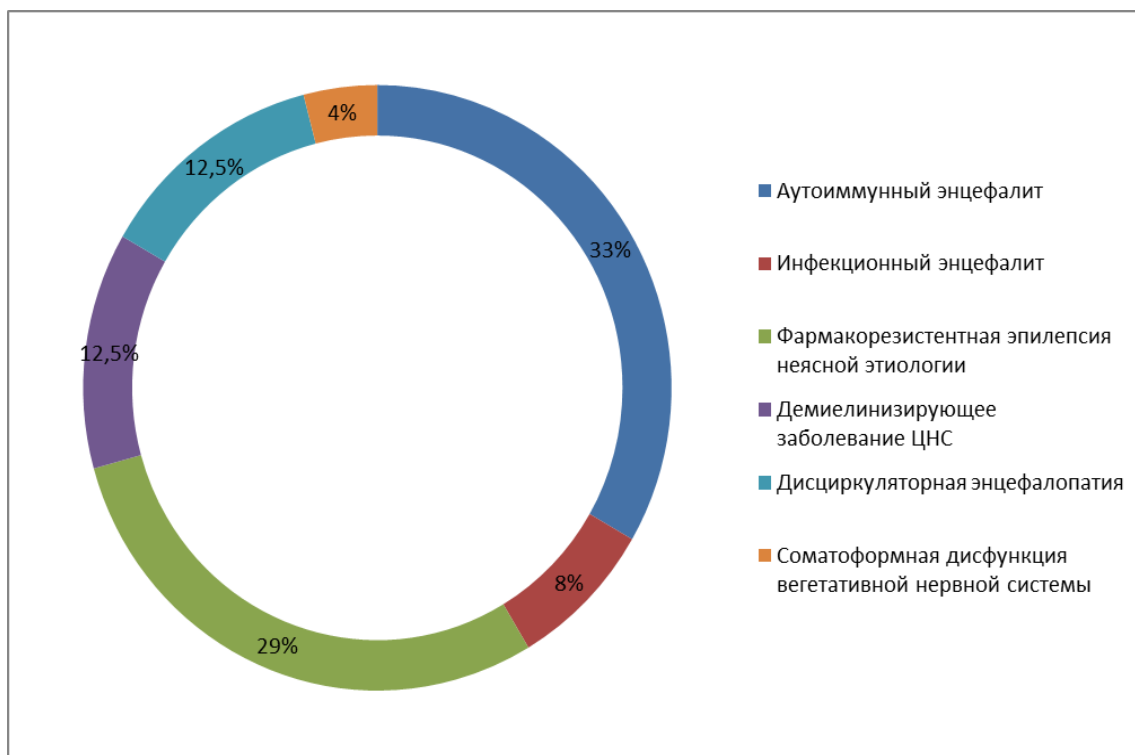


Рисунок 4 — Диаграмма первичных диагнозов для пациентов с АЭ (число, %)

Пять пациентов на начальном этапе до обращения к неврологу наблюдались с различными психическими нарушениями у психиатра (депрессия, параноидальное расстройство, возможные психогенные нарушения – 21 % пациентов). Два пациента (8 %) на начальном этапе направлялись к инфекционисту. Семь пациентов (29 %) первоначально наблюдались неврологами. 10 пациентов (42 %) наблюдались преимущественно неврологами-эпилептологами (Рисунок 5).

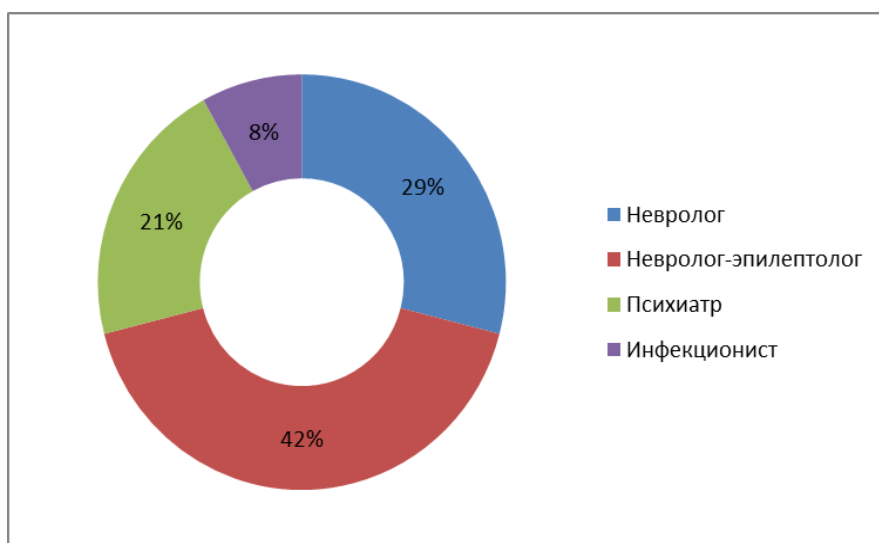


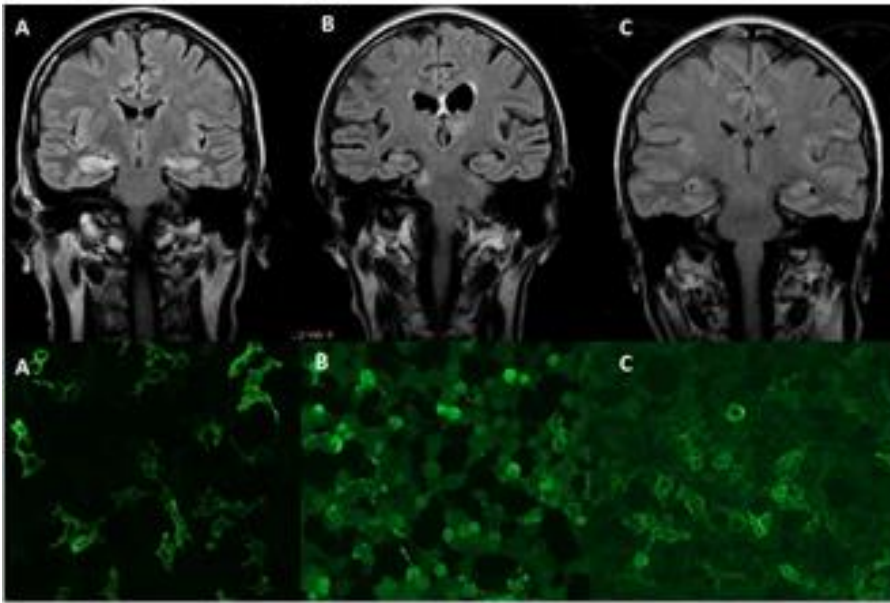
Рисунок 5 — Диаграмма первичных обращений к специалистам и наблюдения пациентов с АЭ в исследованной когорте АЭ

Спектр неврологических проявлений при АЭ был представлен эпилептическими приступами (13 пациентов, 54 %), когнитивное снижение (16 пациентов, 67 %), снижение уровня сознания (2 пациента, 8,3 %), психические нарушения (5 пациентов, 21 %), атаксия (2 пациента, 8,3 %), тетрапарез и повышение мышечного тонуса (2 пациента, 8,3 %), двигательные нарушения у одной пациентки (4,1 %), что отображено на Рисунке 6 [354]. Разницы по ведущим проявлениям (эпилептические приступы и когнитивные нарушения) между АЭ с известным антителом и антителнегативными АЭ выявлено не было.



Рисунок 6 — Спектр неврологических проявлений при АЭ

В ходе обследования были диагностированы 2 NMDA-энцефалита, 1 CASPR, 2 LGI1, 1 GABA β , 2 GAD, 1 анти-hu энцефалит, 2 энцефалита с антителами к SSa-SSb (пример результатов анализа на клетках, трансфецированных антигенами, и подтверждающими наличие данных антител у пациентов представлены на Рисунке 7 [346, 347]).



А: клинический случай № 3. GABA_B рецептор–ассоциированный энцефалит у пациента с мелкоклеточным раком легкого.

В: клинический случай № 1. NMDA рецептор–ассоциированный энцефалит у пациента с эпилептическими приступами, когнитивным снижением и раком мочевого пузыря

С: клинический случай № 22. Идиопатический LG1- ассоциированный лимбический энцефалит

Рисунок 7 — МРТ и ЦСЖ иммунореактивность при исследовании на биочипах с НЕК-клетками, трансфицированными поверхностными нейрональными антигенами

Соответственно полученным результатам, 9 пациентам был поставлен диагноз АЭ с известными антителами (37,5 %, среди них преобладали АЭ с антителами к поверхностными нейрональным антигенам —67 %), у 2 пациентов был диагностирован АЭ с антителами неясного значения (8,3 %), у 13 пациентов (54,1 %) был диагностирован вероятный АЭ согласно критериям Graus et al. [20] (Рисунок 8).

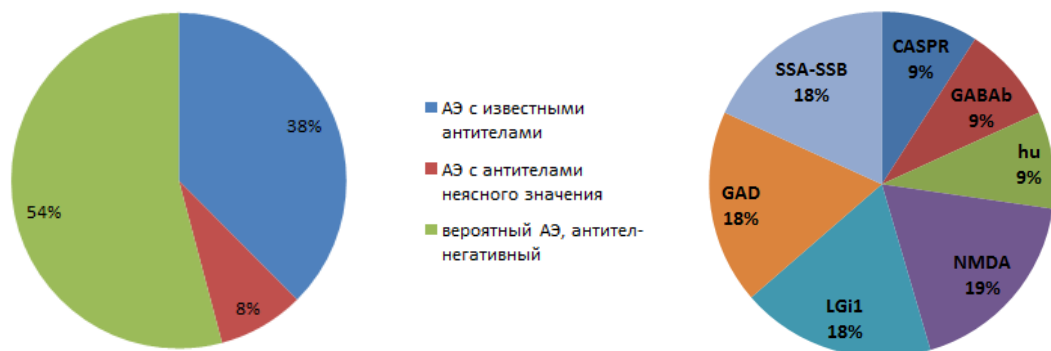
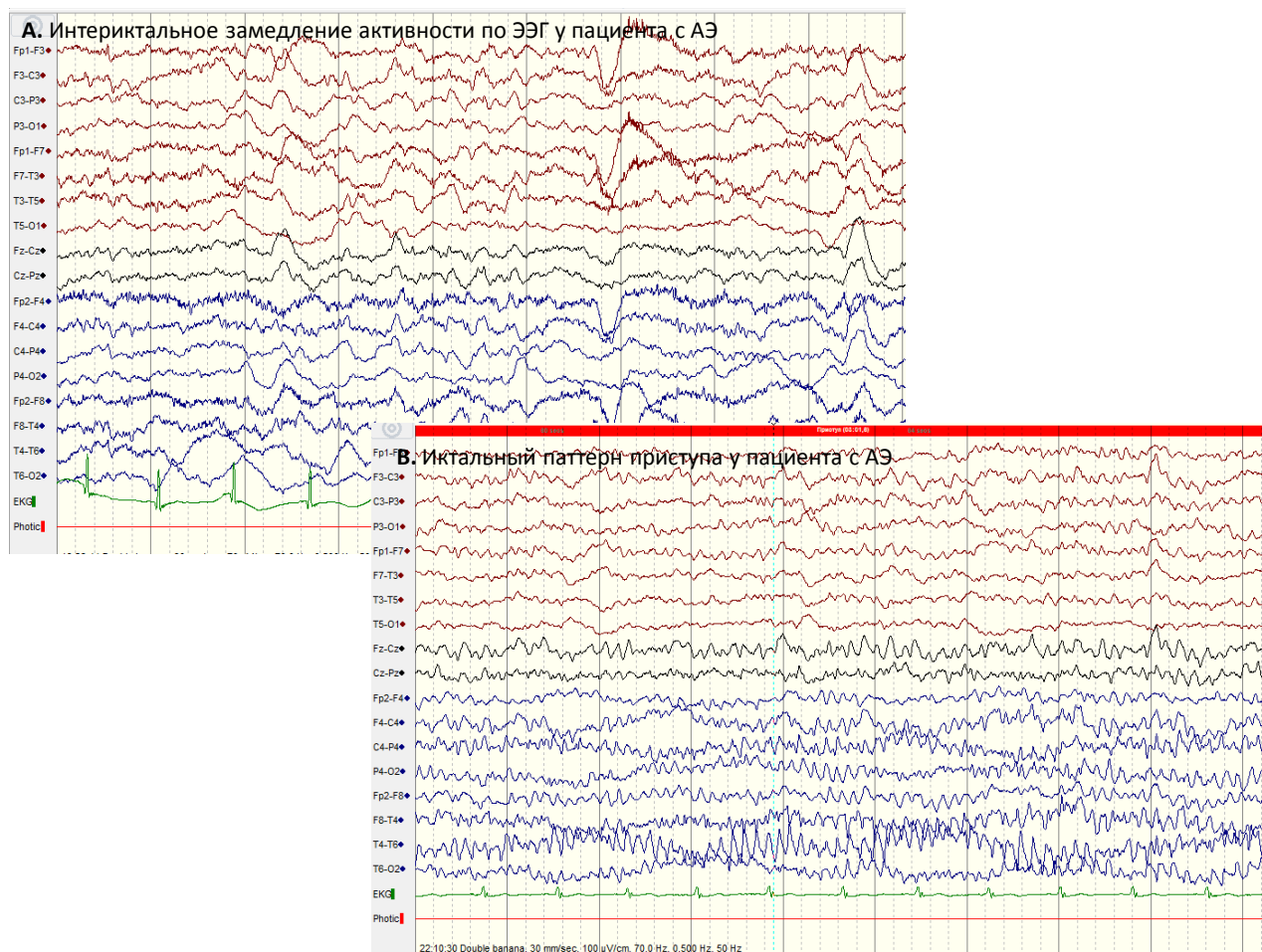


Рисунок 8 — Диаграммы подтипов АЭ в группе АЭ согласно критериям Graus et al. (левая диаграмма) и спектр выявленных антител (правая диаграмма)

Эти результаты соответствуют ранее полученным данным зарубежных исследователей [266; 267], что в различных выборках пациентов возможные АЭ составляют 40-50 %. Мы выявили одного пациента с позитивными антителами к рибосомальному белку Р в группе возможных АЭ, ранее подобные антитела описывались как ассоциированные с поражением ЦНС при системной красной волчанке, однако необходимо исследование на большей популяции с целью определения клинической значимости данных антител у пациентов с АЭ. В группе АЭ были выявлены тип 1-4 олигоклонального синтеза. У всех пациентов с онкологией был выявлен олигоклональный синтез (тип 2 и тип 4) при сравнении с 13 % пациентов с идиопатическим энцефалитом без выявленной патологии ($P < 0,05$).

Очаговое поражение головного мозга по МРТ наблюдалось у 14 пациентов (58 %).

У 13 пациентов отмечались эпилептические приступы (54 %). При анализе результатов видеоЭЭГ-мониторинга не было выявлено паттерна «extreme delta brush», характерного для NMDA-энцефалитов. У всех пациентов с эпилептическими приступами было выявлено диффузное замедление фоновой ритмики. У 7 пациентов из 13 зарегистрированы эпилептические разряды, у 4 пациентов эпилептические приступы в ходе видеоЭЭГ мониторинга (на Рисунке 9 приведен пример изменений у пациентки из случая 18 в обследованной серии пациентов АЭ). Обращает на себя внимание, что при регистрации приступов зона начала приступов могла быть разной локализации. Статистический анализ изменений не проводился в виду маленького числа пациентов и разной антител позитивностью у данных пациентов.



А: Интериктальное замедление активности по ЭЭГ у пациента с АЭ

В: Иктальный паттерн приступа у пациента с АЭ

Рисунок 9 — Продолженный видеоЭЭГ мониторинг пациентки с АЭ (случай 18)

6 пациентов (25 %) погибли в ходе 1 года наблюдения, 3 из этих пациентов имели сопутствующую онкопатологию. Средняя продолжительность жизни среди 6 пациентов после включения в исследование составляла 3,42 месяца ($\pm 2,8$), от 2 недель до 8 месяцев.

Биохимические маркеры и клиническое течение у пациентов с эпилептическими приступами и без, у пациентов с известными антителами и без известных антител не отличались между собой.

У всех пациентов с онкологией был выявлен олигоклональный синтез (тип 2и тип 4) при сравнении с 13 % пациентов с идиопатическим энцефалитом без выявленной патологии ($P < 0,05$, точный критерий Фишера).

Таким образом, при анализе нашей группы пациентов с АЭ была выявлена высокая смертность у пациентов с АЭ в ходе развития заболевания, как с онкологической, так и без онкологической патологии.

Далее проводилось сравнение между пациентами с тяжелым течением энцефалита, погибшими в ходе обострения или за период наблюдения. У пациентов с тяжелым течением АЭ

был выявлен высокий уровень Ил-6 и фНФТ. Таким образом, можно говорить об активном течении воспаления и нейродегенерации у пациентов с тяжелым течением АЭ.

Ниже приводится краткое клиническое описание пациента с аутоиммунным паранеопластическим энцефалитом с антителами к GABA_BR.

Клинический случай (№ 3 из Таблицы 5) [355]

Пациент № 3, М, 62 лет, доставлен в ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» по скорой медицинской помощи в связи с серией судорожных приступов. Из анамнеза известно, что болен в течение полугода, когда впервые развились два эпилептических приступа с фокальным началом и переходом в билатеральные тонико-клонические. Госпитализирован, компьютерная томография головного мозга и рутинная ЭЭГ без патологии, выставлен диагноз «эпилепсия» без уточнения этиологии и назначен карбамазепин 600 мг в сутки. Далее в течение месяца отмечалось прогрессирующее снижение памяти, нарушение кратковременной памяти, дезориентация в месте, времени и собственной личности, требовал наблюдения и ухода родственников. Эпилептические приступы повторялись 1 раз в неделю. При поступлении в ГБУЗ «ГКБ имени ВМ Буянова ДЗМ» диагностирована картина лимбического энцефалита, выполнено МРТ ГМ — гиперинтенсивность медиального височного комплекса с двух сторон на FLAIR и T2-изображениях (Рис. 7, А). Дообследован: видеоЭЭГ — эпилептические разряды в височной доле справа и слева, височная перемежающаяся ритмическая дельта-активность — TIRDA. При люмбальной пункции — белок 0.2 г/л, цитоз 4/3, при онкопоиске при компьютерной томографии грудной клетки выявлен центральный рак правого легкого. Установлен диагноз «Лимбический энцефалит паранеопластической этиологии на фоне Сг правого легкого». Проведена терапия – высокообъемный плазмаферез, пульс-терапия метилпреднизолоном в высокой дозе с положительным эффектом: на фоне терапии ориентирован в месте, времени, пространстве и собственной личности, стал обслуживать себя, эпилептические приступы регрессировали. Передан под наблюдение онкологов. Смерть через шесть месяцев после постановки диагноза.

При обследовании в рамках НИР:

Анализ крови на паранеопластические антитела отрицательны, при скрининге сыворотки крови и ЦСЖ на панели Euroimmune выявлены антитела к поверхностным нейрональным антигенам GABA_B в ЦСЖ и сыворотке крови (Рисунок 7, А), что позволило уточнить диагноз: Лимбический энцефалит с антителами к GABA_BR, предсказать хороший ответ на противовоспалительную терапию и достаточно высокую вероятность онкопатологии (по данным литературы у 50 % пациентов данный АЭ является паранеопластическим, антитела описаны в том числе и при раке легкого). Цитоз и белок в норме, однако, при исследовании ЦСЖ пациента было отмечено, что несколько изучаемых показателей превышают

установленные в нашей работе референтные значения: выявлен крайне высокий уровень фНФТ – 570 пг/мл (превышает максимум значения в контрольной группе в 4 раза), повышенный уровень неоптерина при сравнении со значением медианы контрольной группы. В нашем исследовании не определялся уровень cut-off для данных показателей, однако повышение уровня неоптерина и фНФТ свидетельствует о наличии воспаления и клеточной гибели, что иллюстрирует выводы, сделанные на всей выборке пациентов. Более полный анализ данных показателей будет возможен после анализа данных маркеров на больших выборках АЭ.

3.2. Анализ маркеров воспаления и нейродегенерации у пациентов с АЭ, РС и в контрольной группе

В первую часть исследования были включены 68 пациентов с РС (диагноз которым был выставлен полностью в соответствии с критериями McDonald [109], 11 из которых имели эпилепсию и у 7 пациентов имелось сопутствующее системное заболевание (4 пациента с анкилозирующим спондилоартритом, данные клинические кейсы были описаны нами ранее [268], и по одному пациенту с анамнестическим диагнозом болезни Шегрена, саркоидоза и ревматоидного артрита). Более высокий процент пациентов с эпилептическими приступами (16 %) в нашей когорте пациентов с РС при сравнении с рядом предыдущих исследований [269] вероятнее всего связан с более частым наличием показаний к диагностической люмбальной пункции у данной группы пациентов. После скрининга антител к поверхностным антинейрональным антигенам мы не нашли положительных результатов в ЦСЖ и сыворотке крови у данных пациентов.

После скрининга антител к анти-рибосомальном белку Р мы выявили одну положительную пациентку с РС и эпилепсией, однако все остальные пациенты были негативными по данному маркеру. Таким образом, среди 92 пациентов мы выявили положительные антитела у двух пациентов (РС + эпилепсия и вероятный АЭ). Данные антитела показали свою значимость у пациентов с невролчанкой и нейропсихиатрическими проявлениями [270; 271], однако в наших группах больных требуется изучение значимости данных антител на большей выборке пациентов.

В группе пациентов с АЭ отмечалась умеренная положительная корреляция уровня цитоза с уровнем неоптерина, белка, уровня Ил-6 (коэффициент корреляции Спирмена $r=0,54$, $0,55$, $0,67$, соответственно, $p<0,05$). Уровень белка имел умеренную корреляцию с уровнем Ил-6 и уровнем неоптерина ($0,51$ и $0,57$, соответственно, $p<0,05$).

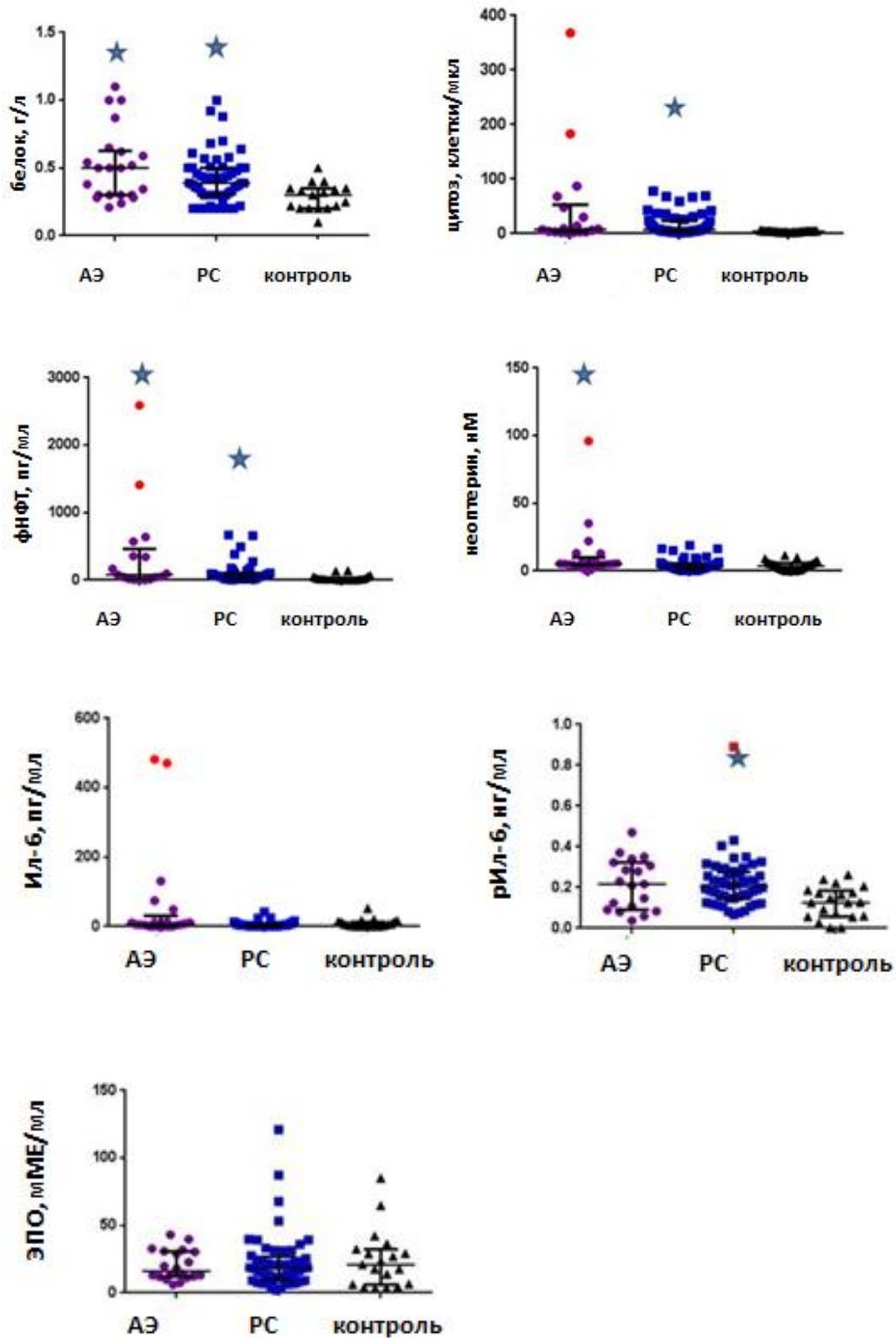
В группе пациентов с РС была выявлена положительная корреляция возраста и EDSS ($r=0,38$, $p<0,05$) и негативная корреляция с уровнем ЭПО в ($r=-0,34$, $p<0,05$). Корреляция слабой силы была выявлена между EDSS и уровнем ИЛ-6 в ЦСЖ ($r=0,32$, $p=0,008$).

В контрольной группе был выявлен более высокий уровень ЭПО у мужчин при сравнении с женщинами ($p=0.004$). При корреляционном анализе была выявлена корреляция средней силы между уровнем рИЛ-6Р и уровнем ЭПО ($r=0.58$, $p<0.05$)

Уровни показателей, полученные при измерении в группах АЭ, РС и контрольной группе были сравнены между собой с использованием критерия Краскела-Уоллиса, после чего в группах с полученным различием (белок, цитоз, Ил-6, рИл-6Р, фНФТ, неоптерин, соответственно) проведено попарное сравнение с использованием теста Манн-Уитни с поправкой Бонферрони ($p<0,017$). Не было найдено каких-либо различий для уровня Ил-6. В группа АЭ был выявлен более высокий уровень белка, фНФТ и неоптерина при сравнении с контрольной группой ($0,5 \pm 0,3$ vs $0,3 \pm 0,1$ г/л, $377,9 \pm 675$ vs $23,9 \pm 35$ нг/мл, $11,8 \pm 2$ vs $3,5 \pm 3,3$ нМ, соответственно). Сравнение РС с контрольной группой выявило более высокий уровень цитоза у пациентов с РС ($16,3 \pm 19,8$ vs $3,9 \pm 1,2$ клеток/мкл), белка ($0,4 \pm 0,2$ vs $0,3 \pm 0,1$ г/л), фНФТ ($98,4 \pm 100$ vs $23,9 \pm 35$ нг/мл) и рИЛ-6Р ($0,2 \pm 0,1$ vs $0,1 \pm 0,1$ нг/мл) (Таблица 9, Рисунок 10).

Таблица 9. Концентрация маркеров нейровоспаления и нейродегенерации в ЦСЖ больных аутоиммунными заболеваниями ЦНС (медиана [LQ; UQ])

Концентрация маркеров, ЦСЖ	АЭ	РС	Контроль	Значение р (критерий Краскела-Уоллиса)
фНФТ (пг/мл)	78,8 [17,9; 356,8]	50,1 [1,6; 94,8]	13,5 [0,1; 21,3]	$p=0,003$
Неоптерин (нМ)	5,2 [4,5; 7,3]	3 [0,5; 5,6]	3,6 [0,2; 5,3]	$p=0,01$
ЭПО (мМе/мл)	15,9 [12; 30]	18,4[9,9; 28,7]	20,8 [6,1; 32,3]	$p=0,8$
Ил-6 (пг/мл)	10,6 [4,52; 16]	3,5 [1,8; 8,3]	3,6 [0,3; 13,5]	$p=0,04$
рИл-6Р(нг/мл)	0,2[0,1; 0,3]	0,2 [0,1; 0,3]	6,2 [1,4; 14,2]	$p=0,005$

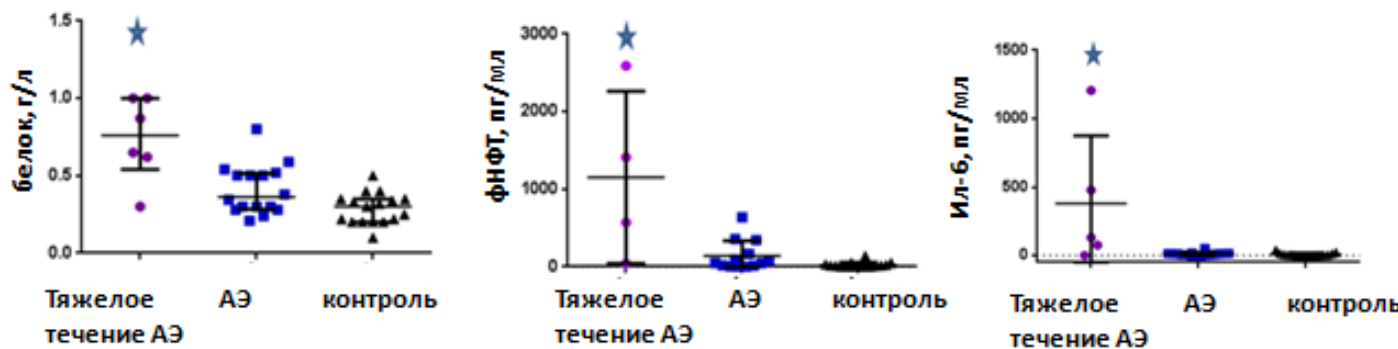


(* $p < 0,017$, использовался тест Манн-Уитни с поправкой Бонферрони, отличие от контроля)

Рисунок 10 — Уровень белка, цитоза, фНФТ, неоптерина, ЭПО, Ил-6, рИл-6 Р у пациентов с АЭ, РС и контрольной группе

При сравнении АЭ с РС уровень белка и фНФТ были одинаковы, однако уровень неоптерина был выше в группе АЭ ($11,8 \pm 2$ vs $4,3 \pm 2,1$ нМ). Дисперсионный анализ (ANOVA)

не выявил зависимости между группами с эпилепсией и без. Дисперсионный анализ показал разницу в виде более высокого уровня белка ($0,7 \pm 0,3$ vs $0,4 \pm 0,2$ г/л), фНФТ (1153 ± 1011 vs 84 ± 72 нг/мл), Ил-6 (377 ± 228 vs $8,3 \pm 11$ пг/мл) в группе АЭ, умерших в течение года наблюдения (Рисунок 11).



* $p < 0,017$, использовался тест Манн-Уитни с поправкой Бонферрони, отличие от контроля)

Рисунок 11 — Уровень белка, фНФТ, Ил-6 в группе АЭ с тяжелым течением, других АЭ и контрольной группе

С использованием одномерной логистической регрессии уровень белка был выявлен как значимый фактор, ассоциированный с гибелью пациента (отношение шансов 21.2 при повышении на 1 г/л, $p=0,04$, доверительный интервал 1,1 до 684), и после стандартизации для фНФТ и ИЛ-6 в ЦСЖ данные результаты были так же подтверждены, однако их значимость должна быть оценена на большей группе пациентов.

Для оценки возможного вклада уровня белка в патологический процесс был проведен ROC-анализ и площадь под ROC-кривой оказалась равной 0,78 (уровень «cut-off» 0,62 г/л, чувствительность 0,8, специфичность 0,87, рисунок 12), что находится на уровне «хороших» значений. Однако с учетом размеров выборки данный анализ должен быть подтвержден в исследовании на большей популяции.



* $p < 0,03$, использовался ROC-анализ и площадь под ROC-кривой равна 0,78 (уровень «cut-off» 0,62 г/л, чувствительность 0,8, специфичность 0,87),

Рисунок 12 — ROC-кривая (уровня белка в ЦСЖ при АЭ и исход заболевания)

Основываясь на предыдущих результатах [272], о том, что уровень Ил-6 больше 10пг/мл может быть использован для разделения РС от других воспалительных заболеваний ЦНС, мы выполнили данный анализ в нашей группе пациентов. Однако данный уровень cut-off не позволял различить пациентов с АЭ и РС. Также мы использовали результаты К. Kothur и соавт. [141], однако по уровню неоптерина выше 29 пМв нашем исследовании было выявлено только два пациента с АЭ, поэтому мы не смогли использовать этот показатель для дальнейшего анализа. Вероятнее всего объясняется разницей между группами пациентов в нашем исследовании и в предшествующих (в исследовании Kothur К. и соавторов исследовалась популяция детей).

3.3. Анализ МРТ в группе демиелинизирующих заболеваний ЦНС, корреляция данных МРТ с клинико-биохимическими показателями

Мы сравнили группу РС, РС с сопутствующим системным заболеванием и контрольную группу. Данные группы не отличались по уровню биохимических показателей. В группе РС с сопутствующими системными заболеваниями [340] были найдены:

- 1) сильная корреляция выраженности неврологического дефицита, оцененная по шкале EDSS с возрастом ($r=0,75$, $p<0,05$)
- 2) ЦСЖ Ил-6 и фНФТ с возрастом ($r=0,87$ и $0,9$, соответственно)
- 3) ЦСЖ Ил-6 с фНФТ($r=0,82$) и EDSS ($r=0,98$)

Мы не выполняли регрессионный анализ в связи с маленьким количеством пациентов в данной группе, однако взаимосвязь ИЛ-6 и фНФТ с агрессивностью течения заболевания с возрастом крайне вероятна. Возможна роль значимой активации цитокиновой оси Ил-6 и процессов нейродегенерации у пациентов с сопутствующими системными патологиями.

В данной группе пациентов у части из них (n=23) был проведен количественный анализ МРТ при помощи программы Msmetrix (<https://icometrix.com>, Icometrix, Flanders, Бельгия) и проведено определение типа патологии по Tauhid и соавт. [261] (Рисунок 13).

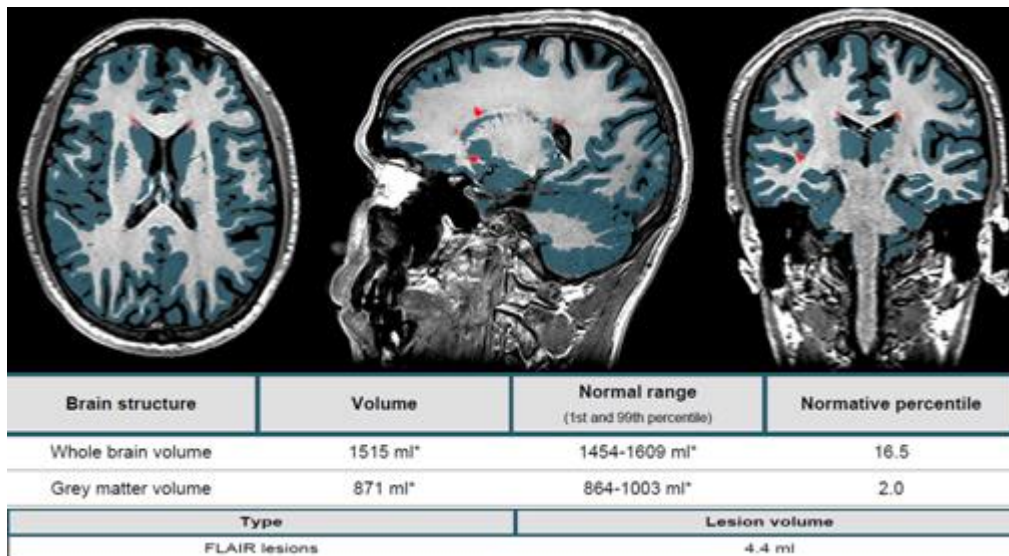


Рисунок 13 — Анализ МРТ при помощи программы Msmetrix

В ходе анализа не было выявлено разницы между двумя группами по изученным показателям, однако в общей группе были выявлены следующие корреляции:

- 1) Отрицательная корреляция средней силы возраста и объема мозга ($r=-0,67$), фНФТ и объемом серого вещества в нормативных перцентилях ($r=0,5$),
- 2) положительная корреляция средней силы между уровнем ЭПО и общим объемом мозга ($r=0,68$);
- 3) положительная корреляция типа патологии с EDSS, ЦСЖ Ил-6 ($r=0,47$ для обоих показателей), объемом очагов по FLAIR ($r=0,55$) и отрицательная корреляция со степенью атрофии мозга ($r=-0,49$) и уровнем ЭПО в сыворотке крови ($-0,64$) ($p<0,05$ для всех коэффициентов корреляции).

3.4. Анализ маркеров воспаления и нитрозотиолов у пациентов с разными формами демиелинизирующих заболеваний (РС, ОРЭМ, ОМ)

Уровень Ил-6 в сыворотке был выше в группе РС, однако статистически значимых различий продемонстрировано не было. Ил-6 уровень в ЦСЖ перед нагреванием (свободный уровень ИЛ-6) был выше у пациентов с ОРЭМ и ОМ ($2,9\pm 0,8$ и $3,1\pm 0,3$ пг/мл, соответственно, при сравнении с контрольной группой $0,8\pm 0,2$ пг/мл; $p<0,05$), как и ранее было описано в работах Uzawa [273], но не в группе РС. После нагревания и высвобождения Ил-6 из связанной формы с растворимым рецептором Ил-6 было выявлено повышение во всех группах при сравнении с контролем, в том числе, и в группе РС ($p=0,01$).

Корреляции между уровнем Ил-6 в сыворотке и ЦСЖ найдено не было, что также отмечалось в ранее полученных работах об интрацельном синтезе Ил-6 при демиелинизирующих заболеваниях. Не было выявлено корреляции между интрацельным синтезом Ил-6 и уровнем RSNO, и селективного увеличения Ил-6 при наличии очагов в СМ.

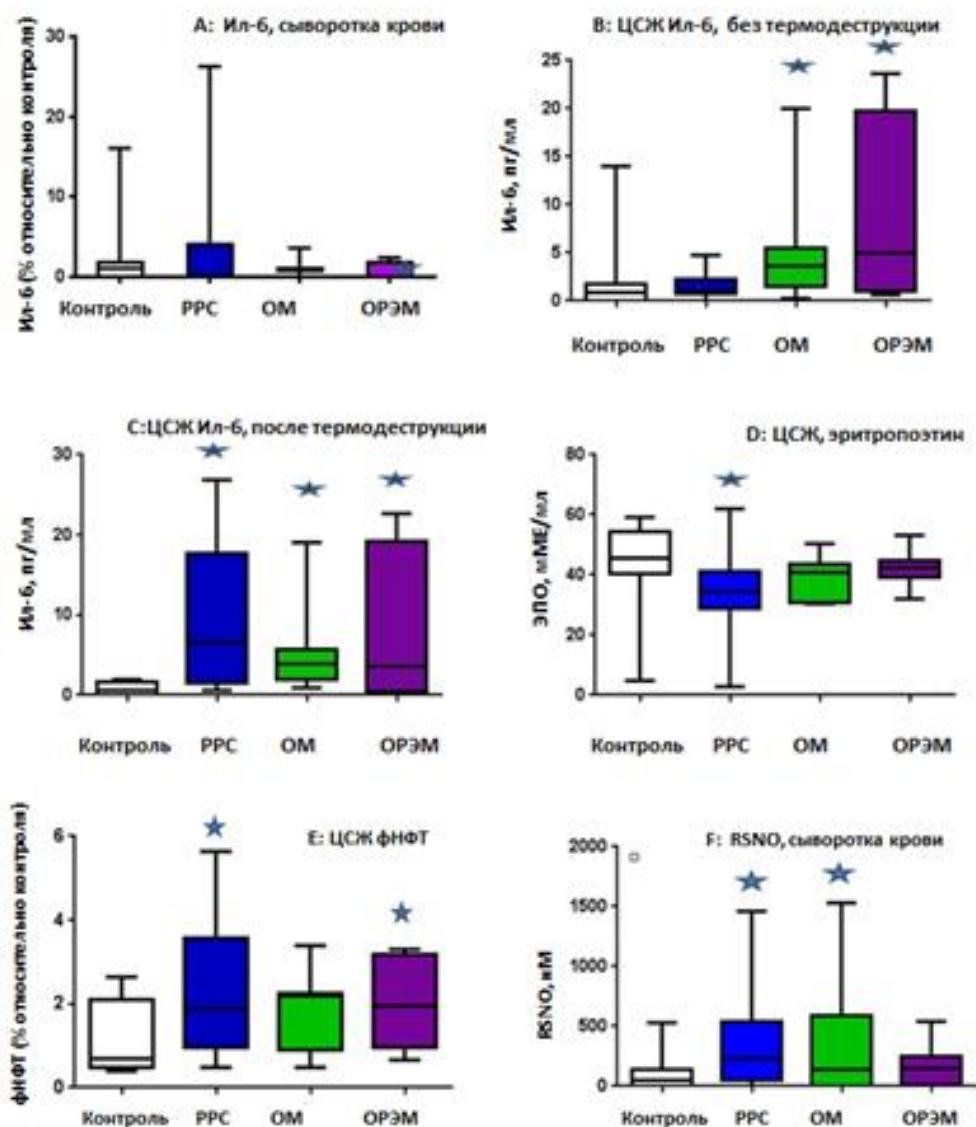
Снижение уровня ЭПО было выявлено у пациентов с РС при сравнении с контрольной группой ($39,7 \pm 4,0$ vs $49,8 \pm 9,0$ мМЕ/мл; $p < 0,01$), что может быть связано с хроническим длительным воспалительным процессом при РС и коротким при ОРЭМ, а также другим патофизиологическим механизмом с преимущественным вовлечением В-клеток при ОРЭМ.

Уровень фНФТ в ЦСЖ был выше у пациентов с РС и ОРЭМ ($p < 0,05$), тогда как у пациентов из группы ОРЭМ не отличался от контрольной группы [341, 348-350].

Уровень RSNO в сыворотке при множественном сравнении между группами был выше у пациентов с РС и ОРЭМ ($p < 0,05$). Корреляции между маркерами (фНФТ, Ил-6, RSNO) и клиническими показателями выявлено не было [343, 357]. Гипотеза об Ил-6 зависимой активации нитрозативного стресса в СМ, разработанная *in vitro*, не была подтверждена [337].

Нами не была выявлена корреляция между воспалительными маркерами и уровнем фНФТ, что может быть связано с острым процессом нейровоспаления при РС и ОРЭМ и медленным прогрессированием процессов нейродегенерации, либо с отсутствием четкой взаимосвязи между этими процессами в острой стадии.

Данные изменения представлены на рисунке 14.

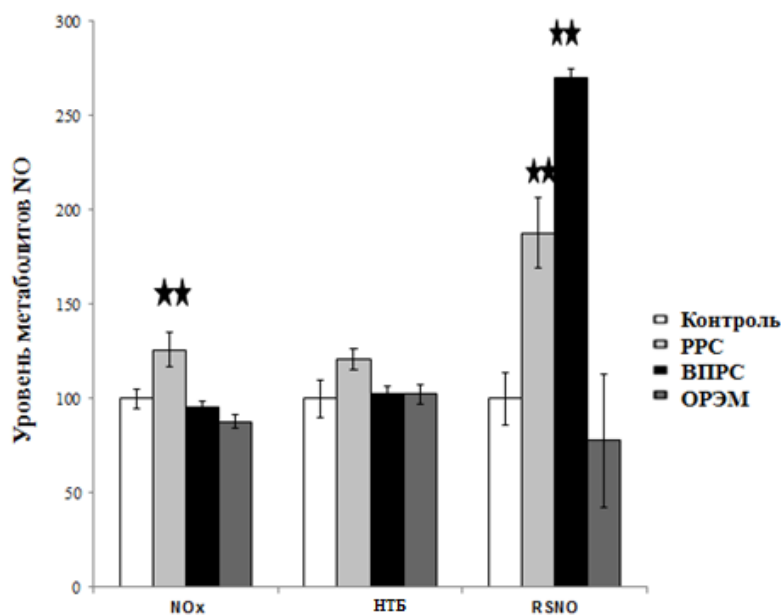


(* $p < 0,05$, критерий Краскелла-Уоллиса с попарными сравнениями групп между собой с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, отличие от контроля)

Рисунок 14 — Уровень Ил-6, ЭПО, фНОТ, RSNO в сыворотке крови и ЦСЖ пациентов с PPC, OM, ОРЭМ и контрольной группе

3.5. Анализ маркеров нитрозативного стресса у пациентов с разными формами течения рассеянного склероза

Данные пациентов с PPC, ВПРС, ОРЭМ и контрольной группы были сравнены между собой (Рисунок 15). Для данного сравнения мы нормализовали уровень метаболитов NO, полученных во всех экспериментах, относительно контрольной группы.



(** $p < 0,01$, отличие от контроля при попарном сравнении групп между собой с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони после полученных достоверных различий по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$)

Рисунок 15 — Содержание (% от контроля) метаболитов NO в сыворотке крови

Повышенный уровень NOx был выявлен в группе пациентов с PPC ($p=0,01$; $1,26 \pm 0,47$ vs $1,0 \pm 0,25$ %, соответственно), тогда как уровень RSNO был выше у пациентов с PPC и ВПРС ($p < 0,01$; $3,7 \pm 2,3$ и $2,7 \pm 1,8$ vs $1,0 \pm 1,08$ %, соответственно). Не было выявлено взаимосвязи между уровнем NOx и НТБ с клиническими показателями. Таким образом, в данной части работы был изучен уровень метаболитов NO (RSNO, NOx и НТБ) на ранней и прогрессирующей стадии РС. В целом, нами были подтверждены данные предыдущих исследований [240; 274] и показана повышенная активность NO у пациентов с РС на обеих стадиях.

Увеличенный уровень NOx выявлен у пациентов с PPC в стадию обострения, но не у пациентов с ВПРС. Для НТБ не было найдено корреляции с клиническими показателями, что, вероятнее всего, связано со специфическими условиями образования НТ в ходе активности преимущественно iNOS в острой фазе РС [186]. В нашем исследовании уровень RSNO не коррелировал с уровнем NOx, что соответствует данным, полученным на модели ЛПС-вызванного энцефаломиелита Liu и соавт. [224].

RSNO коррелировали с возрастом (Рисунок 17), полом (в группе пациентов был также выявлен более высокий уровень у мужчин при сравнении с женщинами) и поражением СМ.

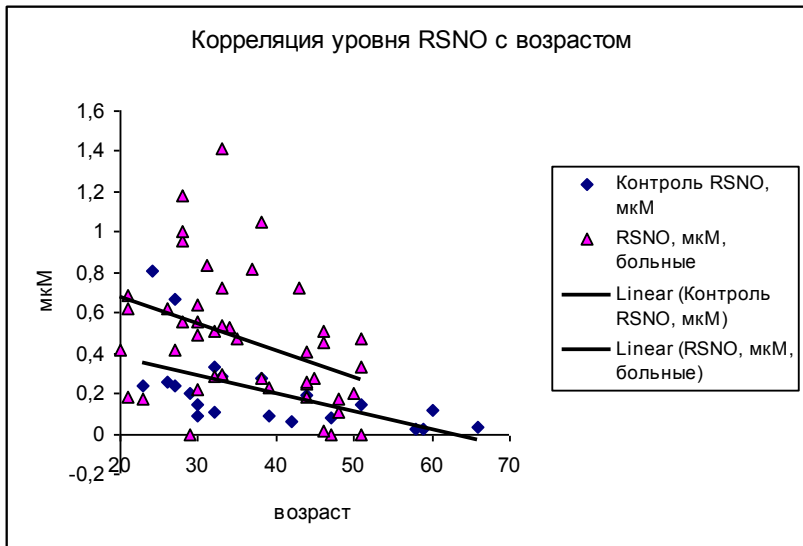
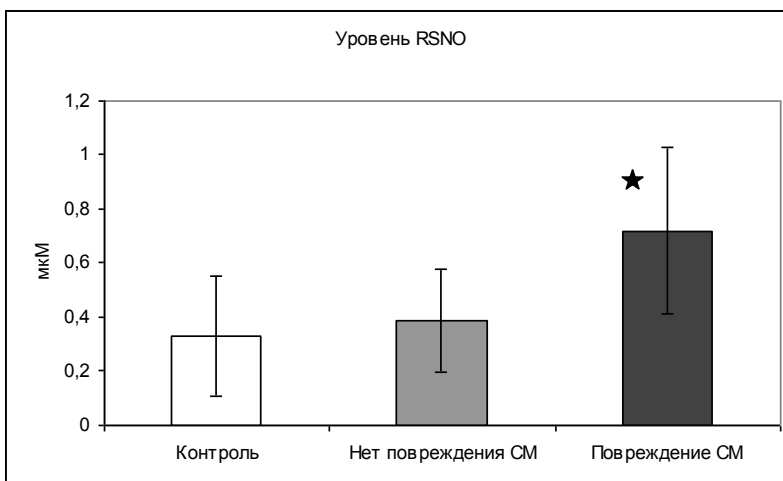


Рисунок 16 — Корреляция уровня RSNO (мкМ) в сыворотке крови и возраста

Основываясь на МРТ данных, повышение уровня RSNO было найдено только в группе с наличием очагов в СМ при сравнении с пациентами без поражения СМ и контрольной группой (Рисунок 16). При анализе корреляции уровня RSNO и общего объема поражения СМ (оценка в протяженности по числу позвонков) была выявлена корреляция умеренной силы ($r=0,56$, $p=0,02$).



(* — $p<0,05$, отличие от контроля и группы без повреждения СМ, критерий Краскелла-Уоллиса с попарными сравнениями групп между собой с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Рисунок 17 — Концентрация RSNO (мкМ) в сыворотке крови у пациентов с очагами в СМ и без очагов

При оценке уровня RSNO, пола и возраста в качестве факторов риска возникновения очагов в СМ с использованием логистической регрессии было выявлено, что уровень RSNO является фактором, от которого зависит возникновение очага в СМ, тогда как пол и возраст непосредственно такими факторами не являются (Для модели логистической регрессии $p=0,0005$, коэффициент $b = - 4,486$. Для RSNO $b=0,989$, $p=0,002$, отношение шансов=2,7). Интерпретация данного результата достаточно сложна, так как неясно, что является причиной: массивное глиальное повреждение в СМ, которое можно наблюдать на периферии в результате выброса RSNO или более высокая патологическая или компенсаторная активность процессов нитрозилирования, протекающая в СМ. Для оценки возможного вклада уровня RSNO в патологический процесс был проведен ROC-анализ и площадь под ROC-кривой (AUC), которая отражает предсказательную способность модели, оказалась равной 0,8 (уровень «cut-off» 1,46 %, чувствительность 0,81, специфичность 0,75), что находится на уровне «хороших» значений.

Таким образом, RNSO может быть рассмотрен в качестве потенциального маркера поражения СМ [339, 356]., однако необходимо проведение исследования на большей популяции. При дальнейшем биохимическом анализе было выявлено, что наибольший вклад вносят белковые фракции RSNO.

Были проведены эксперименты по осаждению белковой части сыворотки и последующем измерении RSNO в надосадочной жидкости. По уровню низкомолекулярных RSNO отличий между контрольной группой и группой больных получено не было ($p=0,169$), как не было выявлено корреляции с общим уровнем RSNO.

Нитрозотиолы, связанные с белками коррелировали с поражением спинного мозга ($r=0,61$, $p=0,01$), что указывает на ассоциацию между белок-связанными нитрозотиольными группами и поражением СМ. Кроме того, надо принимать во внимание, что низкомолекулярные RSNO являются короткоживущими и неустойчивыми соединениями, поэтому отсутствие разницы можно объяснить этапами подготовки образцов сыворотки.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аутоиммунные заболевания ЦНС — гетерогенная группа заболеваний, которая может проявляться совершенно различными клиническими симптомами и нейровизуализационными данными. Их своевременная диагностика крайне важна, так как существует иммуносупрессивная и иммуномодулирующая терапия, которая при ее применении на раннем этапе может значительно улучшить прогноз, как у пациентов с демиелинизирующими заболеваниями (РС, ОМ, ОРЭМ), так и для АЭ. С учетом данной информации крайне важно выявлять данные состояния на ранних стадиях с использованием дополнительных тестов и маркеров. В условиях клиники показатели нейровоспаления и нейродегенерации в биологических жидкостях являются доступным источником информации о нейрохимических механизмах, протекающих в тканях ЦНС [338].

Помимо патофизиологических механизмов развития заболевания и определение таргетных мишеней для лечения, одной из наиболее важных проблем является дифференцирование РС на ранней стадии от других аутоиммунных патологий ЦНС и выявления маркеров течения заболевания. При РС до сих пор не выявлено точного антигена и антитела, которые приводят к развитию заболевания, поэтому во многих работах РС описывается как аутоиммунное заболевание ЦНС [95], однако часть экспертов предлагает называть его иммуноопосредованным заболеванием, в виду того, что полностью критерии характерные для истинно аутоиммунных заболеваний для РС на сегодняшний день не выполнены [275]. Однако ведущая роль активации воспаления и иммунной системы в патогенезе РС на сегодняшний день не подлежит сомнению.

4.1. АЭ: клиническая характеристика, нейровоспаление и нейродегенерация

В настоящей работе впервые в российской популяции предпринят анализ АЭ у пациентов взрослого возраста, поступающих в многопрофильный стационар (ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ») с поступлением по скорой медицинской помощи и планово.

Ранее в русскоязычных изданиях были описаны единичные случаи подтвержденных АЭ с выявленными антителами в различных стационарах и регионах РФ.

1) Особенности клинического течения у 2х пациенток с NMDA-энцефалитом были описаны Е.А. Кондратьевой [276], в том числе изменения метаболизма при ПЭТ с фтордезоксиглюкозой на протяжении заболевания. Значительный интерес представляет второй случай, где согласно данным, приведенным в статье, отмечался регресс симптоматики с частичным восстановлением без специфической терапии. Обе пациентки сначала были госпитализированы в инфекционный стационар, и, ввиду выраженной продуктивной

симптоматики, наблюдались психиатрами. Было описано еще несколько случаев NMDA-энцефалита: у девочки 5 лет [277], у пациентки 28 лет [16], а также крайне показательный случай аутоиммунного энцефалита неуточненной этиологии (возможный NMDA-энцефалит по мнению авторов) с летальным исходом [278], в котором отражены вопросы сложности диагностики данной патологии и необходимости своевременного лечения.

2) Описаны клинические случаи синдрома ригидного человека [279; 280] с различными проявлениями.

3) Также было описано несколько случаев лимбического энцефалита — один паранеопластический лимбический энцефалит у пациента с аденокарциномой прямой кишки и регрессом симптомов после радикальной резекции опухоли, и идиопатического лимбического энцефалита с регрессом симптомов на фоне терапии леветирацетамом, а также подробный анализ литературы приведены Торопиной Г.Г. [17], однако известные антитела в данных случаях не выявлялись. Описан случай бессудорожного эпилептического статуса [281] при лимбическом энцефалите, идиопатического лимбического энцефалита [282], а так же случаи параинфекционных и паранеопластических лимбических энцефалитов [18]. Написаны литературные обзоры, посвященные отдельным синдромам — иммунным атаксиям, синдромам, ассоциированным с антителами к GAD [54], иммунообусловленным эпилепсиям [283], паранеопластическим неврологическим синдромам при различных онкологических патологиях [284; 285], проблемам диагностики аутоиммунных энцефалитов. Наиболее полно раскрыта проблема паранеопластических синдромов [286–288], в том числе у детей [289; 290], однако большинство работ посвящено поражению периферической нервной системы и характеристике полинейропатий при различных онкопатологиях [287; 291].

Анализ группы АЭ с преимущественным поражением ЦНС и возможных диагностических ошибок до настоящего времени в российской популяции не проводился.

В данной работе был проведен соответствующий клинический анализ с описанием неврологических и нейропсихологических симптомов, инструментальный анализ с оценкой МРТ, ЭЭГ, рутинных показателей ЦСЖ, определен ряд антител и дополнительных показателей воспаления и дегенерации. Таким образом, в ходе первой части исследования была предпринята попытка найти маркеры ЦСЖ, которые помогут служить дополнительным маркером для постановки диагноза, а также описать характер нейроиммунных взаимодействий при данном заболевании. На основании полученных данных были сформулированы возможные дополнительные маркеры тяжести течения заболевания и активности воспалительного процесса. Описан дифференциальный диагноз и клинические проявления АЭ, так как диагностика на ранних стадиях важна в связи с излечимостью данных состояний при правильной и своевременной терапии АЭ. Кроме того, чем раньше начато лечение, тем лучше

исход заболевания [292], что достаточно затруднительно при существующих алгоритмах диагностики АЭ.

В большинстве работ АЭ сравнивают с инфекционными энцефалитами [293], и крайне редко с демиелинизирующими заболеваниями [294], однако в ходе анализа работы неврологического отделения экстренной и плановой помощи, и клинических проявлений, было выяснено, что в неврологической практике АЭ попадают в поле зрения неврологов, которые занимаются аутоиммунными патологиями ЦНС и проводится дифференциальный диагноз с демиелинизирующими заболеваниями, ОРЭМ, другими аутоиммунными патологиями. Кроме того, на сегодняшний день описан ряд патологий, который лежит на пересечении нескольких патологий — энцефалитов, энцефаломиелитов и демиелинизирующих заболеваний. Наиболее хорошо изучены МОГ-ассоциированные энцефалиты и энцефаломиелиты, которые встречаются как среди пациентов с АЭ, так и с среди пациентов с демиелинизирующими патологиями ЦНС. С учетом данной специфики в данной работе представлен новый разработанный дизайн исследования при сравнении пациентов АЭ с РС и контрольной группой.

Средний возраст больных составил 42,6 лет ($\pm 16,0$), женщин в 2 раза больше, чем мужчин. В ходе проведения дифференциального диагноза в нашем стационаре 5 человек были исключены из исследования (17 % всех пациентов) с диагнозами гипопаратиреоз ($n=1$), шизофрения ($n=1$), васкулиты ЦНС ($n=2$) и нейродегенеративное заболевание ($n=1$), что соответствует описанному спектру патологии, с которыми надо дифференцировать АЭ [295]. При анализе первичного направительного диагноза только 41 % пациентов имели диагноз возможного энцефалита (соответственно, процент диагностических ошибок составил 59 %), 29 % составляли пациенты с фармакорезистентной эпилепсией неуточненной этиологии, 12,5 % — демиелинизирующего заболевания ЦНС и столько же пациентов с цереброваскулярной патологией, и у одной пациентки предполагалось соматоформное расстройство (4 %). Схожие результаты получены в рамках наблюдения за когортой из 50 АЭ из нескольких университетских клиник Германии и Австрии [296]. В процитированном исследовании дополнительно к классическому синдромокомплексу проявления АЭ также выявлялась атаксия, диагноз возможного АЭ был выставлен 32,0% пациентов, причем у большей части предполагался инфекционный энцефалит. Изначально пациенты обращались не только к неврологам, но и к психиатрам — 21 % (34 %, согласно исследованию Baumgartner A.) , инфекционистам — 8 %, и 42 % пациентов наблюдались неврологами-эпилептологами.

Ведущими в симптомокомплексе АЭ были эпилептические приступы (54 %) и когнитивное снижение (67 %), тогда как согласно исследованию, приведенному выше — эпилептические приступы и психические нарушения, тогда как когнитивное снижение наблюдалось только у 14 % пациентов. Разницы по ведущим проявлениям (эпилептические

приступы и когнитивные нарушения) между АЭ с известным антителом и антителнегативными АЭ выявлено не было.

Разницы по ведущим проявлениям (эпилептические приступы и когнитивные нарушения) между АЭ с известным антителом и антителнегативными АЭ выявлено не было. В целом, данные результаты соответствуют данным литературы о том, что когнитивные нарушения являются ведущими в синдромокомплексе АЭ и включены в критерии диагноза [20], а также высокую эпилептогенность данной патологии в острой фазе течения заболевания [297]. Результаты анализа первичных диагнозов и обращений к различным специалистам выявляет необходимость настороженности к АЭ среди неврологов-эпилептологов, неврологов, занимающихся демиелинизирующими заболеваниями, инфекционистов и психиатров. Однако более высокий процент пациентов с эпилептическими приступами и низкий — с психическими нарушениями может быть также обусловлен спецификой работы стационара, в котором проводилось исследование: оказание экстренной помощи пациентам (в том числе госпитализация пациентов с эпилептическими приступами) и отсутствием в структуре стационара психосоматического отделения.

Далее группа АЭ была охарактеризована по наличию антител, в ходе обследования были диагностированы 2 NMDAR-энцефалита, 1 CASPR, 2 LGI1, 1 GABA_B, 2 GAD, 1 анти-hu энцефалит, 2 энцефалита с антителами к SSa-SSb, соответственно, 37,5 % пациентов выставлен диагноз АЭ с известными антителами, у 8,3 % АЭ с антителами неизвестного значения, у 54,1 % пациентов был диагностирован вероятный АЭ, антител-негативный. Данные результаты соответствуют ранее полученным данным зарубежных исследователей о 40-50 % возможных АЭ неясной этиологии среди пациентов, диагностируемых на данный момент в различных выборках [266; 267; 298]. На сегодняшний день мы не анализировали ряд известных антител: antiGly, antiMOG, DPPX, IgLON, поэтому полученное нами количество пациентов с АЭ неизвестной этиологии несколько выше, чем в зарубежных исследовательских центрах.

Обращает на себя внимания, что в ходе обследования нашей группы выявлены все возможные типы энцефалитов: АЭ с антителами к поверхностной нейрональной мембране, АЭ с внутриклеточным антигенам, АЭ с антителами к GAD.

Среди антител к поверхностной нейрональной мембране также были выявлены антитела всех типов:

- 1) к рецепторам нейротрансмиттеров (2 NMDAR-рецептор, 1 GABA_BR-энцефалита)
- 2) к трансмембранным белкам (1 CASPR2)
- 3) антитела к секретируемым белкам (2 LGI1)

Мы выявили одного пациента с позитивными антителами к рибосомальному белку Р в группе возможных АЭ, ранее подобные антитела описывались как ассоциированные с

поражением ЦНС при системной красной волчанке, однако на сегодняшний день необходимо исследование на большей популяции с целью определения клинической значимости данных антител у пациентов с АЭ. В группе АЭ были выявлены тип 1-4 олигоклонального синтеза. У всех пациентов с онкологией были выявлены различные положительные типы олигоклонального синтеза (тип 2-4), что статистически отличалось от пациентов без сопутствующей онкологической патологии. Эти данные могут быть использованы для определения стратегии диагностического поиска и проведения более тщательного онкологического скрининга у пациентов с олигоклональной секрецией, что также ранее описывалось у пациентов с паранеопластическими синдромами [299], однако в исследовании Constantinescu при АЭ данная зависимость не была выявлена [174].

В группе пациентов с онкопатологией были выявлены GABA_B и NMDA антитела, что позволило предсказать ответ на терапию и перенаправить пациентов к онкологам (см. описание клинического случая), причем у 2х пациентов неврологические проявления предшествовали выявлению онкопатологии.

37,5 % пациентов были госпитализированы в отделение реанимации и интенсивной терапии за время наблюдения, что соответствует наблюдению за данными пациентами в других центрах [298]. 25 % пациентов погибли в течение первого года наблюдения, что свидетельствует о тяжести АЭ, необходимости своевременного выявления данной патологии и диагностики. В нашей группе пациентов отмечалось большее половины пациентов с эпилептическими приступами (54 %), что согласуется с данными предыдущих исследований о высокой частоте эпилептических приступов и аутоиммунной эпилепсии у пациентов с АЭ [300–302]. При анализе результатов видеоЭЭГ–мониторинга нами не было выявлено паттерна «extreme delta brush», описанного при NMDAR-энцефалитах [303]. У всех пациентов с эпилептическими приступами было выявлено диффузное замедление фоновой ритмики, у 54 % — зарегистрированы эпилептические разряды, у 30 % эпилептические приступы в ходе видеоЭЭГ мониторинга. Отмечает на себя внимание, что при регистрации приступов зона начала приступов у одного и того же пациента была разной локализации, что свидетельствует о поражении нескольких зон ЦНС антителами, не смотря на отсутствие в большинстве случаев в данных регионах изменений по МРТ. Статистическая обработка выявленных изменений не проводилась в виду небольшого числа пациентов и разной антител-позитивностью внутри группы АЭ, однако на сегодняшний день наиболее полно описаны ЭЭГ изменения у пациентов с NMDAR–энцефалитом [304], при АЭ с другими при ЭЭГ описываются неспецифические изменения или их периодическое отсутствие, как при LGI1-энцефалите [305]. Изучаемые клинические маркеры не отличались между этими двумя группами, хотя ранее в работах было показано увеличение маркеров дегенерации у пациентов после эпилептического статуса [174].

Было выявлено более высокий уровень неоптерина у пациентов с АЭ при сравнении с контрольной группой и группой демиелинизирующих заболеваний, что также было выявлено в предшествующих исследованиях [141]. Оценка уровня неоптерина в ЦСЖ широко используется при неврологических проявлениях у пациентов с ВИЧ и детской неврологии в качестве маркера активного воспаления в ЦНС и интратекальной иммунной активации [306]. Неоптерин имеет короткий период жизни, поэтому может быть использован для оценки активности воспаления при сравнении его острого и хронического течения. Возможные пути получения неоптерина представлены на рисунке 18. В нашем исследовании уровень неоптерина выявлен как более чувствительный к воспалению при сравнении с цитозом и может помочь дифференцировать АЭ от других воспалительных заболеваний, однако эти данные должны быть подтверждены на большей когорте пациентов.

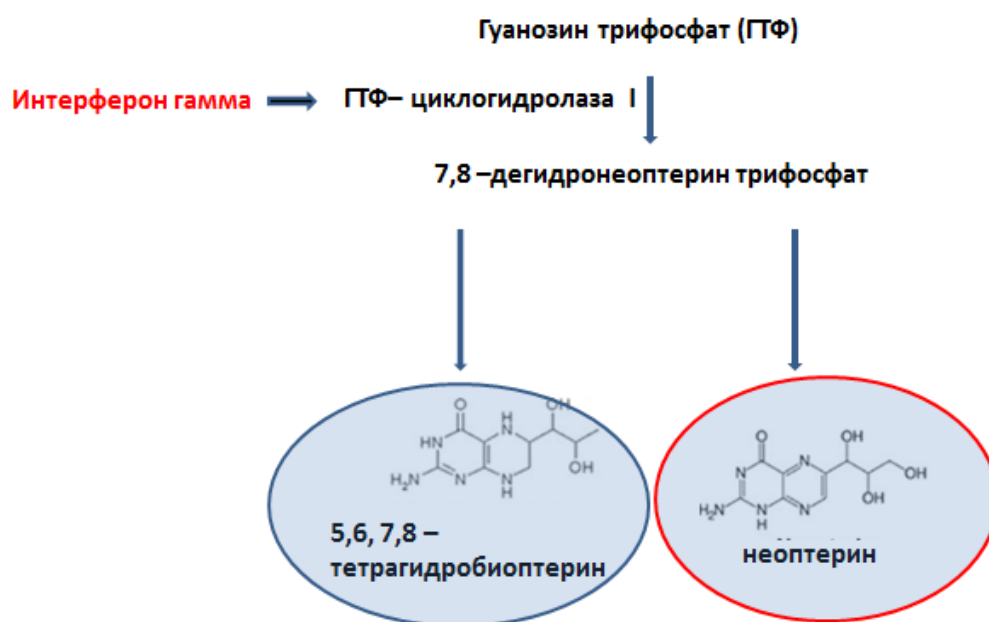


Рисунок 18 — Пути продукции неоптерина в ЦНС

Уровень НФ и белка был выше как у пациентов с РС, так и у пациентов с АЭ, что позволяет предположить активность воспалительных и нейродегенеративных процессов в обеих группах пациентов. Однако более высокий уровень был выявлен у пациентов с АЭ и крайне тяжелым течением заболевания, погибшим в течение года наблюдения. Полученные результаты согласовываются с исследованием Naratunaun et al., 2017 [307], выявившим более высокий уровень белка у пациентов, госпитализированных с АЭ в ОРИТ. Также было показано прогностическое значения уровня белка в работе Balu R. et al, 2019 [308], где уровень белка выше 0,3 г/л был связан с плохим исходом (оценка по модифицированной шкале Рэнкина больше 3), однако в итоговую прогностическую шкалу данный показатель включен не был.

Подобные результаты плохого прогноза и ассоциации высокого уровня белка в ЦСЖ были получены и для других заболеваний, таких как туберкулезный менингит и бактериальный менингит [309; 310]. В ряде других исследований [311] данные результаты не были подтверждены, однако в них использовалась корреляция маркеров ЦСЖ с оценкой по шкале Рэнкин по тяжести исхода, что изменяло градацию тяжести пациентов (и, соответственно, средний уровень показателей) и приводило к попаданию более легких пациентов в группу пациентов с тяжелым исходом.

При анализе взаимосвязи в группе АЭ была выявлена взаимосвязь между уровнем белка и воспалительными показателями (цитоз, неоптерин, Ил-6), точно так же, как была выявлена корреляция цитоза и неоптерина между собой, что подчеркивает значимый и однонаправленный характер данных изменений.

Таким образом, при анализе нашей группы пациентов с АЭ была выявлена высокая смертность у пациентов с АЭ в ходе развития заболевания, как с онкологической, так и без онкологической патологии. У пациентов с тяжелым течением АЭ был выявлен высокий уровень Ил-6, фНФТ и белка. Таким образом, можно говорить об активном течении воспаления и нейродегенерации у пациентов с тяжелым течением АЭ.

4.2. Демиелинизирующие заболевания ЦНС: нейровоспаление и нейродегенерация

Помимо патофизиологических механизмов развития заболевания и определение таргетных мишеней для лечения, одной из наиболее важных проблем является дифференцирование РС на ранней стадии от других аутоиммунных патологий ЦНС и выявления маркеров течения заболевания. При РС до сих пор не выявлено точного антигена и антитела, которые приводят к развитию заболевания, поэтому во многих работах РС описывается как аутоиммунное заболевание ЦНС [95], однако часть экспертов предлагает называть его иммуноопосредованным заболеванием, в виду того, что полностью критерии характерные для истинно аутоиммунных заболеваний для РС на сегодняшний день не выполнены [275]. Однако ведущая роль активации воспаления и иммунной системы в патогенезе РС на сегодняшний день не подлежит сомнению [344].

В группе РС был обнаружен более высокий цитоз, уровень белка фНФТ, рИл-6Р, что подтверждает активность процессов нейровоспаления и нейродегенерации на молекулярном уровне. Возможно, различный уровень рИл-6Р и путей активации Ил-6 приводит к различному сайт-специфическому поражению при разных типах демиелинизирующих заболеваний.

Подобные результаты были получены в более ранних работах [312]. Высокий уровень рИлб-Р может быть связан с вовлечением пути, связанного с данным рецептором при РС, и

другим путем взаимодействия через мембранный рецептор при ОМ и ОРЭМ. Однако, в литературе существуют разные данные по поводу уровня рИЛ-6Р при ОМ [313].

В маленькой группе пациентов с сопутствующей системной патологией были продемонстрированы корреляции уровня ИЛ-6 и фНФТ с EDSS, что подтверждает более значимую активацию цитокиновой оси Ил-6 и процессов нейродегенерации у пациентов с сопутствующими системными патологиями [314].

Мы выявили повышение антител к рибосомальному белку Р у пациентки с РС и эпилепсией, и у одной пациентки с АЭ. Данные антитела показали свою значимость у пациентов с нейроволчанкой и нейропсихиатрическими проявлениями [270; 315], однако в наших группах больных требуется изучение значимости данных антител в большей выборке пациентов.

ОРЭМ и ОМ — одни из самых частых дифференциальных диагнозов с РС, и не смотря на сходство, оба заболевания зачастую сопровождаются более тяжелым течением и развитием инвалидности. При ОМ необходимо проводить иммуносупрессивную терапию.

В нашем исследовании мы выявили повышенный уровень ИЛ-6 у пациентов с ОМС и ОРЭМ, как и ранее было описано в работах Uzawa [273] и после термодеструкции рИЛ-6 рецептора и в группе РС. Таким образом, можно предположить, что у пациентов с РС выше уровень рИЛ-6 рецептора, что и было продемонстрировано в первой части работы.

Уровень фНФТ используется как маркер степени нейродегенерации при БАС и может применяться для оценки нейродегенерации при РС согласно ряду исследований [316, 353]. Более информативным с целью оценки уровня нейродегенерации при обострении РС и оценки статуса об отсутствии активности (класс по NEDA) при РС считаются легкие цепи нейрофиламентов, однако их измерение требует использования специально разработанных методик [317, 351]. Отсутствие данного повышения при ОМ при сравнении с другими патологиями объясняется более выраженным поражением астроцитов и глиальных клеток при ОМ, а также преимущественным повышением уровня ГФАП.

ЭПО повсеместно известен как цитокин, ответственный за развитие эритроцитов, продукция которого активируется при гипоксии. Однако у него отмечается множество влияний, не связанных с эритропоэтической функцией [318]. ЭПО считается одним из участников нейропротективной системы ГМ и предполагается его возможная роль в лечении прогрессирующих форм РС и оптического неврита. Было показано, что в определенных концентрациях при парентеральном введении ЭПО-альфа способен проникать через ГЭБ, а рецептор ЭПО экспрессируется в различных отделах ЦНС, включая зрительный нерв и сетчатку [319]. Считается, что ЭПО может обуславливать свой терапевтический эффект за счет уменьшения выраженности окислительных процессов и нитрозативного стресса (уменьшает

выраженность апоптоза за счет активации JAK2 и NF- κ B сигнальных каскадов, которые, в свою очередь, увеличивают экспрессию генов, ингибирующих апоптоз, а также способствуют уменьшению нейровоспаления), способствовать высвобождению нейротрансмиттеров и нормализации кровообращения в пораженном регионе [320]. На модели ЭАЭ было показано, что его введение значительно снижает инфильтрацию мононуклеарными клетками, уменьшает экспрессию главного комплекса гистосовместимости 2 класса, таким образом, защищая аксоны от гибели [321]. Однако работы, изучающие его содержание в ЦСЖ больных с РС практически отсутствуют. Ранее было показано снижение уровня ЭПО у больных боковым амиотрофическим склерозом и ассоциация со скоростью прогрессирования заболевания [322], однако при других нейродегенеративных заболеваниях уровень ЭПО не изменялся [323].

В нашем исследовании было выявлено, что уровень ЭПО был снижен при РС, но не при других заболеваниях. Существуют работы, которые демонстрируют, что уровень ЭПО в ЦСЖ зависит от степени гипоксии, проницаемости ГЭБ, непосредственного синтеза ЭПО в ЦНС и отсутствия его корреляции с сывороточным ЭПО [324], что применительно к нашим результатам вероятнее всего свидетельствует о снижении синтеза ЭПО в ЦНС, что может быть связано с хроническим длительным воспалительным процессом при РС, однако механизмы данного снижения на сегодняшний день точно неизвестны.

При анализе МРТ (атрофические изменения и объем очагов) у пациентов с РС с различными сопутствующими патологиями (эпилепсия, сопутствующие системные заболевания) разницы по выраженности атрофии, типу патологии, объему очагов выявлено не было. При анализе общей группы больных было выявлена взаимосвязь выраженности поражения при МРТ и уровнем Ил-6, и обратная взаимосвязь с уровнем ЭПО, что показывает вовлеченность цитокиновой оси в выраженности поражения ЦНС при РС.

4.3. Активность системы NO при РС

В данной работе был изучен уровень метаболитов NO (RSNO, NOx и НТБ) на ранней и прогрессирующей стадии РС и проведена их оценка как возможных биомаркеров поражения СМ [345, 352]. В целом, нами были подтверждены данные предыдущих исследований [240; 274; 325] и показали повышенную активность системы оксида азота у пациентов с РС обеих стадиях. Кроме того был показан повышенный уровень RSNO у пациентов с РС и поражением спинного мозга.

Физиологические корреляции для RSNO: выявлено снижение уровня RSNO с возрастом у здоровых добровольцев и пациентов с РС. Данное снижение уровня может быть объяснено тем, что главный источник RSNO –eNOS теряет свою активность с возрастом. Однако, несмотря на то, что данная взаимосвязь физиологична, мы не нашли исследований,

описывающих корреляции между уровнем RSNO и возрастом. Возможно, уровень RSNO может быть использован как дополнительный маркер эндотелиальной дисфункции при сосудистых заболеваниях. Общеизвестно, что возраст является фактором риска развития атеросклероза, число исследований по данной тематике огромно [326]. Даже при отсутствии сопутствующих факторов риска в сосудистой стенке изменяется фенотип эндотелия и начинают развиваться атеросклеротические процессы.

У мужчин в группе РС было выявлено повышение RSNO, что может быть объяснено более низким уровнем активности eNOS у женщин при сравнении с мужчинами того же возраста [182], а также связью между специфичностью ферментативных систем (ADHIII) и полом [185]. С другой стороны, RSNO увеличены у пациентов с очагами в СМ, для которых характерно более тяжелое течение, прогноз и резистентность к терапии [208; 327].

NOx и НТБ уровень: Увеличенный уровень NOx выявлен у пациентов с PPC в стадию обострения, но не у пациентов с ВППС. Для НТБ не было найдено корреляции с клиническими показателями. Эти данные согласуются с данными предыдущих исследований [211; 221]. Данная разница вероятнее всего связана со специфическими условиями образования ЗНТ в ходе активации преимущественно iNOS в острой фазе РС [186]. В нашем исследовании уровень RSNO не коррелировал с уровнем NOx, что соответствует данным, полученным на модели ЛПС-вызванного энцефаломиелита Liu и соавт. [101, 342].

Уровень RSNO и поражение СМ: уровень RSNO был значимо выше в сыворотке крови пациентов с PPC и ВППС, что соответствует ранее выполненным исследованиям, выявившим более высокий уровень RSNO в ЦСЖ пациентов с РС [214][244]. Кроме того, в крови при РС выявлены аутоантитела к S-нитрозоцистеину в фазе обострения и у 30 % пациентов в фазу ремиссии [242], что косвенно свидетельствует об активации процессов нитрозилирования и реакции иммунной системы на модифицированные белки. Динамика уровня антител наблюдается и в модели ЭАЭ, что также может подтвердить активацию NO-системы при РС.

Более высокий уровень был выявлен у пациентов с поражением СМ, тогда как у пациентов с ОРЭМ и массивным поражением ГМ повышения уровня выявлено не было. Группа пациентов с ОРЭМ была включена в исследование, чтобы исключить взаимосвязь между объемами поражения и повышением уровня нитрозотиолов. В результате была выявлена корреляция в группе с поражением СМ с протяженностью поражения, но не изменение маркеров в группе ОРЭМ. В соответствии с результатами нашего исследования данное повышение происходит за счет белок-связанных нитрозотиольных групп и только частично – за счет низкомолекулярных RSNO.

Выявленное различие по связи повышения уровня RSNO с повреждением СМ крайне интересно, так как оно свидетельствует о специфике процесса образования очагов в СМ или о

разной реакции организма на повреждение. Кроме того, из клинических наблюдений известно, что при спинальных очагах наблюдается более тяжелое течение заболевания. Подобные различия по активности NO-системы выявлялись и ранее: в работе Ljubisavljevic и соавт. [244] показано, что у крыс с ЭАЭ и животных контрольной группы наиболее высокий уровень NOx наблюдается в гомогенатах СМ, но причина такого увеличения неясна: по данным исследований [328; 329] уровень активности NO-синтазы в СМ ниже, чем в головном. Можно было бы предположить, что более высокий уровень RSNO наблюдается за счет опосредованной ИЛ-6 активации iNOS, различной для головного и спинного мозга, как показано у пациентов с поперечным миелитом Karlin и соавт. [330], по мнению которых именно ИЛ-6 опосредует специфическое повреждение спинного мозга в поперечном миелите через активацию iNOS. Однако в нашем исследовании ассоциация между уровнем Ил-6 и RSNO не была подтверждена.

Кроме того, подобное различие по уровню RSNO можно еще объяснить несколькими причинами. Первая из них — гетерогенность ферментативных систем ГМ и СМ. Уровень низкомолекулярных RSNO при низкой активности ферментов, разрушающих RSNO (глутатионпероксидаза, гамма-глутамилтранспептидаза, глутатион-S-трансфераза и независимые от GSHTrx, АДН III, дисульфид-изомераза). Если активность и изоформы этих ферментов в ГМ и СМ различны, то может наблюдаться повышение RSNO только при повреждении СМ. Есть данные о гетерогенности ферментов при БАС: снижение активности глутатион-S-трансферазы отмечено только при шейно-грудной форме БАС, тогда как активность глутатион пероксидазы снижается при шейно-грудной, бульбарной и первично-генерализованной формах [230]. У мышей для различных клеток ЦНС специфична определенная форма глутатион-S-трансферазы: в астроцитах и нейронах экспрессируется μ -форма, тогда как в олигодендроцитах — ρ – форма. В мозге человека также найдены α , μ и ρ – формы (преимущественной изоформой является ρ), и они также распределены гетерогенно. У больных БАС наблюдалось снижение уровня ρ – изоформы в спинном мозге и моторной коре, тогда как в сенсорной области снижении экспрессии по сравнению с контролем выявлено не было [331]. Взаимосвязь уровня RSNO и гетерогенности ферментативных систем представляет значительный интерес, но вместе с тем трудна для анализа, так как ферментов много и данные об их активации/инактивации противоречивы. Показано увеличение активности глутатионредуктазы в ЦСЖ, тогда как активность глутатион пероксидазы и трансферазы не отличалась от контроля [230], или была ниже, чем в контрольной группе [231]. Таким образом, наблюдается разнонаправленное действие на концентрацию RSNO, тогда как в крови активность ферментов по сравнению с контролем не изменялась [214]. При РС показано увеличение экспрессии Trx и снижение экспрессии TrxR1 методом вестерн блоттинга в лимфоцитах периферической крови [234].

С другой стороны, показано, что активность ферментов, уровень аскорбата и металлов переходной валентности влияет только на стабильность низкомолекулярных тиолов, когда как для общей системы RSNO — нитрозилированные белки имеет значение только реакция транснаитрозилирования [274]. При активации системы NO происходит увеличение уровня GSNO, который обеспечивает нитрозилирование белков, денитрозилирование которых преимущественно зависит от уровня глутатиона. Таким образом, основной эффект нитрозилирования наблюдается на уровне белков. Показано, что даже при высоких концентрациях GSNO возможно нитрозилирование лишь небольшого количества белков (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа, креатинкиназа, гексокиназа-I, гликоген фосфорилаза, NMDA – рецепторы, $\alpha 1$ и $\alpha 2$ субъединицы Na^+/K^+ АТФазы, тяжелые цепи нейрофиламентов, α - и β -тубулин, β - и γ -актин). Их основное количество накапливается в митохондриях и богатых митохондриями клеточных компартаментах (синаптических терминалях).

Второй причиной увеличения уровня RSNO только при поражении спинного мозга может быть территориальное различие гисто-гематического барьера. Барьер между кровью и спинным мозгом отличается по строению и проницаемости от барьера кровь – головной мозг: различна проницаемость для меток и цитокинов, снижен уровень транспортного белка р-гликопротеина, изменена экспрессия белков плотных контактов окклюдина и ZO-1, молекул адгезии VE-кадгерина и β -катенина [332]. Показано, что проницаемость к интерферону-гамма, фактора некроза опухоли- α различается в шейном, грудном, поясничном отделах спинного и головного мозга в модели ЭАЭ [333], выявлено положительное влияние инсулиноподобного фактора роста, снижающего проницаемость барьера кровь-спинной мозг, на течение РС [334]. Для изучения связи уровня RSNO с различной проницаемостью ГЭБ по отделам ЦНС необходимы дальнейшие исследования.

Третьей причиной может быть повреждение глии, более выраженное в спинном мозге. В глиальных клетках концентрация GSH крайне высока (около 8 мМ), поэтому GSNO, образовавшийся в ходе активации NO-системы, при повреждении глии выбрасывается наружу и поступает в биологические жидкости — ликвор и кровь.

На основании полученных результатов мы не можем сделать вывод о том, патологическим или адаптивным является увеличение RSNO. Несмотря на существующие данные о токсическом действии NO, его роль в процессах ремиелинизации и передаче сигнала также очевидна. Поэтому в связи с данными о протективном действии RSNO при парентеральном введении при черепно-мозговой травме (ЧМТ) [335], уменьшении тяжести течения ЭАЭ при введении GSNO [102], можно сделать предположение, что увеличение уровня RSNO — защитная реакция от непосредственного повреждения пероксинитритом за счет связывания избыточных количеств NO SH-группой тиоловых соединений. Подобная гипотеза

находится в соответствии с данными литературы о двойной роли NO: токсическое действие опосредовано пероксинитритом, тогда как NO сам по себе препятствует повреждению [209], — и подтверждается отсутствием повышения уровня нитрованных белков (основного маркера действия пероксинитрита). На модели ЧМТ у животных было показано, что GSNO не только уменьшает повреждение, но и способствует восстановлению путем увеличения экспрессии нейротрофических факторов [336]. При внутривенном введении GSNO животным с ЧМТ происходит увеличение экспрессии BDNF, TrkB, синаптофизина. Показано восстановление миелина и аксонов, но, более того, увеличение уровня синаптофизина свидетельствует об активации синаптогенеза. Нитрозилирование Nfkb приводит к снижению экспрессии молекул адгезии и матриксных металлопротеаз, нитрозилирование eNOS приводит к снижению активности, нитрозилирование NMDA-рецепторов — к уменьшению процессов эксайтотоксичности и снижению активности nNOS. Таким образом, RSNO могут препятствовать развитию патологических процессов за счет снижения экспрессии ядерного фактора каппа-b, молекул адгезии, цитокинов и iNOS/nNOS [250], ингибирования активности каспазы -3, увеличения уровня глутатиона и уменьшения уровня пероксинитрита, а также снижения проницаемости ГЭБ.

Таким образом, в связи с увеличением в крови NOx и RSNO можно говорить об активации NO-системы при РС на всех стадиях заболевания, причем более выраженная активация наряду с увеличением проницаемости ГЭБ наблюдается в фазе обострения. С учетом клинических данных можно говорить о том, что чем длительнее и массивнее протекает заболевание, тем больше активируется система NO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование процессов нейровоспаления и нейродегенерации как потенциальных ключевых механизмов патогенеза аутоиммунных заболеваний ЦНС.

Нами впервые в российской популяции охарактеризована когорта пациентов с АЭ, описаны трудности диагностики, и необходимости проведения дополнительных исследований ЦСЖ – анализ на олигоклональные и антинейрональные антитела, что позволяет более точно диагностировать характер и тип аутоиммунной патологии, предсказать ответ на терапию и клиническое течение. Активность воспалительных процессов и процессов нейродегенерации при АЭ сравнима с таковой при обострении РС, однако отмечено значимое повышение неоптерина, который может считаться дополнительным воспалительным маркером при АЭ. Показана большая выраженность процессов воспаления и нейродегенерации у пациентов с тяжелым течением АЭ (по уровню фНФТ, белка, Ил-6), что может быть использовано при оценке клинического прогноза и выбора агрессивности терапии.

Процессы нейровоспаления характерны для всех изученных заболеваний, однако пути Ил-6 опосредованной активации специфичны в зависимости от патологии. Сайт-специфический характер активации оси Ил-6 при различных аутоиммунных заболеваниях ЦНС может служить причиной гетерогенности и тяжести поражения. Не подтверждена гипотеза об Ил-6 опосредованной активации системы NO при локализации очагов в СМ, несмотря на то, что на всех стадиях РС наблюдается активация нитрергической системы, паттерн которой зависит от стадии течения заболевания и локализации поражения. Усиление процессов нитрозилирования ассоциировано с наличием очагов в СМ.

Нейродегенеративный процесс характерен для РРС, ОРЭМ и АЭ; происходит гибель аксонов с высвобождением структурных компонентов цитоскелета, ее выраженность взаимосвязана с тяжелым течением заболевания.

Выявлены показатели, которые могут служить маркерами при дифференциальной диагностике аутоиммунных заболеваний ЦНС и предикторами их течения. Неоптерин может быть использован для дифференциальной диагностики АЭ, уровень белка в ЦСЖ — для прогноза течения АЭ, а RSNO — для поражения СМ. Ил-6 и фНФТ могут быть использованы в качестве вероятных прогностических маркеров течения АЭ и должны быть оценены на больших популяциях.

ВЫВОДЫ

1. Аутоиммунные энцефалиты — гетерогенная группа заболеваний, проявляющаяся сочетанием преимущественно когнитивных, психических нарушений и эпилептических приступов. Аутоиммунный энцефалит со специфическими антинейрональными антителами встречается у 37,5 % пациентов (среди них преобладают аутоиммунные энцефалиты с антителами к поверхностными нейрональным антигенам — 67 %). Наличие очаговых изменений при МРТ наблюдается в 58 % случаев. В 21 % случаев аутоиммунный энцефалит является паранеопластическим. Частота ошибочных диагнозов при аутоиммунных энцефалитах достигает 59 %.

2. Аутоиммунный энцефалит характеризуется тяжелым течением со смертностью 25 % в течение 1 года наблюдения. Группа пациентов со специфическими антителами не отличается от группы антитело-негативных пациентов по клинической картине заболевания. Повышение уровня общего белка ликвора является прогностически неблагоприятным маркером течения аутоиммунного энцефалита. Олигоклональный синтез иммуноглобулинов G ассоциирован с паранеопластическим генезом энцефалита.

3. При аутоиммунном энцефалите отмечается активация процессов воспаления и нейродегенерации, сравнимая с таковой при обострении рассеянного склероза. Однако уровень неоптерина значимо повышен и является маркером воспаления при аутоиммунном энцефалите. Повышение уровня фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов, уровня белка, интерлейкина-6 регистрируется в ликворе пациентов с тяжелым течением аутоиммунного энцефалита.

4. Изменение уровня интерлейкина-6 регистрируется при всех изученных заболеваниях центральной нервной системы, причем для рассеянного склероза характерно повышенное содержание растворимого рецептора интерлейкина-6, что свидетельствует о различных путях активации системы интерлейкина-6.

5. При ремиттирующем рассеянном склерозе, остром рассеянном энцефаломиелите и аутоиммунных энцефалитах (но не при оптикомиелите Девика) нейродегенерация связана с гибелью аксонов и высвобождением структурных компонентов цитоскелета (фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов).

6. Изменения системы оксида азота зависят от стадии рассеянного склероза (повышение уровня нитратов/нитритов и нитрозотиолов у пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом при обострении; повышение нитрозотиолов при вторично-прогрессирующем рассеянном склерозе). Повышенный уровень нитрозотиолов наблюдается при длительном

течении заболевания и при поражении спинного мозга. Диагностическая ценность этого маркера оценена как «хорошая».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано внедрение в практическую работу определения анализа антител к поверхностным и внутриклеточным антинейрональным антигенам с целью постановки точного диагноза АЭ и определения тактики лечения.

2. Рекомендовано исследовать олигоклональный синтез иммуноглобулинов G при АЭ, что позволяет получить дополнительную информацию о патогенезе аутоиммунного процесса.

3. Рекомендовано использовать неоптерин в качестве дополнительного маркера дифференциального диагноза между АЭ и другими аутоиммунными заболеваниями ЦНС.

4. Рекомендована оценка уровня белка, фНФТ и Ил-6 в ЦСЖ пациентов с АЭ в качестве маркеров тяжести течения болезни и выбора более агрессивной тактики лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЭ — аутоиммунный энцефалит
ВПРС — вторично-прогрессирующее течение рассеянного склероза
ГЭБ — гематозэнцефалический барьер
ЗНТ — 3-нитро-L-тирозина
Ил-6 — интерлейкин 6
ИФА — иммуноферментный анализ
КИС — клинически изолированный синдром
МАГ — миелин-ассоциированный гликопротеин
МОГ — миелин-олигодендроцитарный гликопротеин
МРТ — магниторезонансная томография
НТБ — нитрованные по тирозину белки
НТБСА — нитрованный бычий сывороточной альбумин
ОБМ — основной белок миелина
ОМ — оптикомиелит Девика
ОРЭМ — острый рассеянный энцефаломиелит
ПЛП — протеолипидный протеин
ППРС — первично-прогрессирующий рассеянный склероз
РС — рассеянный склероз
РРС — ремиттирующее течение рассеянного склероза
рИл-6Р — растворимый рецептор интерлейкина 6
СМ — спинной мозг
ЭАЭ — экспериментальный аллергический энцефаломиелит
ЭПО — эритропоэтин
фНФТ — фосфорилированные тяжелые цепи нейрофиламентов
ЦНС — центральная нервная система
ЦСЖ — цереброспинальная жидкость
ЭЭГ — энцефалография
ADH III — алкогольдегидрогеназа III
ANOVA — дисперсионный анализ
AMPA — α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
AQP4 — аквапорин-4
CASP2R — рецептор контактин-ассоциированного белка 2
DAF2 — флуоресцентный зонд 4,5-диаминофлуоресцеина

D2R — дофамин 2 -рецептор
DPPX — дипептидил-аминопептидазоподобный белок-6
EDSS — расширенная шкала инвалидизации Куртцке
eNOS — эндотелиальная синтаза оксида азота
GABA_bR — рецептор гаммааминомасляной кислоты типа b
GAD65 — глутаматдекарбоксилаза 65
Gly — глицин
GSNO — S-нитрозоглутатион
IFN- γ — интерферон- гамма
IgG — иммуноглобулин G
IgM — иммуноглобулин M
iNOS — индуцибельная синтаза оксида азота
LGI1 — белок гена, богатого лейцином и инактивированного в глиоме, 1
NADH — никотинамидадениндинуклеотид
NADPH — никотинамидадениндинуклеотид фосфат
NMDA — N-метил-D-аспартат
NMDAR — рецептор N-метил-D-аспартата
nNOS — нейрональная синтаза оксида азота
NO — оксид азота
NO_x — нитраты/нитриты
NO_x — суммарный уровень нитратов и нитритов
RSNO — нитрозотиолы
Trx — тиоредоксин
TrxR — тиоредоксин редуктаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Функции микроглии в здоровом мозге: фокус на нейропластичность / А.О. Тишкина et al. // Успехи физиологических наук. – 2014. – Т. 45. – Функции микроглии в здоровом мозге. – № 4. – С. 3–18.
2. Пирадов М.А. Аутоиммунные заболевания нервной системы: состояние проблемы и перспективы / М.А. Пирадов, Н.А. Супонева // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70. – № 2. – С. 183-187.
3. Hermetter C. Systematic review: syndromes, early diagnosis, and treatment in autoimmune encephalitis / C. Hermetter, F. Fazekas, S. Hochmeister // Frontiers in neurology. – 2018. – Vol. 9. – P. 706.
4. Cotsapas C. Multiple sclerosis / C. Cotsapas, M. Mitrovic, D. Hafler // Handbook of Clinical Neurology. – Elsevier, 2018. – Vol. 148. – P. 723-730.
5. Filippi M. Let's rehabilitate cognitive rehabilitation in multiple sclerosis / M. Filippi, M.A. Rocca // Neurology. – 2013. – Vol. 81. – № 24. – P. 2060-2061.
6. Нейродегенеративный процесс при рассеянном склерозе и возможный нейропротективный эффект терапии-интерфероном 1a (авонекс) / М.В. Давыдовская и др. // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2012. – Т. 112. – № 7. – С. 36–41.
7. Peruzzotti-Jametti L. Targeting Mitochondrial Metabolism in Neuroinflammation: Towards a Therapy for Progressive Multiple Sclerosis / L. Peruzzotti-Jametti, S. Pluchino // Trends in Molecular Medicine. – 2018. – Vol. 24. – Targeting Mitochondrial Metabolism in Neuroinflammation. – № 10. – P. 838-855.
8. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis / F. Chu et al. // Journal of Neuroimmunology. – 2018. – Vol. 318. – P. 1-7.
9. Cai L. Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis: a meta-analysis study / L. Cai, J. Huang // Neuropsychiatric Disease and Treatment. – 2018. – Vol. 14. – Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis. – P. 2241-2254.
10. Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome / V. Sladkova et al. // Neurological Research. – 2011. – Vol. 33. – № 4. – P. 415-420.
11. Louapre C. Conventional and advanced MRI in multiple sclerosis / C. Louapre // Revue Neurologique. – 2018. – Vol. 174. – № 6. – P. 391-397.
12. Рассеянный склероз: вопросы диагностики и лечения / М.Н. Захарова и др. – Медиа Менте Москва, 2018. – 240 с.

13. Classification and diagnostic criteria for demyelinating diseases of the central nervous system: Where do we stand today? / G. Mathey et al. // *Revue Neurologique*. – 2018. – Vol. 174. – Classification and diagnostic criteria for demyelinating diseases of the central nervous system. – № 6. – P. 378-390.
14. Kawachi I. Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica / I. Kawachi, H. Lassmann // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. – 2017. – Vol. 88. – № 2. – P. 137-145.
15. Аутоиммунные энцефалиты / М.В. Давыдовская и др. // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 2015. – Т. 115. – № 4. – С. 95–101.
16. Аутоиммунный энцефалит с антителами к NMDA-рецепторам / Е.Е. Васенина и др. // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 2017. – Т. 117. – № 2. – С. 110–116.
17. Лимбический энцефалит. Обзор литературы и клинические наблюдения / Г.Г. Торопина и др. // *Неврологический журнал*. – 2013. – Т. 18. – № 3. – С. 11–21.
18. Лимбический энцефалит: клинико-лабораторная гетерогенность / Н.А. Шнайдер и др. // *Якутский медицинский журнал*. – 2015. – № 1. – С. 60–64.
19. Поражение периферических нервов паранеопластического и токсического генеза у пациентов, страдающих раком молочной железы и мелкоклеточным раком легкого / Е.С. Королева и др. // *Неврологический журнал*. – 2013. – Т. 18. – № 6. – С. 27–32.
20. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis / F. Graus et al. // *The Lancet Neurology*. – 2016. – Vol. 15. – № 4. – P. 391-404.
21. Chronic combined stress induces selective and long-lasting inflammatory response evoked by changes in corticosterone accumulation and signaling in rat hippocampus / A. Piskunov et al. // *Metabolic Brain Disease*. – 2016. – Vol. 31. – № 2. – P. 445-454.
22. Voet S. Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology / S. Voet, M. Prinz, G. van Loo // *Trends in Molecular Medicine*. – 2018.
23. Sommer A. The Trojan horse - neuroinflammatory impact of T cells in neurodegenerative diseases / A. Sommer, B. Winner, I. Prots // *Molecular Neurodegeneration*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. 78.
24. Piskunov A.K. Neuroinflammation biomarkers / A.K. Piskunov // *Neurochemical Journal*. – 2010. – Vol. 4. – № 1. – P. 55-63.
25. Bourgoignon J.-M. The metabolome identity: basis for discovery of biomarkers in neurodegeneration / J.-M. Bourgoignon, J.R. Steinert // *Neural Regeneration Research*. – 2019. – Vol. 14. – The metabolome identity. – № 3. – P. 387-390.
26. Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma / R. Vitaliani et al. // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 2005. – Vol. 58. – № 4. – P. 594–604.

27. Leypoldt F. Autoimmune encephalopathies / F. Leypoldt, T. Armangue, J. Dalmau // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 1338. – № 1. – P. 94–114.
28. Herken J. Red flags: clinical signs for identifying autoimmune encephalitis in psychiatric patients / J. Herken, H. Prüss // *Frontiers in psychiatry*. – 2017. – Vol. 8. – Red flags. – P. 25.
29. Post-malaria neurological syndrome: Imported case series and literature review to unscramble the auto-immune hypothesis / A. Poulet et al. // *Travel Medicine and Infectious Disease*. – 2018. – Post-malaria neurological syndrome.
30. Fukata M. Neurobiology of autoimmune encephalitis / M. Fukata, N. Yokoi, Y. Fukata // *Current opinion in neurobiology*. – 2018. – Vol. 48. – P. 1–8.
31. Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity / R.C. Dale et al. // *Brain*. – 2004. – Vol. 127. – Encephalitis lethargica syndrome. – № 1. – P. 21–33.
32. Anti-basal ganglia antibodies in acute and persistent Sydenham's chorea / A.J. Church et al. // *Neurology*. – 2002. – Vol. 59. – № 2. – P. 227–231.
33. Baizabal-Carvallo J.F. Autoimmune and paraneoplastic movement disorders: an update / J.F. Baizabal-Carvallo, J. Jankovic // *Journal of the neurological sciences*. – 2018. – Vol. 385. – Autoimmune and paraneoplastic movement disorders. – P. 175–184.
34. Jellinek E.H. Hashimoto's disease and encephalopathy / E.H. Jellinek, K. Ball // *The Lancet*. – 1966. – Vol. 288. – № 7462. – P. 512–514.
35. Limbic encephalitis associated with anti-NH₂-terminal of α -enolase antibodies: A clinical subtype of Hashimoto encephalopathy / T. Kishitani et al. // *Medicine*. – 2017. – Vol. 96. – № 10. – P.e6181.
36. Hashimoto's encephalopathy: A rare proteiform disorder / G. Montagna et al. // *Autoimmunity reviews*. – 2016. – Vol. 15. – Hashimoto's encephalopathy. – № 5. – P. 466–476.
37. Hashimoto encephalopathy: a rare intricate syndrome / J. Payer et al. // *International journal of endocrinology and metabolism*. – 2012. – Vol. 10. – Hashimoto encephalopathy. – № 2. – P. 506.
38. Proteomic analysis of human brain identifies α -enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy / H. Ochi et al. // *FEBS letters*. – 2002. – Vol. 528. – № 1-3. – P. 197–202.
39. High prevalence of serum autoantibodies against the amino terminal of α -enolase in Hashimoto's encephalopathy / M. Yoneda et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 2007. – Vol. 185. – № 1-2. – P. 195–200.
40. Schulz P. "Hirnsymptome bei Carcinomatose"—Hermann Oppenheim and an Early Description of a Paraneoplastic Neurological Syndrome / P. Schulz, H. Prüss // *Journal of the History of the Neurosciences*. – 2015. – Vol. 24. – № 4. – P. 371–377.
41. Denny-Brown D. Primary sensory neuropathy with muscular changes associated with carcinoma / D. Denny-Brown // *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. – 1948. – Vol. 11. – № 2. – P. 73.

42. Guichard M.M. The metastatic cancerous polyradiculoneuropathy / M.M. Guichard, G. Vignon // *Le J Medecine de Lyon*. – 1949. – P. 197–207.
43. Subacute encephalitis of later adult life. Mainly affecting the limbic areas / J.B. Brierley et al. // *Brain*. – 1960. – Vol. 83. – № 3. – P. 357–368.
44. Corsellis J.A.N. “Limbic encephalitis” and its association with carcinoma / J.A.N. Corsellis, G.J. Goldberg, A.R. Norton // *Brain*. – 1968. – Vol. 91. – № 3. – P. 481–496.
45. Russell D.S. Encephalomyelitis and carcinomatous neuropathy / D.S. Russell // *The encephalitides*. Amsterdam: Elsevier. – 1961. – Vol. 13. – P. 1–5.
46. Autoimmune response of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration to a Purkinje cell cytoplasmic protein antigen / K.A. Jaeckle et al. // *Annals of neurology*. – 1985. – Vol. 18. – № 5. – P. 592–600.
47. Graus F. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer / F. Graus, C. Cordon-Cardo, J.B. Posner // *Neurology*. – 1985. – Vol. 35. – № 4. – P. 538–538.
48. Sensory neuronopathy and small cell lung cancer: antineuronal antibody that also reacts with the tumor / F. Graus et al. // *The American journal of medicine*. – 1986. – Vol. 80. – Sensory neuronopathy and small cell lung cancer. – № 1. – P. 45–52.
49. Greenlee J.E. Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma / J.E. Greenlee, H.R. Brashear // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 1983. – Vol. 14. – № 6. – P. 609–613.
50. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer / F.A. Luque et al. // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 1991. – Vol. 29. – Anti-Ri. – № 3. – P. 241–251.
51. Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer / F. Folli et al. // *New England Journal of Medicine*. – 1993. – Vol. 328. – № 8. – P. 546–551.
52. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. / J. Honnorat et al. // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 1996. – Vol. 61. – № 3. – P. 270–278.
53. Neuronal Surface and Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibodies in Nonparaneoplastic Stiff Person Syndrome / T. Chang et al. // *JAMA Neurology*. – 2013. – Vol. 70. – № 9. – P. 1140.
54. Спектр неврологических синдромов, ассоциированных с антителами к глутаматдекарбоксилазе / М.Ю. Краснов и др. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2015. – Т. 9. – № 4. – С. 37–41.

55. A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients with testicular cancer / R. Voltz et al. // *New England Journal of Medicine*. – 1999. – Vol. 340. – № 23. – P. 1788–1795.
56. Antoine J.C. Anticorps anti-neuronaux et affections du système nerveux central: apport diagnostique et intérêt physiopathologique / J.C. Antoine, J. Honnorat // *Revue neurologique*. – 2000. – Vol. 156. – Anticorps anti-neuronaux et affections du système nerveux central. – № 1. – P. 23–33.
57. Antibody repertoire in paraneoplastic cerebellar degeneration and small cell lung cancer / L. Sabater et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 3. – P. e60438.
58. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma / J. Dalmau et al. // *Annals of neurology*. – 2007. – Vol. 61. – № 1. – P. 25–36.
59. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies / J. Dalmau et al. // *The Lancet Neurology*. – 2008. – Vol. 7. – Anti-NMDA-receptor encephalitis. – № 12. – P. 1091–1098.
60. Coyle J.T. NMDA receptor and schizophrenia: a brief history / J.T. Coyle // *Schizophrenia bulletin*. – 2012. – Vol. 38. – NMDA receptor and schizophrenia. – № 5. – P. 920–926.
61. Coyle J.T. Schizophrenia: Basic and clinical / J.T. Coyle // *Neurodegenerative Diseases*. – Springer, 2017. – Schizophrenia. – P. 255–280.
62. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia / S.R. Irani et al. // *Brain*. – 2010. – Vol. 133. – № 9. – P. 2734–2748.
63. Progressive encephalomyelitis, rigidity, and myoclonus: a novel glycine receptor antibody / M. Hutchinson et al. // *Neurology*. – 2008. – Vol. 71. – Progressive encephalomyelitis, rigidity, and myoclonus. – № 16. – P. 1291–1292.
64. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location / M. Lai et al. // *Annals of neurology*. – 2009. – Vol. 65. – № 4. – P. 424–434.
65. Antibodies to the GABAB receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen / E. Lancaster et al. // *The Lancet Neurology*. – 2010. – Vol. 9. – Antibodies to the GABAB receptor in limbic encephalitis with seizures. – № 1. – P. 67–76.
66. Lancaster E. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins / E. Lancaster, E. Martinez-Hernandez, J. Dalmau // *Neurology*. – 2011. – Vol. 77. – № 2. – P. 179–189.
67. Carr I. The Ophelia syndrome: memory loss in Hodgkin's disease / I. Carr // *The Lancet*. – 1982. – Vol. 319. – The Ophelia syndrome. – № 8276. – P. 844–845.
68. Encephalitis and antibodies to dipeptidyl-peptidase-like protein-6, a subunit of Kv4. 2 potassium channels / A. Boronat et al. // *Annals of neurology*. – 2013. – Vol. 73. – № 1. – P. 120–128.

69. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies / M. Petit-Pedrol et al. // *The Lancet Neurology*. – 2014. – Vol. 13. – Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor. – № 3. – P. 276–286.
70. Altered cortical GABAA receptor composition, physiology, and endocytosis in a mouse model of a human genetic absence epilepsy syndrome / C. Zhou et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 29. – P. 21458–21472.
71. A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: a case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study / L. Sabater et al. // *The Lancet. Neurology*. – 2014. – Vol. 13. – A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5. – № 6. – P. 575–586.
72. Antibody-associated CNS syndromes without signs of inflammation in the elderly / D. Escudero et al. // *Neurology*. – 2017. – Vol. 89. – № 14. – P. 1471–1475.
73. Human neurexin-3 α antibodies associate with encephalitis and alter synapse development / N. Gresa-Arribas et al. // *Neurology*. – 2016. – P. 10–1212.
74. Ganesh A. Practice Current: When do you suspect autoimmune encephalitis and what is the role of antibody testing? / A. Ganesh, S.F. Wesley // *Neurology: Clinical Practice*. – 2018. – Vol. 8. – Practice Current. – № 1. – P. 67–73.
75. Antibodies to surface dopamine-2 receptor in autoimmune movement and psychiatric disorders / R.C. Dale et al. // *Brain*. – 2012. – Vol. 135. – № 11. – P. 3453–3468.
76. A long-term depression of AMPA currents in cultured cerebellar Purkinje neurons / D.J. Linden et al. // *Neuron*. – 1991. – Vol. 7. – № 1. – P. 81–89.
77. Identification and characterization of GABAA receptor autoantibodies in autoimmune encephalitis / T. Ohkawa et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 34. – № 24. – P. 8151–8163.
78. Mechanisms underlying cerebellar motor deficits due to mGluR1-autoantibodies / M. Coesmans et al. // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 2003. – Vol. 53. – № 3. – P. 325–336.
79. Van Alphen A.M. The dynamic characteristics of the mouse horizontal vestibulo-ocular and optokinetic response / A.M. Van Alphen, J.S. Stahl, C.I. De Zeeuw // *Brain research*. – 2001. – Vol. 890. – № 2. – P. 296–305.
80. Modelling paraneoplastic CNS disease: T-cells specific for the onconeural antigen PNMA1 mediate autoimmune encephalomyelitis in the rat / H. Pellkofer et al. // *Brain*. – 2004. – Vol. 127. – Modelling paraneoplastic CNS disease. – № 8. – P. 1822–1830.

81. Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin / C. Sommer et al. // *The Lancet*. – 2005. – Vol. 365. – Paraneoplastic stiff-person syndrome. – № 9468. – P. 1406–1411.
82. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis / E.G. Hughes et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30. – № 17. – P. 5866–5875.
83. Behavioral, pharmacological, and immunological abnormalities after streptococcal exposure: a novel rat model of Sydenham chorea and related neuropsychiatric disorders / L. Brimberg et al. // *Neuropsychopharmacology*. – 2012. – Vol. 37. – Behavioral, pharmacological, and immunological abnormalities after streptococcal exposure. – № 9. – P. 2076.
84. Autoantibodies in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease / H. Angus-Leppan et al. // *JAMA neurology*. – 2013. – Vol. 70. – № 7. – P. 919–922.
85. Antibodies to N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in Creutzfeldt–Jakob disease patients / K. Fujita et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 2012. – Vol. 251. – № 1-2. – P. 90–93.
86. Anti-NMDA receptor antibodies in a case of MELAS syndrome / C. Finke et al. // *Journal of neurology*. – 2012. – Vol. 259. – № 3. – P. 582–584.
87. Antibodies to GABAA receptor $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits clinical and serologic characterization / P. Pettingill et al. // *Neurology*. – 2015. – Vol. 84. – № 12. – P. 1233–1241.
88. Seroprevalence of autoantibodies against brain antigens in health and disease / L. Dahm et al. // *Annals of neurology*. – 2014. – Vol. 76. – № 1. – P. 82–94.
89. Immunoglobulin G antibodies to the N-Methyl-D-aspartate receptor are distinct from immunoglobulin A and immunoglobulin M responses / E. Lancaster et al. // *Annals of neurology*. – 2015. – Vol. 77. – № 1. – P. 183–183.
90. Иванова М.В. Роль липидов миелина при рассеянном склерозе / М.В. Иванова, М.Н. Захарова // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2015. – Т. 115. – № 8-2. – С. 58–58.
91. Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis / H. Lassmann // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 3116.
92. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis / M.H. Harirchian et al. // *Multiple sclerosis and related disorders*. – 2018. – Vol. 20. – Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis. – P. 43–47.
93. Cotsapas C. Genome-wide association studies of multiple sclerosis / C. Cotsapas, M. Mitrovic // *Clinical & translational immunology*. – 2018. – Vol. 7. – № 6. – P. e1018.
94. Dobson R. Multiple sclerosis - a review / R. Dobson, G. Giovannoni // *European Journal of Neurology*. – 2019. – Vol. 26. – № 1. – P. 27-40.

95. Завалишин И.А. Аутоиммунные заболевания в неврологии. Клиническое руководство / И.А. Завалишин, М.А. Пирадов, А.Н. Бойко. – Москва: РООИ «Здоровье человека», 2014. – 400 с.
96. Obermayer-Straub P. Hepatitis C and D, retroviruses and autoimmune manifestations / P. Obermayer-Straub, M.P. Manns // *Journal of autoimmunity*. – 2001. – Vol. 16. – № 3. – P. 275–285.
97. Increased prevalence of varicella zoster virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis / R. Mancuso et al. // *Journal of medical virology*. – 2007. – Vol. 79. – № 2. – P. 192–199.
98. Serum and CSF measles antibody levels increase over time in patients with multiple sclerosis or clinically isolated syndrome / C. Ahlgren et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 2012. – Vol. 247. – № 1-2. – P. 70–74.
99. The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature / S. Jarius et al. // *Journal of Neurology*. – 2017. – Vol. 264. – The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis. – № 3. – P. 453-466.
100. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study / O. Andersen et al. // *Journal of neurology*. – 1993. – Vol. 240. – Viral infections trigger multiple sclerosis relapses. – № 7. – P. 417–422.
101. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations / D. Buljevac et al. // *Brain*. – 2002. – Vol. 125. – № 5. – P. 952–960.
102. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis / K.L. Munger et al. // *Jama*. – 2006. – Vol. 296. – № 23. – P. 2832–2838.
103. Simon K.C. Vitamin D and multiple sclerosis: epidemiology, immunology, and genetics / K.C. Simon, K.L. Munger, A. Ascherio // *Current opinion in neurology*. – 2012. – Vol. 25. – Vitamin D and multiple sclerosis. – № 3. – P. 246.
104. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis / E.L. Oleszak et al. // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. – 1998. – Vol. 5. – № 4. – P. 438–445.
105. Harroud A. Mendelian randomization in multiple sclerosis: A causal role for vitamin D and obesity? / A. Harroud, J.B. Richards // *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. – 2018. – Vol. 24. – Mendelian randomization in multiple sclerosis. – № 1. – P. 80-85.
106. Kurtzke J.F. On the evaluation of disability in multiple sclerosis / J.F. Kurtzke // *Neurology*. – 1961. – Vol. 11. – № 8. – P. 686–686.
107. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) / J.F. Kurtzke // *Neurology*. – 1983. – Vol. 33. – Rating neurologic impairment in multiple sclerosis. – № 11. – P. 1444–1444.

108. Early prediction of a benign course of multiple sclerosis on clinical grounds: a systematic review / G. Ramsaransing et al. // *Multiple Sclerosis Journal*. – 2001. – Vol. 7. – Early prediction of a benign course of multiple sclerosis on clinical grounds. – № 5. – P. 345–347.
109. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria / A.J. Thompson et al. // *The Lancet. Neurology*. – 2018. – Vol. 17. – Diagnosis of multiple sclerosis. – № 2. – P. 162-173.
110. McCarthy C. Some recent advances in multiple sclerosis / C. McCarthy, J. Thorpe // *Journal of Neurology*. – 2016. – Vol. 263. – № 9. – P. 1880-1886.
111. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: I. Clinical course and disability / B.G. Weinshenker et al. // *Brain*. – 1989. – Vol. 112. – The natural history of multiple sclerosis. – № 1. – P. 133–146.
112. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function / D. Ontaneda et al. // *Lancet (London, England)*. – 2017. – Vol. 389. – Progressive multiple sclerosis. – № 10076. – P. 1357-1366.
113. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges / M. Rovaris et al. // *The Lancet Neurology*. – 2006. – Vol. 5. – Secondary progressive multiple sclerosis. – № 4. – P. 343–354.
114. Monoclonal Antibodies for Multiple Sclerosis: An Update / J. Graf et al. // *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*. – 2019. – Monoclonal Antibodies for Multiple Sclerosis.
115. Ayrignac X. Atypical inflammatory demyelinating lesions and atypical multiple sclerosis / X. Ayrignac, C. Carra-Dallière, P. Labauge // *Revue Neurologique*. – 2018. – Vol. 174. – № 6. – P. 408-418.
116. Paraplegia related to solitary lesion of the cervicomedullary junction / G. Taieb et al. // *Acta Neurologica Belgica*. – 2017. – Vol. 117. – № 2. – P. 545-546.
117. Acute disseminated encephalomyelitis in children: outcome and prognosis / B. Anlar et al. // *Neuropediatrics*. – 2003. – Vol. 34. – Acute disseminated encephalomyelitis in children. – № 04. – P. 194–199.
118. Leukoencephalopathy induced by levamisole alone for the treatment of recurrent aphthous ulcers / H.M. Liu et al. // *Neurology*. – 2006. – Vol. 67. – № 6. – P. 1065-1067.
119. International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating disorders: revisions to the 2007 definitions / L.B. Krupp et al. // *Multiple Sclerosis Journal*. – 2013. – Vol. 19. – International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating disorders. – № 10. – P. 1261–1267.

120. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges / W.J. Brownlee et al. // *The Lancet*. – 2017. – Vol. 389. – Diagnosis of multiple sclerosis. – № 10076. – P. 1336–1346.
121. Диагностическое значение антител к аквапорину-4 при заболеваниях центральной нервной системы / Т.О. Симанив и др. // *Нейрохимия*. – 2014. – Т. 31. – № 3. – С. 246–246.
122. Diagnosis and management of neuromyelitis optica spectrum disorders - An update / A. Bruscolini et al. // *Autoimmunity Reviews*. – 2018. – Vol. 17. – № 3. – P. 195-200.
123. Diagnosis and Treatment of NMO Spectrum Disorder and MOG-Encephalomyelitis / N. Borisow et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 888.
124. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders / D.M. Wingerchuk et al. // *Neurology*. – 2015. – Vol. 85. – № 2. – P. 177-189.
125. Defining distinct features of anti-MOG antibody associated central nervous system demyelination / M.S. Weber et al. // *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. – 2018. – Vol. 11. – P. 1756286418762083.
126. Regulatory B and T lymphocytes in multiple sclerosis: friends or foes? / G.K. Vasileiadis et al. // *Auto-Immunity Highlights*. – 2018. – Vol. 9. – Regulatory B and T lymphocytes in multiple sclerosis. – № 1. – P. 9.
127. B cell characterization and reactivity analysis in multiple sclerosis / J. Fraussen et al. // *Autoimmunity Reviews*. – 2009. – Vol. 8. – № 8. – P. 654-658.
128. Lazibat I. Multiple Sclerosis: New Aspects of Immunopathogenesis / I. Lazibat, M. Rubinić Majdak, S. Županić // *Acta Clinica Croatica*. – 2018. – Vol. 57. – Multiple Sclerosis. – № 2. – P. 352-361.
129. Early Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis Using a New Oligoclonal Band Test / L.M. Villar et al. // *Archives of Neurology*. – 2005. – Vol. 62. – № 4. – P. 574.
130. Akaishi T. Efficiency of antibody therapy in demyelinating diseases / T. Akaishi, I. Nakashima // *International Immunology*. – 2017. – Vol. 29. – № 7. – P. 327-335.
131. MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing / S. Jarius et al. // *Journal of Neuroinflammation*. – 2018. – Vol. 15. – MOG encephalomyelitis. – № 1. – P. 134.
132. Гусев Е. Рассеянный склероз: от изучения иммунопатогенеза к новым методам лечения / Е. Гусев, А. Бойко // М.: ООО «Губернская медицина». – 2001.
133. The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis / R. Reynolds et al. // *Acta neuropathologica*. – 2011. – Vol. 122. – № 2. – P. 155–170.
134. Sriram S. Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination / S. Sriram // *Journal of neuroimmunology*. – 2011. – Vol. 239. – № 1-2. – P. 13–20.

135. Ghasemi N. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy / N. Ghasemi, S. Razavi, E. Nikzad // *Cell Journal*. – 2017. – Vol. 19. – Multiple Sclerosis. – № 1. – P. 1-10.
136. Measurement of spinal cord area in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis / P.A. Brex et al. // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 2001. – Vol. 70. – № 4. – P. 544–547.
137. Does MR spectroscopy of normal-appearing cervical spinal cord in patients with multiple sclerosis have diagnostic value in assessing disease progression? A prospective comparative analysis / M. a. A. Basha et al. // *Clinical Radiology*. – 2018. – Vol. 73. – Does MR spectroscopy of normal-appearing cervical spinal cord in patients with multiple sclerosis have diagnostic value in assessing disease progression? – № 9. – P. 835.e1-835.e9.
138. The role of optical coherence tomography and infrared oculography in assessing the visual pathway and CNS in multiple sclerosis / D. Coric et al. // *Neurodegenerative Disease Management*. – 2018. – Vol. 8. – № 5. – P. 323-335.
139. Metabolomics reveals distinct, antibody-independent, molecular signatures of MS, AQP4-antibody and MOG-antibody disease / M. Juryńczyk et al. // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2017. – Vol. 5. – № 1. – P. 95.
140. Boziki M. An Update on the Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis / M. Boziki, N. Grigoriadis // *Medicinal Chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))*. – 2018. – Vol. 14. – № 2. – P. 155-169.
141. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review / K. Kothur et al. // *Cytokine*. – 2016. – Vol. 77. – CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders. – P. 227-237.
142. Concentrations of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid predict increased level of brain atrophy in multiple sclerosis / V. Nazarov et al. // *Immunologic Research*. – 2019.
143. CSF β -amyloid predicts prognosis in patients with multiple sclerosis / A.M. Pietroboni et al. // *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. – 2018. – P. 1352458518791709.
144. Teunissen C.E. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis / C.E. Teunissen, C. Dijkstra, C. Polman // *The Lancet. Neurology*. – 2005. – Vol. 4. – № 1. – P. 32-41.
145. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments / S. Ackerley et al. // *The Journal of Cell Biology*. – 2003. – Vol. 161. – № 3. – P. 489-495.
146. Neurofilament levels, disease activity and brain volume during follow-up in multiple sclerosis / I. Håkansson et al. // *Journal of Neuroinflammation*. – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 209.

147. Brain-Specific Cytoskeletal Damage Markers in Cerebrospinal Fluid: Is There a Common Pattern between Amyotrophic Lateral Sclerosis and Primary Progressive Multiple Sclerosis? / A. Abdelhak et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – Brain-Specific Cytoskeletal Damage Markers in Cerebrospinal Fluid. – № 8. – P. 17565-17588.
148. A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS / J. Kuhle et al. // *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. – 2013. – Vol. 19. – № 12. – P. 1597-1603.
149. Lipton H.L. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. / H.L. Lipton // *Infection and immunity*. – 1975. – Vol. 11. – Theiler's virus infection in mice. – № 5. – P. 1147–1155.
150. CSF cytokine and chemokine profiles in acute disseminated encephalomyelitis / T. Ishizu et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 2006. – Vol. 175. – № 1-2. – P. 52–58.
151. Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid and serum of adult patients with acute disseminated encephalomyelitis / D. Franciotta et al. // *Journal of the neurological sciences*. – 2006. – Vol. 247. – № 2. – P. 202–207.
152. ADEM and virus infection / J. Pietiläinen-Nicklén et al. // *Journal of Clinical Virology*. – 2012. – Vol. 53. – № 1. – P. 2–5.
153. Acute disseminated encephalomyelitis: clinical features, HLA DRB1* 1501, HLA DRB1* 1503, HLA DQA1* 0102, HLA DQB1* 0602, and HLA DPA1* 0301 allelic association study / S.V. Alves-Leon et al. // *Arquivos de neuro-psiquiatria*. – 2009. – Vol. 67. – Acute disseminated encephalomyelitis. – № 3A. – P. 643–651.
154. Acute disseminated encephalomyelitis: a follow-up study in Taiwan / C.-H. Lin et al. // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. – 2007. – Vol. 78. – Acute disseminated encephalomyelitis. – № 2. – P. 162-167.
155. Confirmed case of levamisole-associated multifocal inflammatory leukoencephalopathy in a cocaine user / J.R. Vitt et al. // *Journal of Neuroimmunology*. – 2017. – Vol. 305. – P. 128-130.
156. Increased interleukin-6 correlates with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in pediatric monophasic demyelinating diseases and multiple sclerosis / P. Horellou et al. // *Journal of Neuroimmunology*. – 2015. – Vol. 289. – P. 1-7.
157. Ghosh N. Evidence of axonal damage in human acute demyelinating diseases / N. Ghosh, G.C. DeLuca, M.M. Esiri // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2004. – Vol. 222. – № 1-2. – P. 29-34.
158. Increased cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain in pediatric acquired demyelinating syndromes / M.S. Boesen et al. // *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. – 2018. – Vol. 24. – P. 175-183.

159. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica / T. Misu et al. // *Acta neuropathologica*. – 2013. – Vol. 125. – № 6. – P. 815–827.
160. No MRI evidence of cortical lesions in neuromyelitis optica / M. Calabrese et al. // *Neurology*. – 2012. – Vol. 79. – № 16. – P. 1671–1676.
161. Encephalitis is an important clinical component of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody associated demyelination: a single-center cohort study in Shanghai, China / L. Wang et al. // *European Journal of Neurology*. – 2019. – Vol. 26. – Encephalitis is an important clinical component of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody associated demyelination. – № 1. – P. 168-174.
162. Araki M. Blockade of IL-6 signaling in neuromyelitis optica / M. Araki // *Neurochemistry International*. – 2018.
163. Investigational drugs in development to prevent neuromyelitis optica relapses / F. Paul et al. // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 2018. – Vol. 27. – № 3. – P. 265-271.
164. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica / N. Chihara et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – № 9. – P. 3701-3706.
165. Petzold A. The Diagnostic and Prognostic Value of Neurofilament Heavy Chain Levels in Immune-Mediated Optic Neuropathies / A. Petzold, G.T. Plant // *Multiple Sclerosis International*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-5.
166. High CSF neurofilament heavy chain levels in neuromyelitis optica / I. Miyazawa et al. // *Neurology*. – 2007. – Vol. 68. – № 11. – P. 865-867.
167. Astrocytic damage is far more severe than demyelination in NMO a clinical CSF biomarker study / R. Takano et al. // *Neurology*. – 2010. – Vol. 75. – № 3. – P. 208–216.
168. Human autoantibodies to amphiphysin induce defective presynaptic vesicle dynamics and composition / C. Werner et al. // *Brain: A Journal of Neurology*. – 2016. – Vol. 139. – № Pt 2. – P. 365-379.
169. Immunopathology of autoantibody-associated encephalitides: clues for pathogenesis / C.G. Bien et al. // *Brain*. – 2012. – Vol. 135. – Immunopathology of autoantibody-associated encephalitides. – № 5. – P. 1622-1638.
170. Biomarkers of Neurodegeneration in Autoimmune-Mediated Encephalitis / P. Körtvelyessy et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2018. – Vol. 9.
171. A rare concurrence: Antibodies against Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein and N-methyl-d-aspartate receptor in a child / E. Sarigecili et al. // *Multiple sclerosis and related disorders*. – 2019. – Vol. 28. – A rare concurrence. – P. 101–103.

172. Höftberger R. Neuroimmunology: an expanding frontier in autoimmunity / R. Höftberger // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol. 6. – Neuroimmunology. – P. 206.
173. Schultze-Amberger J. LGI-1-positive limbic encephalitis: a clinicopathological study / J. Schultze-Amberger, D. Pehl, W. Stenzel // *Journal of Neurology*. – 2012. – Vol. 259. – LGI-1-positive limbic encephalitis. – № 11. – P. 2478-2480.
174. Cerebrospinal fluid markers of neuronal and glial cell damage to monitor disease activity and predict long-term outcome in patients with autoimmune encephalitis / R. Constantinescu et al. // *European Journal of Neurology*. – 2016. – Vol. 23. – № 4. – P. 796-806.
175. CSF neurofilament light chain is elevated in OMS (decreasing with immunotherapy) and other pediatric neuroinflammatory disorders / M.R. Pranzatelli et al. // *Journal of Neuroimmunology*. – 2014. – Vol. 266. – № 1-2. – P. 75-81.
176. Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy / J.R. Lemke et al. // *Neurology*. – 2016. – Vol. 86. – № 23. – P. 2171–2178.
177. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy (ADLTE): novel structural and single-nucleotide LGI1 mutations in families with predominant visual auras / E. Dazzo et al. // *Epilepsy research*. – 2015. – Vol. 110. – Autosomal dominant lateral temporal epilepsy (ADLTE). – P. 132–138.
178. Knowles R.G. Nitric oxide synthases in mammals. / R.G. Knowles, S. Moncada // *Biochemical Journal*. – 1994. – Vol. 298. – № Pt 2. – P. 249.
179. LPS mediated injury to oligodendrocytes is mediated by the activation of nNOS: relevance to human demyelinating disease / S. Yao et al. // *Nitric Oxide*. – 2010. – Vol. 22. – LPS mediated injury to oligodendrocytes is mediated by the activation of nNOS. – № 3. – P. 197–204.
180. Wu M. Endothelial NOS-deficient mice reveal dual roles for nitric oxide during experimental autoimmune encephalomyelitis / M. Wu, S.E. Tsirka // *Glia*. – 2009. – Vol. 57. – № 11. – P. 1204–1215.
181. Trapp B.D. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis / B.D. Trapp, P.K. Stys // *The Lancet Neurology*. – 2009. – Vol. 8. – № 3. – P. 280–291.
182. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in multiple sclerosis / H. Broholm et al. // *Acta neurologica scandinavica*. – 2004. – Vol. 109. – № 4. – P. 261–269.
183. Sun J. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production / J. Sun, L.J. Druhan, J.L. Zweier // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2010. – Vol. 494. – № 2. – P. 130–137.
184. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis / O. Bagasra et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92. – № 26. – P. 12041–12045.

185. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions / J.S.-H. Liu et al. // *The American journal of pathology*. – 2001. – Vol. 158. – № 6. – P. 2057–2066.
186. Bryan N.S. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples / N.S. Bryan, M.B. Grisham // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 43. – № 5. – P. 645–657.
187. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // *Physiological reviews*. – 2007. – Vol. 87. – № 1. – P. 315–424.
188. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis / A.I. Danilov et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 2003. – Vol. 136. – № 1-2. – P. 112–118.
189. Increased nitric oxide products in CSF in primary progressive MS may reflect brain atrophy / J. Peltola et al. // *Neurology*. – 2001. – Vol. 57. – № 5. – P. 895–896.
190. Raised serum nitrate and nitrite levels in patients with multiple sclerosis / G. Giovannoni et al. // *Journal of the neurological sciences*. – 1997. – Vol. 145. – № 1. – P. 77–81.
191. Nitric oxide metabolites in CSF of patients with MS are related to clinical disease course / A. Svenningsson et al. // *Neurology*. – 1999. – Vol. 53. – № 8. – P. 1880–1880.
192. Ischiropoulos H. Protein tyrosine nitration—an update / H. Ischiropoulos // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2009. – Vol. 484. – № 2. – P. 117–121.
193. Robinson K.M. Triuret: a novel product of peroxynitrite-mediated oxidation of urate / K.M. Robinson, J.T. Morré, J.S. Beckman // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2004. – Vol. 423. – Triuret. – № 1. – P. 213–217.
194. Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts / T.P. Misko et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 25. – P. 15646–15653.
195. The acute and chronic phases of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CR EAE) are ameliorated by the peroxynitrite decomposition catalyst, 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinatoiron (III) chloride,(FeTPPS) / C. Bolton et al. // *European journal of pharmacology*. – 2008. – Vol. 601. – № 1-3. – P. 88–93.
196. Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis / A.H. Cross et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 1998. – Vol. 88. – № 1-2. – P. 45–56.
197. A catalyst of peroxynitrite decomposition inhibits murine experimental autoimmune encephalomyelitis / A.H. Cross et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 2000. – Vol. 107. – № 1. – P. 21–28.
198. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood–CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis / D.C. Hooper et al. // *The FASEB Journal*. – 2000. – Vol. 14. – № 5. – P. 691–698.

199. Therapeutic intervention in experimental allergic encephalomyelitis by administration of uric acid precursors / G.S. Scott et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99. – № 25. – P. 16303–16308.
200. Inactivation of peroxynitrite in multiple sclerosis patients after oral administration of inosine may suggest possible approaches to therapy of the disease / S. Spitsin et al. // *Multiple Sclerosis Journal*. – 2001. – Vol. 7. – № 5. – P. 313–319.
201. Oxidative stress: emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury / G.C. Higgins et al. // *Journal of Alzheimer's disease*. – 2010. – Vol. 20. – Oxidative stress. – № s2. – P. S453–S473.
202. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions / D. Mahad et al. // *Brain*. – 2008. – Vol. 131. – № 7. – P. 1722–1735.
203. Mitochondria and the link between neuroinflammation and neurodegeneration / M. Di Filippo et al. // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2010. – Vol. 20. – № s2. – P. S369–S379.
204. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients / R. Dutta et al. // *Annals of neurology*. – 2006. – Vol. 59. – № 3. – P. 478–489.
205. Inhibiting poly (ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death / S. Veto et al. // *Brain*. – 2010. – Vol. 133. – Inhibiting poly (ADP-ribose) polymerase. – № 3. – P. 822–834.
206. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis / G.R. Campbell et al. // *Annals of neurology*. – 2011. – Vol. 69. – № 3. – P. 481–492.
207. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis / J. Van Horsen et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2011. – Vol. 1812. – № 2. – P. 141–150.
208. Broome T.M. A mathematical model of cell death in multiple sclerosis / T.M. Broome, R.A. Coleman // *Journal of neuroscience methods*. – 2011. – Vol. 201. – № 2. – P. 420–425.
209. Isobe C. Remarkable increase in 3-nitrotyrosine in the cerebrospinal fluid in patients with lacunar stroke / C. Isobe, T. Abe, Y. Terayama // *Brain research*. – 2009. – Vol. 1305. – P. 132–136.
210. Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid / C.E. Teunissen et al. // *Neurobiology of aging*. – 2002. – Vol. 23. – № 4. – P. 485–508.
211. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant / L.I. Bruijn et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – Vol. 94. – № 14. – P. 7606–7611.
212. Cerebrospinal fluid levels of free 3-nitrotyrosine are not elevated in the majority of patients with amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimer's disease / H. Ryberg et al. // *Neurochemistry international*. – 2004. – Vol. 45. – № 1. – P. 57–62.

213. Protein co-expression with axonal injury in multiple sclerosis plaques / M. Diaz-Sanchez et al. // *Acta neuropathologica*. – 2006. – Vol. 111. – № 4. – P. 289–299.
214. Changes in cerebrospinal fluid levels of malondialdehyde and glutathione reductase activity in multiple sclerosis. / V. Calabrese et al. // *International journal of clinical pharmacology research*. – 1994. – Vol. 14. – № 4. – P. 119–123.
215. Activity profile in multiple sclerosis: an integrative approach A preliminary report / M. Zabaleta et al. // *Multiple Sclerosis Journal*. – 2002. – Vol. 8. – Activity profile in multiple sclerosis. – № 4. – P. 343–349.
216. Zabaleta M.E. Serum nitrotyrosine levels in patients with multiple sclerosis: relationship with clinical activity / M.E. Zabaleta, N.E. Bianco, J.B. De Sanctis // *Medical science research*. – 1998. – Vol. 26. – Serum nitrotyrosine levels in patients with multiple sclerosis. – № 6. – P. 407–408.
217. Evidence of nitrosative damage in the brain white matter of patients with multiple sclerosis / O.A. Bizzozero et al. // *Neurochemical research*. – 2005. – Vol. 30. – № 1. – P. 139–149.
218. The determination of S-nitrosothiols in biological samples—Procedures, problems and precautions / E. Bramanti et al. // *Life sciences*. – 2011. – Vol. 88. – № 3-4. – P. 126–129.
219. Redox-sensitivity and site-specificity of S-and N-denitrosation in proteins / F.L. Jourd’heuil et al. // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5. – № 12. – P. e14400.
220. Jourd’heuil D. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide evidence for a free radical mechanism / D. Jourd’heuil, F.L. Jourd’heuil, M. Feelisch // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 18. – P. 15720–15726.
221. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues / N.S. Bryan et al. // *Nature chemical biology*. – 2005. – Vol. 1. – № 5. – P. 290.
222. Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: a comparison among the most widely applied methodologies / D. Giustarini et al. // *Journal of Chromatography B*. – 2007. – Vol. 851. – Detection of S-nitrosothiols in biological fluids. – № 1-2. – P. 124–139.
223. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma / T. Rassaf et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2002. – Vol. 109. – № 9. – P. 1241–1248.
224. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock / L. Liu et al. // *Cell*. – 2004. – Vol. 116. – № 4. – P. 617–628.
225. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment / X. Wang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – № 31. – P. 11477–11482.
226. Chung K.K. Say NO to neurodegeneration: role of S-nitrosylation in neurodegenerative disorders / K.K. Chung // *Neurosignals*. – 2006. – Vol. 15. – Say NO to neurodegeneration. – № 6. – P. 307–313.

227. S-nitrosothiol depletion in amyotrophic lateral sclerosis / C.M. Schonhoff et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 7. – P. 2404–2409.
228. S-nitrosylation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) regulates its kinase activity and dendrite growth during neuronal development / P. Zhang et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30. – № 43. – P. 14366–14370.
229. Jourdeuil D. S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats / D. Jourdeuil, L. Gray, M.B. Grisham // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2000. – Vol. 273. – № 1. – P. 22–26.
230. Захарова М.Н. Боковой амиотрофический склероз и окислительный стресс (клинико-биохимическое исследование) : дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.11 / Захарова Мария Николаевна. – М.: Научный центр неврологии РАМН, 2001. – 257 с.
231. Peripheral oxidative stress in relapsing–remitting multiple sclerosis / I. Tasset et al. // *Clinical biochemistry*. – 2012. – Vol. 45. – № 6. – P. 440–444.
232. Truncated thioredoxin is a mitogenic cytokine for resting human peripheral blood mononuclear cells and is present in human plasma / K. Pekkari et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000.
233. Калинина Е.В. Участие тио-, перокси-и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, А.Н. Саприн // *Успехи биологической химии*. – 2008. – Т. 48. – С. 319–358.
234. Redox regulation of cellular stress response in multiple sclerosis / G. Pennisi et al. // *Biochemical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 82. – № 10. – P. 1490–1499.
235. Jelski W. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases / W. Jelski, M. Szmitkowski // *Clinica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 395. – № 1-2. – P. 1–5.
236. Inducible nitric oxide synthase in T cells regulates T cell death and immune memory / M. Vig et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2004. – Vol. 113. – № 12. – P. 1734–1742.
237. Thymic involution and proliferative T-cell responses in multiple sclerosis / D.A. Duszczyszyn et al. // *Journal of Neuroimmunology*. – 2010. – Vol. 221. – № 1-2. – P. 73-80.
238. Aoyama K. Regulation of neuronal glutathione synthesis / K. Aoyama, M. Watabe, T. Nakaki // *Journal of pharmacological sciences*. – 2008. – Vol. 108. – № 3. – P. 227–238.
239. Distinct role of nitric oxide and peroxynitrite in mediating oligodendrocyte toxicity in culture and in experimental autoimmune encephalomyelitis / S. Li et al. // *Neuroscience*. – 2011. – Vol. 184. – P. 107–119.
240. Romero J.M. Extracellular S-nitrosoglutathione, but not S-nitrosocysteine or N₂O₃, mediates protein S-nitrosation in rat spinal cord slices / J.M. Romero, O.A. Bizzozero // *Journal of neurochemistry*. – 2006. – Vol. 99. – № 4. – P. 1299–1310.

241. S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents / M.A. Retamal et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes. – № 12. – P. 4475–4480.
242. Indirect evidence for nitric oxide involvement in multiple sclerosis by characterization of circulating antibodies directed against conjugated S-nitrosocysteine / A.I. Boullerne et al. // *Journal of neuroimmunology*. – 1995. – Vol. 60. – № 1-2. – P. 117–124.
243. Calabrese M. Cortical lesions in multiple sclerosis / M. Calabrese, M. Filippi, P. Gallo // *Nature Reviews Neurology*. – 2010. – Vol. 6. – № 8. – P. 438.
244. Modulation of nitric oxide synthase by arginase and methylated arginines during the acute phase of experimental multiple sclerosis / S. Ljubisavljevic et al. // *Journal of the neurological sciences*. – 2012. – Vol. 318. – № 1-2. – P. 106–111.
245. Arachidonyl trifluoromethyl ketone ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via blocking peroxynitrite formation in mouse spinal cord white matter / A.C. Vana et al. // *Experimental neurology*. – 2011. – Vol. 231. – № 1. – P. 45–55.
246. Accelerated S-nitrosothiol breakdown by amyotrophic lateral sclerosis mutant copper, zinc-superoxide dismutase / M.A. Johnson et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – № 43. – P. 39872–39878.
247. Contrasting potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis / C. Jack et al. // *Glia*. – 2007. – Vol. 55. – № 9. – P. 926–934.
248. Lublin F.D. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey / F.D. Lublin, S.C. Reingold // *Neurology*. – 1996. – Vol. 46. – Defining the clinical course of multiple sclerosis. – № 4. – P. 907–911.
249. Miranda K.M. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite / K.M. Miranda, M.G. Espey, D.A. Wink // *Nitric oxide*. – 2001. – Vol. 5. – № 1. – P. 62–71.
250. 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method / K. Jamshad et al. // *Biochemical Journal*. – 1998. – Vol. 330. – № 2. – P. 795–801.
251. A novel competitive ELISA for both free and protein-bound nitrotyrosine / L.-N. Qu et al. // *Hybridoma and hybridomics*. – 2003. – Vol. 22. – № 6. – P. 401–406.
252. Enzyme immunoassay for detection of protein-bound nitrotyrosine in brain tissue and cerebrospinal fluid: Methodological issues / V.V. Fominykh et al. // *Neurochemical Journal*. – 2012. – Vol. 6. – Enzyme immunoassay for detection of protein-bound nitrotyrosine in brain tissue and cerebrospinal fluid. – № 3. – P. 239-245.

253. Comparison of nitrotyrosine antibodies and development of immunoassays for the detection of nitrated proteins / T. Franze et al. // *Analyst*. – 2004. – Vol. 129. – № 7. – P. 589–596.
254. Sokolovsky M. Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins / M. Sokolovsky, J.F. Riordan, B.L. Vallee // *Biochemistry*. – 1966. – Vol. 5. – № 11. – P. 3582–3589.
255. Concentrations of nitric oxide metabolites in the serum of Iranian multiple sclerosis patients / M. Roghani et al. // *Journal of the neurological sciences*. – 2010. – Vol. 294. – № 1-2. – P. 92–94.
256. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore / H. Kojima et al. // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. – 1998. – Vol. 46. – № 2. – P. 373–375.
257. Planchet E. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources / E. Planchet, W.M. Kaiser // *Journal of experimental botany*. – 2006. – Vol. 57. – Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence. – № 12. – P. 3043–3055.
258. Feelisch M. Methods in nitric oxide research / M. Feelisch, J. Stamler Preparation and Detection of S-Nitrosothiols. – Wiley-Blackwell, 1996. – 521–539 p.
259. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis—clinical implementation in the diagnostic process / À. Rovira et al. // *Nature Reviews Neurology*. – 2015. – Vol. 11. – Evidence-based guidelines. – № 8. – P. 471.
260. Proposal for a magnetic resonance imaging protocol for the detection of epileptogenic lesions at early outpatient stages / J. Wellmer et al. // *Epilepsia*. – 2013. – Vol. 54. – № 11. – P. 1977–1987.
261. MRI phenotypes based on cerebral lesions and atrophy in patients with multiple sclerosis / S. Tauhid et al. // *Journal of the neurological sciences*. – 2014. – Vol. 346. – № 1-2. – P. 250–254.
262. Automatic segmentation and volumetry of multiple sclerosis brain lesions from MR images / S. Jain et al. // *NeuroImage: Clinical*. – 2015. – Vol. 8. – P. 367-375.
263. Quantifying brain volumes for Multiple Sclerosis patients follow-up in clinical practice—comparison of 1.5 and 3 Tesla magnetic resonance imaging / A.P. Lysandropoulos et al. // *Brain and behavior*. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P. e00422.
264. Targeting phosphocreatine metabolism in relapsing–remitting multiple sclerosis: evaluation with brain MRI, 1 H and 31 P MRS, and clinical and cognitive testing / M. Cambron et al. // *Journal of neurology*. – 2018. – Vol. 265. – Targeting phosphocreatine metabolism in relapsing–remitting multiple sclerosis. – № 11. – P. 2614–2624.
265. Screening for tumours in paraneoplastic syndromes: report of an EFNS Task Force: Screening for tumours in PNS / M.J. Titulaer et al. // *European Journal of Neurology*. – 2011. – Vol. 18. – Screening for tumours in paraneoplastic syndromes. – № 1. – P. 19-e3.
266. Lee S.K. The laboratory diagnosis of autoimmune encephalitis / S.K. Lee, S.-T. Lee // *Journal of epilepsy research*. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P. 45.

267. Neurobehavioral outcomes in autoimmune encephalitis / A.K. Yeshokumar et al. // *Journal of Neuroimmunology*. – 2017. – Vol. 312. – P. 8-14.
268. Coexistence of multiple sclerosis and ankylosing spondylitis: Report of four cases from Russia and review of the literature / V. Fominykh et al. // *Journal of Clinical Neuroscience*. – 2017. – Vol. 44. – Coexistence of multiple sclerosis and ankylosing spondylitis. – P. 230–233.
269. Prevalence of epilepsy in a cohort of patients with multiple sclerosis / R. Uribe-San-Martín et al. // *Seizure*. – 2014. – Vol. 23. – № 1. – P. 81-83.
270. Neurolyupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies: An inception cohort study / C. Briani et al. // *Journal of Autoimmunity*. – 2009. – Vol. 32. – Neurolyupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies. – № 2. – P. 79-84.
271. Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease / T. Sato et al. // *Arthritis & Rheumatism*. – 2010. – Vol. 62. – № 12. – P. 3730–3740.
272. Cerebrospinal fluid interleukin-6 in central nervous system inflammatory diseases / A. Wullschlegel et al. // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8. – № 8. – P. e72399.
273. Interleukin-6 analysis of 572 consecutive CSF samples from neurological disorders: a special focus on neuromyelitis optica / A. Uzawa et al. // *Clinica Chimica Acta*. – 2017. – Vol. 469. – Interleukin-6 analysis of 572 consecutive CSF samples from neurological disorders. – P. 144–149.
274. Romero J.M. Intracellular glutathione mediates the denitrosylation of protein nitrosothiols in the rat spinal cord / J.M. Romero, O.A. Bizzozero // *Journal of neuroscience research*. – 2009. – Vol. 87. – № 3. – P. 701–709.
275. Wootla B. Is multiple sclerosis an autoimmune disease? / B. Wootla, M. Eriguchi, M. Rodriguez // *Autoimmune Diseases*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 969657.
276. Особенности клинического течения анти-N-метил-D-аспартат рецепторного энцефалита (случаи из практики) / Е.А. Кондратьева и др. // *Журнал инфектологии*. – 2018. – Т. 10. – № 1. – С. 121–130.
277. Энцефалит с антителами к NMDA-рецепторам / А.В. Суровцева и др. // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. – 2014. – Т. 59. – № 6. – С. 103–105.
278. Малин Д.И. Злокачественный нейролептический синдром или аутоиммунный анти-NMDA рецепторный энцефалит? Разбор клинического случая с летальным исходом / Д.И. Малин, В.Н. Гладышев // *Социальная и клиническая психиатрия*. – 2017. – Т. 27. – № 1. – С. 62–67.
279. Синдром ригидного человека с глазодвигательными и мозжечковыми нарушениями / Н.Н. Яхно и др. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2007. – Т. 1. – № 4. – С. 15–22.

280. Сердюк А.В. Синдром ригидного человека с миоклонусом и дизавтономией: описание случая / А.В. Сердюк, Е.А. Ковражкина // *Consilium Medicum*. – 2017. – Т. 19. – № 9. – С. 65–68.
281. Nonconvulsive status epilepticus in patients with limbic encephalitis / M.A. Sherman et al. // *Epilepsia and paroxysmal conditions*. – 2016. – Vol. 8. – № 4. – P. 74-83.
282. Волкова Л.И. Аутоиммунный лимбический энцефалит (клиническое наблюдение) / Л.И. Волкова. – 2018. – № 11. – С. 19-22.
283. Иммунообусловленные эпилепсии у детей / Е.Д. Белоусова и др. // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. – 2015. – Т. 60. – № 5. – С. 26–32.
284. Шнайдер Н.А. Клиническая гетерогенность паранеопластического неврологического синдрома / Н.А. Шнайдер, Ю.А. Дыхно, В.В. Ежикова // *Сибирский онкологический журнал*. – 2011. – Т. 45. – № 3. – С. 82–90.
285. Шнайдер Н. Структура и частота встречаемости паранеопластического неврологического синдрома при онкопатологии органов грудной клетки / Н. Шнайдер, Ю. Дыхно, В. Ежикова // *Сибирский онкологический журнал*. – 2012. – Т. 49. – № 1. – С. 63–70.
286. Чертоусова А.Е. Паранеопластические синдромы в неврологии / А.Е. Чертоусова, И.В. Черникова // *Нервные болезни*. – 2018. – № 1. – С. 32–38.
287. Паранеопластическое поражение центральной и периферической нервной системы при раке молочной железы. Клинический случай / Е.С. Королева и др. // *Сибирский онкологический журнал*. – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 108–112.
288. Паранеопластические синдромы в неврологии / А.А. Воробьева и др. – Москва: Медиа Сфера, 2016. – 19 с.
289. Опсоклонус-миоклонус синдром у детей / Р. Бембеева и др. // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 2007. – Т. 107. – № 2. – С. 4–11.
290. Бембеева Р. Внутривенные иммуноглобулины в терапии аутоиммунных заболеваний нервной системы у детей / Р. Бембеева, Н. Заваденко // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2015. – Т. 115. – № 8. – С. 83–93.
291. Диагностика паранеопластической полинейропатии у больных раком молочной железы и мелкоклеточным раком легкого / Е. Королева и др. // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 2014. – Т. 114. – № 4. – С. 93–96.
292. Irani S.R. Autoimmune encephalitis—new awareness, challenging questions / S.R. Irani, A. Vincent // *Discovery medicine*. – 2011. – Vol. 11. – № 60. – P. 449–458.
293. Cerebrospinal fluid cyto-/chemokine profile during acute herpes simplex virus induced anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis and in chronic neurological sequelae / K. Kothur et al. // *Developmental Medicine & Child Neurology*. – 2017. – Vol. 59. – № 8. – P. 806–814.

294. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response in neurosarcoidosis, acute disseminated encephalomyelitis and autoimmune encephalitis compared to multiple sclerosis in a tertiary hospital cohort / T. Hottenrott et al. // *Fluids and Barriers of the CNS*. – 2015. – Vol. 12. – № 1. – P. 27.
295. An evolving redefinition of autoimmune encephalitis / S. Esposito et al. // *Autoimmunity Reviews*. – 2019. – Vol. 18. – № 2. – P. 155-163.
296. Admission diagnoses of patients later diagnosed with autoimmune encephalitis / A. Baumgartner et al. // *Journal of Neurology*. – 2019. – Vol. 266. – № 1. – P. 124-132.
297. Autoimmune seizures and epilepsy / C. Geis et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2019.
298. Autoimmune encephalitis: A costly condition / J. Cohen et al. // *Neurology*. – 2019. – Autoimmune encephalitis.
299. Stich O. Antigen-specific oligoclonal bands in cerebrospinal fluid and serum from patients with anti-amphiphysin- and anti-CV2/CRMP5 associated paraneoplastic neurological syndromes / O. Stich, S. Rauer // *European Journal of Neurology*. – 2007. – Vol. 14. – № 6. – P. 650-653.
300. Factors underlying the development of chronic temporal lobe epilepsy in autoimmune encephalitis / S. Casciato et al. // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2019. – Vol. 396. – P. 102-107.
301. Characteristics of Seizure and Antiepileptic Drug Utilization in Outpatients With Autoimmune Encephalitis / Q. Huang et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1136.
302. Spatola M. Seizures and risk of epilepsy in autoimmune and other inflammatory encephalitis / M. Spatola, J. Dalmau // *Current Opinion in Neurology*. – 2017. – Vol. 30. – № 3. – P. 345-353.
303. Castellano J. Extreme Delta Brush in NMDA Receptor Encephalitis / J. Castellano, R. Glover, J. Robinson // *The Neurohospitalist*. – 2017. – Vol. 7. – № 3. – P. NP3-NP4.
304. Serial EEG findings in anti-NMDA receptor encephalitis: correlation between clinical course and EEG / J. Ueda et al. // *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*. – 2017. – Vol. 19. – Serial EEG findings in anti-NMDA receptor encephalitis. – № 4. – P. 465-470.
305. LGI1-antibody encephalitis is characterised by frequent, multifocal clinical and subclinical seizures / S. Aurangzeb et al. // *Seizure*. – 2017. – Vol. 50. – P. 14-17.
306. Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: a marker of active central nervous system inflammation / R.C. Dale et al. // *Developmental Medicine & Child Neurology*. – 2009. – Vol. 51. – Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology. – № 4. – P. 317-323.
307. Autoimmune Encephalitis at the Neurological Intensive Care Unit: Etiologies, Reasons for Admission and Survival / G. Harutyunyan et al. // *Neurocritical Care*. – 2017. – Vol. 27. – Autoimmune Encephalitis at the Neurological Intensive Care Unit. – № 1. – P. 82-89.

308. A score that predicts 1-year functional status in patients with anti-NMDA receptor encephalitis / R. Balu et al. // *Neurology*. – 2019. – Vol. 92. – № 3. – P. e244-e252.
309. Analysis of clinical outcomes in pediatric bacterial meningitis focusing on patients without cerebrospinal fluid pleocytosis / W.-L. Lin et al. // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2016. – Vol. 49. – № 5. – P. 723-728.
310. Yasar K.K. Predictors of mortality in tuberculous meningitis: a multivariate analysis of 160 cases / K.K. Yasar, F. Pehlivanoglu, G. Sengoz // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2010. – Vol. 14. – Predictors of mortality in tuberculous meningitis. – № 10. – P. 1330–1335.
311. Clinical Characteristics and Predictors of Outcome for Onconeural Antibody-Associated Disorders: A Retrospective Analysis / S. Liao et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2017. – Vol. 8. – Clinical Characteristics and Predictors of Outcome for Onconeural Antibody-Associated Disorders.
312. IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients / Z. Stelmasiak et al. // *Medical Science Monitor*. – 2001. – Vol. 7. – № 5. – P. 914–918.
313. Notable Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Soluble Interleukin-6 Receptors in Neuromyelitis Optica / H. Wang et al. // *Neuroimmunomodulation*. – 2012. – Vol. 19. – № 5. – P. 304–308.
314. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers / X. Yao et al. // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2014. – Vol. 141. – № 2. – P. 125-139.
315. Antiribosomal P protein antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus / T. Yoshio et al. // *The Journal of Rheumatology*. – 2005. – Vol. 32. – № 1. – P. 34-39.
316. No evidence of disease activity (NEDA) in MS should include CSF biology - Towards a 'Disease-Free Status Score' / M. Bonnan et al. // *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. – 2017. – Vol. 11. – P. 51-55.
317. Peripapillary retinal nerve fibre layer as measured by optical coherence tomography is a prognostic biomarker not only for physical but also for cognitive disability progression in multiple sclerosis / G. Bsteh et al. // *Multiple Sclerosis Journal*. – 2019. – Vol. 25. – № 2. – P. 196–203.
318. Byts N. Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent / N. Byts, A.-L. Sirén // *Experimental & Translational Stroke Medicine*. – 2009. – Vol. 1. – Erythropoietin. – P. 4.
319. High-dose erythropoietin in patients with progressive multiple sclerosis: A randomized, placebo-controlled, phase 2 trial / K. Schreiber et al. // *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. – 2017. – Vol. 23. – High-dose erythropoietin in patients with progressive multiple sclerosis. – № 5. – P. 675-685.

320. Weiss M.J. New insights into erythropoietin and epoetin alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications / M.J. Weiss // *The Oncologist*. – 2003. – Vol. 8 Suppl 3. – New insights into erythropoietin and epoetin alfa. – P. 18-29.
321. Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE / R. Yuan et al. // *PloS One*. – 2008. – Vol. 3. – Erythropoietin. – № 4. – P. e1924.
322. Erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis: a multicentre, randomised, double blind, placebo controlled, phase III study / G. Lauria et al. // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. – 2015. – Vol. 86. – Erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis. – № 8. – P. 879-886.
323. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid in neurodegenerative diseases / J. Brettschneider et al. // *Neuroscience Letters*. – 2006. – Vol. 404. – № 3. – P. 347-351.
324. Role of erythropoietin in the brain / C.T. Noguchi et al. // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2007. – Vol. 64. – № 2. – P. 159-171.
325. Impact of age, sex, and exercise on brachial artery flow-mediated dilatation / M.A. Black et al. // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2009. – Vol. 297. – № 3. – P. H1109.
326. Toda N. Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation / N. Toda // *Pharmacology & therapeutics*. – 2012. – Vol. 133. – № 2. – P. 159–176.
327. Brück W. Remyelination in multiple sclerosis / W. Brück, T. Kuhlmann, C. Stadelmann // *Journal of the neurological sciences*. – 2003. – Vol. 206. – № 2. – P. 181–185.
328. Barjavel M.J. Nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of mice and rats: kinetic analysis / M.J. Barjavel, H.N. Bhargava // *Pharmacology*. – 1995. – Vol. 50. – Nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of mice and rats. – № 3. – P. 168–174.
329. Inhibition of NO synthase activity in nervous tissue leads to decreased motor activity in the rat. / L. Halcak et al. // *Physiological research*. – 2000. – Vol. 49. – № 1. – P. 143–149.
330. IL-6 induces regionally selective spinal cord injury in patients with the neuroinflammatory disorder transverse myelitis / A.I. Kaplin et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2005. – Vol. 115. – № 10. – P. 2731–2741.
331. A study of glutathione S-transferase pi expression in central nervous system of subjects with amyotrophic lateral sclerosis using RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded material / E. Usarek et al. // *Neurochemical research*. – 2005. – Vol. 30. – № 8. – P. 1003–1007.
332. The blood–spinal cord barrier: morphology and clinical implications / V. Bartanusz et al. // *Annals of neurology*. – 2011. – Vol. 70. – The blood–spinal cord barrier. – № 2. – P. 194–206.
333. Daniel P.M. Changes in the effectiveness of the blood-brain and blood-spinal cord barriers in experimental allergic encephalomyelitis: Possible relevance to multiple sclerosis / P.M. Daniel, D.K.C. Lam, O.E. Pratt // *Journal of the neurological sciences*. – 1981. – Vol. 52. – Changes in the

effectiveness of the blood-brain and blood-spinal cord barriers in experimental allergic encephalomyelitis. – № 2-3. – P. 211–219.

334. Liu X. Insulin-like growth factor I treatment reduces clinical deficits and lesion severity in acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis / X. Liu, D.L. Yao, H.F. Webster // Multiple Sclerosis Journal. – 1995. – Vol. 1. – № 1. – P. 2–9.

335. Increased S-nitrosothiols and S-nitrosoalbumin in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children: indirect association with intracranial pressure / H. Bayir et al. // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2003. – Vol. 23. – Increased S-nitrosothiols and S-nitrosoalbumin in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. – № 1. – P. 51–61.

336. S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats / M. Khan et al. // Journal of neuroinflammation. – 2011. – Vol. 8. – № 1. – P. 78.

**СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

337. Fominykh, V. Interleukin-6, S-Nitrosothiols, and Neurodegeneration in Different Central Nervous System Demyelinating Disorders: Is There a Relationship?/ V. Fominykh, A.Vorobyeva, M.V. Onufriev, L. Brylev, M.N. Zakharova, N.V. Gulyaeva // **Journal of Clinical Neurology**. – 2018. – Vol. 14, № 3. – P.327-332.
338. Фоминых, В.В. Аутоиммунные энцефалиты: болезнь XXI века на перекрестке неврологии и психиатрии / В.В. Фоминых, Е.А. Фрей, Л.В. Брылев, Н.В. Гуляева // **Нейрохимия**. – 2018. – Т.35, № 4. – С.308-322. (Fominykh, V. Autoimmune encephalitis: a Disease of 21th century at crossroads of neurology and psychiatry /V. Fominykh, E. Frei, L. Brylev, N. Gulyaeva // **Neurochemical Journal**. – 2018. – V.12, № 4. – P.311-323.)
339. Fominykh, V. Increased S-nitrosothiols are associated with spinal cord injury in multiple sclerosis / V. Fominykh, M. Onufriev, A. Vorobyeva, L. Brylev, A.Yakovlev, M. Zakharova, N. Gulyaeva // **Journal of Clinical Neuroscience**. – 2016. –V.28. – P.38-42.
340. Fominykh, V. Coexistence of multiple sclerosis and ankylosing spondylitis: report of four cases from Russia and review of the literature / V. Fominykh, T. Shevtsova, N. Arzumanian, L. Brylev // **Journal of Clinical Neuroscience**. – 2017. –V.44. – P.230-233.
341. Воробьева, А.А. Использование тяжелых цепей фосфорилированных нейрофиламентов в качестве маркера нейродегенерации при демиелинизирующих заболеваниях ЦНС/ А.А. Воробьева, В.В. Фоминых, М.В. Онуфриев, М.Н. Захарова, Н.В. Гуляева // **Нейрохимия**. – 2014., №3. - С. 254–259. (Vorobyeva, A.A. Phosphorylated neurofilament heavy subunits as a biomarker of neurodegeneration in demyelinating diseases of the CNS / A.A. Vorobyeva, V.V. Fominykh, M.V.Onufriev, M. N. Zakharova, N.V. Gulyaeva // **Neurochemical Journal**. – 2014. – V.8, № 3. – P.221-225.)
342. Фоминых, В.В. Иммуноферментный анализ нитрованных по тирозину белков в ткани головного мозга и цереброспинальной жидкости: методические подходы/ В.В. Фоминых, М.В. Онуфриев, И.Л. Каймовский, Д.В. Гуз, А.Б. Гехт, М.Н. Захарова, Н.В. Гуляева // **Нейрохимия**. – 2012. –Т.29, № 3– С. 253-260. (Fominykh, V.V., Enzyme immunoassay for detection of protein-bound nitrotyrosine in brain tissue and cerebrospinal fluid: Methodological issues / V. V. Fominykh, M.V. Onufriev, I. L. Kaimovskii, D.V. Guz, A.B. Guekht, M. N. Zakharova, N.V. Gulyaeva // **Neurochemical Journal**. – 2012. – V.6, № 3. – P.239-245).
343. Воробьева, А.А. Биохимические маркеры аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы / А.А. Воробьева, В.В. Фоминых, Н.В. Второва,

- Н.В. Гуляева, Н.А. Зигангирова, М.Н. Захарова // **Медицинский Академический журнал.** – 2012. – Т.12, №4. – С. 26-28.
344. Воробьева, А.А. Биомаркеры рассеянного склероза. Обзор литературы и собственные данные / А.А. Воробьева, М.В. Иванова, В.В. Фоминых, Н.В. Второва, Н.В. Гуляева, Н.А. Зигангирова, М.Н. Захарова // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.** – 2013. – Т.113.– С. 23-31.
345. Фоминых, В.В. Система NO и нейродегенерация при демиелинизирующих заболеваниях//Тезисы доклада на XIX Школе-конференции молодых ученых, Москва, ИВНД и НФ РАН – Сборник тезисов. — 2015. - С.8.
346. Фоминых, В.В. Анализ антител к поверхностным нейрональным антигенам при аутоиммунных заболеваниях центральной нервной системы//Тезисы доклада на XX Школе-конференции молодых ученых, Москва, ИВНД и НФ РАН – Сборник тезисов. — 2016. - С.7.
347. Фоминых, В.В. Анализ уровня воспалительных маркеров и фосфорилированных цепей тяжелых нейрофиламентов у пациентов с аутоиммунными энцефалитами //Тезисы доклада на XXI Школе- конференции молодых ученых, Москва, ИВНД и НФ РАН – Сборник тезисов. — 2017. — С.7.
348. Воробьева, А.А. Биохимические маркеры аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы/ А.А. Воробьева, В.В. Фоминых, Н.В. Второва, Н.В. Гуляева, Н.А. Зигангирова, М.Н. Захарова // **Материалы VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции,** Новосибирск. – 2013. – С.36-37.
349. Воробьева, А.А. Уровень тяжелых цепей нейрофиламентов, амилоида 1-40 и 1-42 в спинномозговой жидкости пациентов с оптикомиелитом и рассеянным склерозом / А.А. Воробьева, Т.О. Симанив, Н.В. Полехина, М.Е. Журавлева, М.Н. Захарова, В.В. Фоминых, Н.В. Гуляева, Н.А. Зигангирова// **Медицинский алфавит.** – 2018. – Т. 2, № 17 (354). – С.33-36.
350. Vorobyeva, A. Biochemical markers of CNS demyelinating diseases/ A. Vorobyeva, V. Fominykh, N. Vtorova, N.V. Gulyaeva, N. A. Ziganirova, M. N. Zakharova// **Journal of the Neurological Sciences.** – 2013. – Vol. 333, No. 1. – P.387.
351. Vorobyeva, A. Biochemical markers of neurodegeneration in multiple sclerosis / A. Vorobyeva, V. Fominykh, M. Zakharova, N. Gulyaeva // **Session Multiple Sclerosis Journal.** – 2013. – Vol. 19, No. 11. – P.820.
352. Fominykh, V. Nitrosative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis / V. Fominykh, M. Onufriev, A. Vorobyeva, L. Brylev, M. Zakharova, N. Gulyaeva // **Journal of Neurochemistry.** – 2013. – V.125 (Spl.1) –P.201.
353. Gulyaeva, N. Phosphorylated neurofilament heavy chain in blood serum and CSF of patients with MS and ALS / N. Gulyaeva, V. Fominykh, M. Onufriev, A. Vorobyeva, L. Brylev, M. Zakharova.

Phosphorylated neurofilament heavy chain in blood serum and CSF of patients with MS and ALS //Abstract thesis. FENS Featured Regional meeting, Prague, Czech Republic, 2013.

354. Fominykh, V., Paroxysmal jerky movements in autoimmune disorders: two video case reports / V. Fominykh, I. Tukmakova, L. Brylev. Abstract thesis. "Myoclonic and other jerky movements". – 2016 – P.1.

355. Фоминых, В.В. Анализ антител к поверхностным нейрональным антигенам при аутоиммунных заболеваниях центральной нервной системы/ В.В. Фоминых, И.В. Тукмакова, Н.А. Михайлова, Л.В. Брылев, А.Б. Гехт, Н.В. Гуляева// Нейроиммунология. – 2016.– Т.13 – С.73-74. (тезисы XXI Всероссийской конференции «Нейроиммунология. Рассеянный склероз»).

356. Фоминых, В.В. Нитрозативный стресс при рассеянном склерозе: исследование метаболитов NO в сыворотке крови/ В.В. Фоминых // Материалы конференции с международным участием «Ломоносов», Москва – 2012. – С. 1-2.

357. Vorobyeva, A. Markers of neurodegeneration at different stages of MS/ A, Vorobyeva, V. Fominykh, T. Simaniv, M. Onufriev, E. Putsen, M. Zakharova, N. Gulyaeva //Abstract thesis. EFNS-ENS Joint Congress of European Neurology, Istanbul, Turkey –2014. – P. 517.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. РАСШИРЕННАЯ ШКАЛА ИНВАЛИДИЗАЦИИ КУРТЦКЕ (EDSS)

Группа симптомов	Классификация в зависимости от степени нарушения функций (баллы)
Поражения зрительного нерва	0. Нет изменений 1. Скотома, острота зрения лучше, чем 0,6. 2. Худший глаз со скотомой с максимальной остротой зрения от 0,6 до 0,4. 3. Худший глаз с большой скотомой или умеренное сужение полей зрения, но при максимальной остроте зрения от 0,4 до 0,2. 4. Худший глаз со значительным сужением полей зрения и максимальной остротой зрения от 0,2 до 0,1 или симптомы из раздела 3 плюс максимальная острота зрения лучшего глаза 0,4 или меньше. 5. Худший глаз с максимальной остротой зрения ниже 0,1, или симптомы из раздела 4 плюс острота зрения лучшего глаза 0,4 и меньше. 6. симптомы из раздела 5 плюс острота зрения лучшего глаза 0,4 и меньше.
Нарушения черепных нервов (кроме II пары)	0. Нет изменений 1. Симптомы без нарушения функций. 2. Умеренно выраженный нистагм или другие незначительные нарушения. 3. Выраженный нистагм, отчетливые симптомы вовлечения глазодвигательных или лицевого нервов, умеренные симптомы поражения других черепных нервов. 4. Выраженная дизартрия или другие выраженные нарушения. 5. Невозможность глотать или говорить.
Симптомы поражения пирамидного пути	0. Нет изменений 1. Патологические пирамидные рефлекс без снижения силы. 2. Незначительное снижение мышечной силы. 3. Незначительный или умеренный геми- или парапарез (слабость, но расцениваемая как повышенная утомляемость при сохранении основных функций после небольшого отдыха), тяжелый монопарез (значительная утрата функции). 4. Отчетливый геми- или парапарез (с нарушением функции), умеренный тетрапарез (функция значительно восстанавливается после короткого отдыха). 5. Параплегия, гемиплегия или отчетливый тетрапарез.

	6. Тетраплегия.
Нарушения координации	<p>0. Нет изменений</p> <p>1. Неврологические симптомы без нарушения функции.</p> <p>2. Незначительная атаксия (функции практически не страдают, но интенционный тремор или мимопопадание отчетливо выявляются в пробах).</p> <p>3. Умеренная атаксия туловища или конечностей (тремор и дисметрия затрудняют движения).</p> <p>4. Выраженная атаксия во всех конечностях (выполнение направленных движений сильно затруднено).</p> <p>5. Невозможность выполнения направленных движений из-за атаксии.</p>
Нарушения чувствительности	<p>0. Нет изменений</p> <p>1. Снижение вибрационной и мышечно-суставной чувствительности на одной-двух конечностях.</p> <p>2. Некоторое снижение тактильной, болевой чувствительности или чувства давления и/или умеренное снижение вибрационной чувствительности на одной или двух конечностях, или только снижение мышечно-суставного чувства на трех или четырех конечностях.</p> <p>3. Отчетливое снижение тактильной, болевой чувствительности или чувства давления и/или потеря вибрационной чувствительности на одной или двух конечностях или незначительное снижение тактильной, болевой и/или умеренное снижение всей проприоцептивной чувствительности на трех или четырех конечностях</p> <p>4. Значительное снижение тактильной, болевой чувствительности или потеря проприоцептивной (или в комбинации) на одной или двух конечностях, или умеренное снижение тактильной, болевой чувствительности и/или выраженные нарушения проприоцепции на более чем на двух конечностях</p> <p>5. Потеря чувствительности на одной или двух конечностях, или умеренное снижение тактильной или болевой и/или потеря проприоцепции на всем теле ниже головы</p> <p>6. Потеря всех видов чувствительности ниже головы</p>
Нарушения функций тазовых органов	<p>0. Нет изменений</p> <p>1. Незначительные нарушения мочеиспускания (императивные позывы или задержки).</p> <p>2. Умеренно выраженные задержки, императивные позывы, запоры или редкие эпизоды недержания.</p>

	<p>3. Частые эпизоды недержания мочи.</p> <p>4. Необходимость в постоянной катетеризации и постоянных дополнительных мероприятий для эвакуации кишечника.</p> <p>5. Полное недержание мочи.</p> <p>6. Полное недержание мочи и кала.</p>
Изменения интеллекта	<p>0. Нет изменений</p> <p>1. Снижение памяти (не влияет на работоспособность).</p> <p>2. Незначительное снижение интеллекта.</p> <p>3. Умеренное снижение интеллекта.</p> <p>4. Заметное снижение интеллекта.</p> <p>5. Деменция.</p>

Ходьба (проходимое расстояние)		Функциональные системы (ФС)	Балл EDSS
Без поддержки	С поддержкой		
>500 м		0*	0
>500 м		1 ФС* = 1	1
>500 м		>1 ФС* = 1	1,5
>500 м		1 ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	2
>500 м		2 ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	2,5
>500 м		1 ФС = 3 + другие ФС от 1 до 0 или 3-4 ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	3
>500 м		1 ФС = 3 + 1-2 другие ФС = 2 или 2 ФС = 3 + другие ФС от 1 до 0 или 5 ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	3,5
>500 м		1 ФС = 4 + другие ФС от 1 до 0 или более 2-х ФС = 3 + другие ФС от 1 до 0 или более 5-ти ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	4
>300 м		1 ФС = 4 + другие ФС от 1 до 0 или 5 ФС менее 4, но сочетание меньших баллов по ФС превышает пределы EDSS=4	4,5
>200 м		1 ФС = 5 + другие ФС от 1 до 0 или сочетание меньших баллов по ФС превышает пределы EDSS=4,5	5

>100 м		пациент может пройти без отдыха или поддержки более 100м	5,5
	100 м с односторонней поддержкой	односторонняя поддержка – трость или костыль	6
	20–100 м с двухсторонней поддержкой	двухсторонняя поддержка – трости или костыли, а также помощь другого человека	6,5
	менее 20 м с двухсторонней поддержкой	почти полностью привязан к креслу-коляске, вращает колёса и перемещается самостоятельно; активен в кресле-коляске около 12 часов в день	7
	может пройти несколько шагов с двухсторонней поддержкой	полностью привязан к креслу-коляске, иногда нуждается в помощи в передвижении и вращении колёс	7,5
		почти полностью привязан к постели или креслу, или перемещается в кресле-коляске, но проводит вне постели большую часть дня; сохранены многие функции самообслуживания, в основном эффективно пользуется руками	8
		почти полностью привязан к постели на протяжении большей части дня; может пользоваться рукой/руками; сохранены некоторые функции самообслуживания	8,5
		беспомощный лежачий больной; может общаться и принимать пищу	9
		совершенно беспомощный лежачий больной; не способный в достаточной мере общаться, принимать и проглатывать пищу	9,5
		смерть от РС	10

Общий балл EDSS _____