

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

МАКШАКОВ  
ГЛЕБ СЕРГЕЕВИЧ

ОЦЕНКА РОЛИ В-ЛИМФОЦИТОВ И МЕНИНГЕАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ В  
РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И ТЯЖЕСТИ КЛИНИЧЕСКОГО  
ТЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

14.01.11 – нервные болезни

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
Тотолян Наталья Агафоновна

Санкт-Петербург – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ....	15
1.1.    Рассеянный склероз – воспалительное и нейродегенеративное заболевание.....	15
1.2. Патогенетические механизмы прогрессирования РС.....	18
1.3. Роль В-лимфоцитов в патогенезе рассеянного склероза.....	21
1.4. Роль В-лимфоцитов в патогенезе нейродегенерации при рассеянном склерозе.....	26
1.5. Лептоменингеальные фолликулоподобные структуры – источник хронического интракального воспаления.....	29
1.6. Современные техники нейровизуализации лептоменингеального воспаления при РС.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. ....	35
2.1. Организация проводимой работы.....	35
2.2. Клиническая характеристика обследованных больных.....	36
2.2.1. Исследование встречаемости лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала и их связи с клинико-радиологическими и лабораторными показателями при рассеянном склерозе.....	37
2.2.2. Исследование связи лептоменингеального воспаления с изменениями состава субпопуляций лимфоцитов в крови и цитокинов цереброспинальной жидкости при рассеянном склерозе.....	40
2.2.3. Проспективное 2х-летнее исследование динамики МРТ-показателей лептоменингеального воспаления у пациентов с рассеянным склерозом.....	43

2.2.4. Исследование связи МРТ-показателей лептоменингеального воспаления с риском развития нейродегенерации и прогрессирования инвалидизации при рассеянном склерозе. ....	45
2.3. Инструментальные и лабораторные методы обследования .....	52
2.3.1. Протокол МРТ .....	52
2.3.2. Лабораторные исследования.....	55
2.4. Статистические методы анализа данных исследования.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	60
3.1. Исследование встречаемости лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала и их связи с клинико-радиологическими и лабораторными показателями при рассеянном склерозе.....	60
3.2. Исследование связи лептоменингеального воспаления с изменениями состава субпопуляций лимфоцитов в крови и цитокинов цереброспинальной жидкости при рассеянном склерозе .....	67
3.3. Проспективное 2х-летнее исследование динамики МРТ-показателей лептоменингеального воспаления у пациентов с рассеянным склерозом .....	69
3.4. Когортное проспективное неинтервенционное исследование, проводимое в параллельных группах, по оценке связи МРТ-показателей лептоменингеального воспаления с риском развития нейродегенерации и прогрессирования инвалидизации при рассеянном склерозе.....	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	83
ВЫВОДЫ.....	94
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	98
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	111

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИ - взвешенное изображение

В-лц – В-лимфоциты

ВПРС - вторично-прогрессирующий рассеянный склероз

ГА - глатирамера ацетат

ИП – импульсная последовательность

ИФА - иммуноферментный анализ

ИФН – интерферон

КВ – контрастное вещество

К-СЛЦ<sub>цсж</sub> - концентрация каппа свободных легких цепей иммуноглобулинов

ЛМФС - лептоменингеальные фолликулоподобные структуры

ЛОКУС - лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала

МРТ - магнитно-резонансная томография

НОМ - нормализованный объём головного мозга

НОСВ - нормализованный объем серого вещества

НОБВ - нормализованный объем белого вещества

ОП-IgG - олигоклональные полосы иммуноглобулина G

ПИОМ - процент изменения объема головного мозга

ПИТРС - препараты, изменяющие течение рассеянного склероза

Зм-ППИ - прогрессирование инвалидизации, подтвержденное через 3 месяца

РС - рассеянный склероз

СЛЦ - свободные легкие цепи иммуноглобулинов

Т-лц – Т-лимфоциты

ЦНС - центральная нервная система

ЦСЖ - цереброспинальная жидкость

BAFF - фактор, активирующий В-клетки (B-cell activating factor)

DIR - двойная инверсия-восстановление (double inversion- recovery)

EDSS - расширенная шкала инвалидизации Kurtzke (Expanded Disability Status Scale, EDSS)

FLAIR - инверсия-восстановление с подавлением сигнала от свободной воды (fluid

attenuated inversion-recovery)

NEDA-3 - критерий отсутствия активности рассеянного склероза, оцененный по 3 показателям (No Evidence of Disease activity, NEDA-3)

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Рассеянный склероз (РС) является аутоиммунным заболеванием центральной нервной системы с выраженным нейродегенеративным компонентом, проявляющимся уже на ранних стадиях и неуклонно прогрессирующим. Изучение влияния В-лимфоцитов (В-лц) на течение РС является одной из наиболее актуальных проблем в области рассеянного склероза. В клинических исследованиях продемонстрирована высокая эффективность деплеции В-лц с помощью моноклональных антител, в том числе при прогрессирующих формах РС (Попова Е.В., 2017). В патоморфологических исследованиях показано, что В-лц инфильтрируют ткани головного мозга в очагах демиелинизации и в области лептоменингеальных лимфоидных фолликулов, формируя зоны, где поддерживается клональная пролиферация и созревание аутореактивных Т-лимфоцитов (Т-лц) и В-лц (Serafini et.al., 2004). Наличие подобных структур ассоциировано с более ранним и быстрым прогрессированием инвалидизации (Choi S. et.al., 2012). Недавно разработанная методика нейровизуализации выявляет лептоменингеальное воспаление у пациентов с РС путем определения участков накопления контрастного вещества (КВ) в субарахноидальном пространстве на магнитно-резонансной томографии (МРТ) в режиме постконтрастного FLAIR 3D двойная инверсия-восстановление (Absinta M. et.al., 2015). В одном небольшом исследовании показано, что данные участки накопления контрастного вещества топически совпадают с зонами демиелинизации коры и эктопическими лимфоидными структурами (Absinta M. et.al., 2015).

Предполагается, что очаги накопления КВ в оболочках головного мозга на МРТ в режиме постконтрастного FLAIR могут являться маркером прогрессирования с перспективой использования в клинической практике для прогнозирования течения РС и определения терапевтической тактики. Проспективные исследования в этой области не проводились. Неизвестно, как связано наличие таких очагов с тяжестью течения РС и выраженностью нейродегенерации.

В связи с этим, целесообразно определить прогностическое значение лептоменингеального воспаления при РС в отношении прогрессирования нейродегенерации, определенное клинически и по данным МРТ в проспективном исследовании. Дополнительно требуется установить характеристики лептоменингеального воспаления с течением времени, связь с клинической картиной, радиологической активностью, терапевтическими интервенциями, а также с помощью иммунологических маркеров изучить его характеристики.

### Степень разработанности темы

В настоящее время не вызывает сомнения, что одним из ключевых игроков в патогенезе РС также являются В-клетки. У пациентов с РС определяется значительное увеличение интратекальной популяции В-клеток, представленной преимущественно CD27<sup>+</sup> В-клетками памяти, а также присутствие эктопических В-лимфоидных структур в менингеальных оболочках (Corcione A. et al., 2005; Serafini V. et al., 2004). Были также обнаружены признаки клональной экспансии и соматических гипермутаций в генах В-клеток, что указывает на антиген-зависимую дифференцировку В-клеток, а также плазматических клеток (Colombo M. et al., 2000; Uccelli A. et al. 2005). Антиген-специфические В-клетки памяти, центробласты и секретирующие антитела плазмабласты и плазматические клетки ответственны за интратекальную продукцию иммуноглобулина G в центральной нервной системе (ЦНС). Полученные данные в совокупности доказывают, что В-клетки, плазмобласты и плазматические клетки у пациентов с РС мигрируют в ЦНС и персистируют в ней многие годы, возможно пожизненно (Uccelli A. et al. 2005). Эта долговременная персистенция В-клеток может поддерживаться фактором, активирующим В-клетки (B-cell activating factor, BAFF) (Uccelli A. et al. 2005). При РС В-клетки агрегируются в лептоменингеальные фолликулоподобные структуры (ЛМФС), наиболее часто встречающиеся у пациентов с вторично-прогрессирующим течением (ВПРС) (Serafini V. et al., 2004). В мозгу больных с РС фолликулы эктопических В-клеток присоединяются к пиальной мембране в

пределах субарахноидального пространства (Serafini V. et.al., 2004). Выяснение механизмов образования и поддержания третичной лимфоидной ткани у больных с РС и при других аутоиммунных заболеваниях далеко от завершения.

Существенным ограничением в изучении ЛМФС является сложность в визуализации лептоменингеального воспаления. С помощью методики 3D FLAIR после введения контраста Absinta с соавт. успешно выявили лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала (ЛОКУС) у 25% пациентов с РС (Absinta M. et.al., 2015).. Важным результатом этого исследования также стало то, что они впервые показали пространственную связь накопления контраста и лимфоцитарных инфильтратов в субарахноидальном пространстве. Пока это первая и единственная работа, напрямую связывающая лептоменингеальное воспаление и ЛОКУС как феномен, обнаруживаемый на МРТ. Исследования на более высокопольном томографе 7 Тесла демонстрируют еще большую распространенность данного феномена при РС – до 91% (Harrison D.M. et.al., 2017). Использование импульсной последовательности 3D FLAIR (T2-взвешенная инверсия-восстановление с подавлением сигнала от свободной жидкости) в 10 раз более чувствительна к низким концентрациям контрастного вещества в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), чем T1-взвешенные изображения (Mamourian A.C. et.al. 2000).

Существует ряд нерешенных вопросов в области лептоменингеального воспаления при РС. Не известно, как влияет наличие ЛОКУС на темп прогрессирования инвалидизации и скорость атрофии головного мозга в динамике. Не ясно, насколько стабильно накопление контраста в оболочках, а, следовательно, и количество ЛОКУС, в динамике у пациентов с РС. Мало известно об иммунных механизмах формирования ЛОКУС, чтобы уверенно связывать этот МРТ-феномен с формированием ЛМФС. Эти факторы послужили обоснованием для проведения данной работы.

## Цель работы

Определить распространенность, особенности иммунопатогенеза лептоменингеального воспаления и его прогностическую значимость в отношении нейродегенерации и прогрессирования инвалидизации при рассеянном склерозе.

## Задачи исследования

1. Определить на основании кросс-секционного исследования встречаемость МРТ-показателей лептоменингеального воспаления и их связь с клиническими параметрами инвалидизации, МРТ-показателями нейродегенерации и лабораторными маркерами активности В-лимфоцитов при рассеянном склерозе;

2. Охарактеризовать связь МРТ-показателей лептоменингеального воспаления с характеристиками В-лимфоцитарного звена иммунного ответа у больных рассеянным склерозом;

3. Изучить характеристики и динамику МРТ-показателей лептоменингеального воспаления при длительном наблюдении у пациентов с рассеянным склерозом, получающих патогенетическую иммуномодулирующую терапию препаратами интерферона бета и глатирамера ацетата;

4. Выявить в проспективном когортном исследовании связь лептоменингеальных очагов контрастного усиления МРТ-сигнала у больных рассеянным склерозом с динамикой МРТ-показателей нейродегенерации и риском прогрессирования инвалидизации и динамикой МРТ-показателей нейродегенерации через 2 года.

## Научная новизна

Впервые в российской популяции пациентов с рассеянным склерозом получены и проанализированы с учетом характеристик болезни данные о встречаемости лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала;

Разработан протокол автоматической и полуавтоматической оценки атрофии и очагового поражения белого и серого вещества головного мозга;

Впервые в российской популяции показаны взаимосвязи между наличием лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала и снижением количества субпопуляций переключенных В-лц и В-лц памяти в периферической крови, ассоциированным с выраженностью В-клеточного ответа в ЦНС;

Впервые в российской популяции проведено проспективное исследование динамики лептоменингеальных очагов за 2 года с определением пространственных и временных характеристик экспрессии ЛОКУС;

Проанализирована связь наличия ЛОКУС с риском краткосрочного прогрессирования инвалидизации при РС с помощью комплексной статистической модели;

Показана взаимосвязь между наличием ЛОКУС и более выраженной атрофией общего объема серого вещества, коры головного мозга и подкорковых структур. При долгосрочном исследовании показано влияние наличия ЛОКУС на выраженность атрофии отдельных структур подкорковых ганглиев;

Разработан комплекс МРТ- и лабораторных показателей для последующего изучения влияния современной терапии ПИТРС на выраженность лептоменингеального воспаления при РС.

### Теоретическая и практическая значимость

В ходе работы разработан, стандартизирован и апробирован протокол магнитно-резонансной томографии для оценки лептоменингеального воспаления при рассеянном склерозе. Методика постконтрастной 3D FLAIR показала наибольшую чувствительность в определении очагов лептоменингеального воспаления по сравнению с другими опубликованными исследованиями. Протокол исследования внедрен в повседневную клиническую практику.

Показано, что наличие ЛОКУС при РС связано с атрофией структур головного мозга и более высокой инвалидизацией, а также является независимым

прогностическим фактором атрофии подкорковых структур. Эти данные могут иметь решающее значение для понимания механизмов нейродегенерации при РС.

Это первое исследование, продемонстрировавшее связь лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала со снижением субпопуляций В-лц памяти в периферической крови пациентов с РС. Таким образом, обнаружение лептоменингеальных очагов контрастирования может быть связано именно с активностью В-лц. Это является обоснованием для последующего изучения влияния анти-В-клеточных и других лекарственных препаратов на показатели лептоменингеального воспаления, выраженность нейродегенерации и риск прогрессирования при рассеянном склерозе.

Полученные результаты могут быть использованы в работе неврологов-специалистов по лечению рассеянного склероза, радиологов, иммунологов.

#### Методология и методы исследования

Всего обследовано 226 человек: 204 с достоверным РС в соответствии с диагностическими критериями 2010/2017г.г. и 22 здоровых добровольца (для исследования В-лц звена с помощью проточной цитометрии). Все обследуемые подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Для всех пациентов с РС выполнены сбор анамнеза, полный неврологический осмотр, МРТ. головного мозга по специализированному протоколу. Забор крови для анализа субпопуляций В-лц проводился у 52 пациентов и 22 здоровых добровольцев. Анализ данных цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) проводился у 78 пациентов. Повторные исследования проводились в соответствии с планом исследования.

До начала работы был проведен анализ литературы по изучаемой проблеме. В анализе данных использовались современные подходы статистической обработки данных: сравнительный анализ, анализ выживаемости, анализ общей линейной модели, регрессионный анализ. Все лабораторные исследования проводились с использованием современных методов и оборудования.

## Положения, выносимые на защиту

1. Предложенная методика определения лептоменингеального воспаления при рассеянном склерозе с использованием высокопольной МРТ (3 Тесла) позволяет выявлять лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала более чем у 40% пациентов;
2. Лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала ассоциированы с большей длительностью рассеянного склероза, прогрессирующим течением и более высокой уровнем инвалидизации, но не с частотой обострений или количеством новых и контрастных очагов на МРТ;
3. У пациентов с лептоменингеальными очагами контрастного усиления МР-сигнала по сравнению с пациентами без очагов и здоровыми лицами в периферической циркуляции снижено количество переключенных В-лимфоцитов и В-лимфоцитов памяти, что коррелирует с более высокой активностью В-лимфоцитов за гемато-энцефалическим барьером и может являться свидетельством вовлечения этих клеток в процесс формирования очагов лептоменингеального контрастирования;
4. Патогенетическая иммуномодулирующая терапия рассеянного склероза препаратами интерферона бета и глатирамера ацетата не влияет на МРТ-показатели лептоменингеального воспаления через 2 года терапии;
5. Лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала при рассеянном склерозе связаны с нейродегенерацией в сером веществе, коре головного мозга, стволе мозга и базальных ганглиях с наиболее выраженной во времени динамикой изменений в подкорковых структурах.

## Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, обеспечивается соблюдением единообразного протокола МРТ, рекомендаций производителя лабораторных тестов, достаточным количеством

пациентом, включенных в исследовательские выборки, глубоким анализом литературных данных по проблеме, длительным периодом наблюдения, а также статистическим анализом с полным соответствием международным нормам обсчета данных. Сформированные группы пациентов были репрезентативны по количеству для решения поставленной цели и задач.

#### Личный вклад автора

Автором лично разработан проект исследования, осуществлены его планирование и организация, наблюдение и неврологическая оценка пациентов-участников исследования, стандартизация и внедрение методики морфометрического анализа МРТ. Автором разработаны критерии оценки лептоменингеального воспаления и выполнен соответствующий анализ данных МРТ. Автором лично проводился морфометрический анализ данных МРТ в составе исследовательской группы. Автором лично выполнен статистический анализ данных.

#### Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный протокол МРТ внедрен в работу Городского Центра рассеянного склероза Санкт-Петербурга и отделения НМЦ «Томография». На основе данных, полученных в исследовании, разработано и проводится 2 многоцентровых международных клинических исследования по оценке влияния иммуносупрессивных препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза, на лептоменингеальное воспаление при РС.

#### Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, включая 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей

аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований, 8 статей в журналах, индексируемых базами Scopus и Web of Science, в том числе зарубежных.

### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, иллюстрирована 8 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы (включает 9 отечественных и 111 зарубежных источников).

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Рассеянный склероз – воспалительное и нейродегенеративное заболевание

РС - наиболее частое инвалидизирующее неврологическое заболевание у лиц молодого возраста (Бойко А.Н. и соавт., 2004; Weinshenker B.G. et.al., 1989). В основе патогенеза лежит хроническое аутоиммунное воспаление, приводящее к повреждению миелина и гибели аксонов с формированием необратимых неврологических симптомов (Steinman L. et.al., 2001).

Клиническое течение рассеянного склероза различается по стадиям и формам. Большинство пациентов (около 85%) дебютирует с так называемого клинически изолированного синдрома (КИС), т.е. первого эпизода клинических проявлений демиелинизирующего процесса, который у большинства пациентов завершается трансформацией в клинически достоверный рассеянный склероз (Kuhle J. et.al., 2015). Последующие эпизоды неврологической симптоматики длительностью более 24 часов называются обострениями или рецидивами. Активность заболевания также фиксируется с помощью МРТ в виде очагов повреждения белого и серого вещества (т.н. «бляшек» РС) центральной нервной системы (ЦНС). Помимо фокального повреждения, для РС характерны изменения нормально выглядящего белого и серого вещества и прогрессирующая атрофия вещества головного и спинного мозга (Calabrese M. et.al., 2007; Chard D. et.al., 2007; Kutzelnigg A. et.al., 2015). Введение критериев McDonald 2017 года значительно уменьшило время постановки диагноза достоверного рассеянного склероза и сделало возможным его постановку уже в момент первого обострения. (Thompson A. et.al., 2018).

На ранних стадиях заболевания существенную роль играет рецидивирующая активность воспалительного процесса. Появление новых или накапливающихся контраст очагов демиелинизации на МРТ или клинической активности в виде обострений расценивается как диагностически значимое событие и является

критерием для постановки диагноза (Thompson A. et.al., 2018). Накопление контрастного вещества на основе гадолиния (Gd) происходит в некоторых бляшках при активно текущем воспалительном процессе, вызванном проникновением активированных Т-лц и макрофагов с локальным разрушением миелиновой оболочки и нарушением работы гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). Появление новых очагов демиелинизации на МРТ не всегда сопровождается развитием обострения по причине высокой нейропластичности головного мозга. Наиболее уязвимыми с точки зрения будущей инвалидизации считаются инфратенториальные отделы головного мозга и спинной мозг, где высока плотность проводящих путей, и нет возможности для быстрой компенсации нарушений. Повышают вероятность повторного обострения следующие факторы: большое количество очагов демиелинизации (>10 очагов), наличие подтвержденного интратекального олигоклонального синтеза IgG и IgM. (Tintore M. et.al., 2015; Magraner M. et.al., 2011). Долгосрочный прогноз определяется сочетанием ряда факторов: количество обострений в первые 5 лет от начала заболевания, время до второго обострения, время до начала терапии, мужской пол, возраст на момент дебюта, тяжесть первого обострения, наличие интратекального синтеза олигоклонального иммуноглобулина G (Tintore M. et.al., 2015).

Большинство пациентов (не менее 60%) через 15-20 лет течения заболевания при отсутствии иммуномодулирующей терапии переходят в стадию вторично-прогрессирующего рассеянного склероза (ВПРС) (Kremenutzky M. et.al., 2006). На стадии ВПРС развивается нарастающий неврологический дефицит. Гораздо меньшая часть пациентов (около 10%) дебютирует в виде постоянного нарастания неврологической симптоматики, т.н. первично-прогрессирующий РС (ППРС) (Confavreux C. et.al., 2006). Как правило, эта форма проявляется в более зрелом возрасте, обычно после 40 лет, и встречаемость этой формы одинаковая среди женщин и мужчин (Kremenutzky M. et.al., 2006; Confavreux C. et.al., 2006). Для прогрессирующих стадий характерно постепенное нарастание слабости в обеих ногах и руках, мышечный гипертонус, недержание или, наоборот, задержка мочи, запор, реже недержание стула, атаксия ходьбы и конечностная атаксия. Симптомы,

как правило, носят восходящий характер и раньше вовлекают нижние конечности. С этим феноменом связана теория о РС как об аксонопатии, зависящей от длины нервных волокон (Giovannoni G. et.al., 2017).

В настоящее время принято выделять прогрессирующий РС с проявлениями остаточной клинической или радиологической активности или без них по Lublin et al. (Lublin F. et.al., 2014). Подобное разделение признает, что воспалительная активность РС и прогрессирование могут протекать параллельно или независимо друг от друга.

Ежегодная скорость атрофии головного мозга при рассеянном склерозе составляет 0.5-1.5% в год, что превышает нормальный показатель (0.4%) (De Stefano N., 2019). Установлено, что нейродегенеративные процессы протекают при РС уже на стадиях радиологически и клинически изолированного синдрома (Calabrese M. et.al., 2007). При этом, скорость атрофии на стадии КИС сопоставима со скоростью атрофии на стадии ВПРС, что подтверждает версию о параллельных процессах нейродегенерации и воспаления (De Stefano N. et.al., 2010). Существуют данные о том, что вероятность развития ВПРС не связана с количеством обострений (Kremenutzky M. et.al., 2006). Данные математического моделирования демонстрируют отсутствие различий между течением нейродегенеративных процессов при РРРС/ВПРС и ППРС, представляя ППРС как РРРС без обострений (Kotelnikova E. et.al., 2017). В рамках этой концепции, обострения являются как бы эпифеноменом, существенно не влияющим на течение заболевания. При этом тяжесть обострений и возможность восстановления после них является свойством самой нервной системы, эффективности ремиелинизации и механизмов нейропластичности.

С другой стороны, раннее назначение препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза, уменьшает проявления воспалительной активности и откладывает наступление стадии ВПРС, а у ряда пациентов позволяет добиться стойкой ремиссии (Trojano M. et.al., 2009). Успех зависит от эффективности назначаемой терапии. Существует разделение ПИТРС в соответствии с их профилем эффективности и безопасности на 1, 2 и даже 3 линию терапии (Gajofato

A. et.al., 2015). Базисные препараты 1ой линии не могут обеспечить полного контроля над активностью заболевания у большинства пациентов. Если назначение препарата интерферона бета-1а позволяет добиться отсутствия подтвержденного прогрессирования инвалидизации у 13.6 % пациентов, то применение окрелизумаба повышает эту вероятность до 9.1 % (Hauser S. et.al., 2017). Терапия алемтузумабом создает возможность для регресса инвалидизации на 42.9%, что не происходит при терапии интерфероном бета (Coles A. et.al., 2017). Наиболее значительным в этой связи является тот факт, что по данным клинических исследований 3 фазы замедление скорости атрофии головного мозга и ее нормализация до практически нормального уровня происходила при использовании препаратов ПИТРС 2ой линии, но не первой (Hauser S. et.al., 2017; Coles A. et.al., 2017).

## 1.2 Патогенетические механизмы прогрессирования РС

Патогенез прогрессирования нейродегенерации и последующей инвалидизации при РС крайне сложен и разнообразен. Основы прогрессирования закладываются на ранней стадии и связаны с формированием бляшек демиелинизации в белом и сером веществе ЦНС. Наличие очагов демиелинизации характерно для всех типов течения РС, однако, выраженность протекающих в них процессов различаются (Lassmann H. et.al., 2012). При формировании активных очагов вначале происходит проникновение через венулы с высоким эндотелием активированных CD8+ цитотоксических Т-лц и активация резидентной микроглии с начальным разрушением миелиновой оболочки (Prineas J.W. et.al., 1978; Babbe H. et.al., 2000; Barnett M.H. et.al., 2004; Чикуров А.А. и соавт., 2010). Далее происходит массивный приток остальной части Т-клеток, В-клеток и макрофагов, что приводит к выраженному повреждению ГЭБ, которое визуализируется как области накопления контраста на МРТ (Miller D.H. et.al., 1988; Gaitan M.I. et.al., 2011). Повреждение миелиновой оболочки происходит под действием цитотоксических факторов Т-лц, при опсонизации анти-миелиновыми антителами с последующим

повреждением системой комплемента и факторами активированной микроглии. На стадии ВПРС и ППРС воспаление и нейродегенерация также протекают в очагах демиелинизации (Lassmann H. et.al., 2012). Однако, повреждение ГЭБ с инфильтрацией лимфоцитов в этих случаях менее характерно. Воспаление становится более компартментализованным, то есть, независимым от процессов вне ЦНС. На стадии прогрессирующего РС количественные характеристики очагов демиелинизации уступают место качественным изменениям: происходит фокальное воспаление и постепенное увеличение в размерах «старых» очагов (т.н. «тлеющие» очаги) и массивное диффузное повреждение белого и серого вещества (Lassmann H. et.al., 2012). Таким образом, на прогрессирующих стадиях РС встречаются все типы очаговых изменений: классические активные очаги, медленно увеличивающиеся «старые» очаги, неактивные очаги и ремиелинизированные, «теневые», очаги (Lassmann H. et.al., 2012). Поражение серого вещества также характерно для всех стадий РС. Однако, если на ранних стадиях фокальное повреждение серого вещества, также, как и белого, связано с массивной инфильтрацией и активацией лимфоцитов, поляризацией микроглии (Kutzelnigg A. et.al., 2015; Lucchinetti C.F. et.al., 2011), то на более поздних стадиях очаги формируются в основном субпиально (Kutzelnigg A. et.al., 2015). Образование субпиальных очагов связано топически с появлением лимфоцитарных агрегатов клеток – эктопических лимфоидных фолликулов – в субарахноидальном пространстве (Magliozzi R. et.al., 2010). Субпиальные очаги находятся непосредственно под этими структурами, и градиент демиелинизации и активации микроглии направлен от менингеальных оболочек (Magliozzi R. et.al., 2010). Помимо очаговых изменений, для РС характерны диффузные изменения вещества головного мозга, включая повсеместное воспаление, активацию микроглии, астроглиоз, демиелинизацию (выраженную менее отчетливо, чем в очагах) и потерю аксонов в нормально выглядящем белом и сером веществе (НВБВ, НВСВ, соответственно) (Kutzelnigg A. et.al., 2015; Allen I.V. et.al. 2001). Эти изменения приводят к развитию выраженной атрофии головного мозга и

расширению желудочков, атрофии подкорковых ганглиев (Труфанов А.Г. и соавт., 2020).

Патогенез прогрессирования заключается не только в формировании воспалительных очагов и вовлечении нормально выглядящего вещества. Кардинальные изменения происходят в механизмах поддержания жизнедеятельности нейронов. Перераспределение  $\text{Na}^+$ -каналов как следствие демиелинизации, нарушенная экспрессия глутаматных рецепторов и потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов отмечены в демиелинизированных нейронах (Black J.A. et.al., 2006; Friese M. et.al., 2007; Ouardouz M. et.al., 2009; Кузьмина У.Ш. и соавт., 2019). Эти нарушения могут приводить к накоплению  $\text{Ca}^{2+}$  внутри аксонов и активации апоптоза (Lassmann H. et.al., 2012). Исследования механизмов нейродегенерации при РС также выявили значительную митохондриальную дисфункцию, которая, возможно, отражает влияние оксидативного стресса в активных очагах демиелинизации (Mahad D. et.al., 2008). В аксонах нейронов в неактивных очагах происходит увеличение количества и объема митохондрий и повышение активности белков дыхательной цепи (Mahad D. et.al., 2009; Witte M.E. et.al., 2009). Митохондриальная активность частично стабилизируется в ремиелинизированных волокнах (Zamboni J.L. et.al. 2011). Работа  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  на участках аксона, лишенных миелиновой оболочки, требует повышенной активности митохондрий. Повреждение, снижение подвижности и функциональной активности митохондрий определяют их важную роль в патогенезе нейродегенерации. Описаны множественные делеции митохондриальной ДНК в нейронах коры у пациентов с прогрессирующими формами РС (Campbell G.R. et.al., 2011). Дополнительные механизмы нейродегенерации, такие как оксидативный стресс, связанный с выработкой активных форм кислорода, перекисное окисление липидов и накопление железа способствуют гибели нейронов и неадекватной ремиелинизации (Bedard K. et.al., 2007; Love S. et.al., 1999; Van Horssen J. et.al., 2011; Van Horssen J. et.al., 2011; Haider L. et.al., 2011; Craelius W. et.al., 1982; Bagnato F. et.al., 2011).

Механизмы нейродегенерации являются относительно универсальными и встречаются при РС, а также при многих нейродегенеративных заболеваниях. Большинство из этих механизмов являются следствием повреждения ЦНС и реакцией на воспаление. Основным фактором РС, связывающим воспаление и нейродегенерацию, является интратекальное воспаление, обусловленное проникновением, персистенцией и секреторной активностью клеток иммунной системы внутри ЦНС.

### 1.3 Роль В-лимфоцитов в патогенезе рассеянного склероза

В нормальных условиях центральная нервная система (ЦНС) практически полностью изолирована от циркулирующего лимфоцитарного пула периферической крови. В связи со сложным устройством нейрональных цепей и ограниченным потенциалом регенерации, проникновение и воздействие иммунной системы на клетки ЦНС ограничено. Несмотря на то, что в процессе иммунного надзора ограниченное количество активированных Т-лц могут проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), их небольшое количество не идет ни в какое сравнение с числом лимфоцитов мигрирующих через другие органы (Hickey W.F. et.al., 2001)). Последние открытия в области морфологии иммунной системы позволили обнаружить структуры, напоминающие лимфатические сосуды, проходящие параллельно венозным синусам головного мозга и связанные с глубокими шейными лимфоузлами (Louveau A. et.al., 2017). Это открытие подчеркивает, что изолированность ЦНС от остального организма относительна, и циркуляция иммунных клеток и обмен иммуногенного материала происходят в норме. Это может играть важную роль в терапии аутоиммунных заболеваний ЦНС, сопровождающихся забарьерным воспалением, таких как рассеянный склероз.

При рассеянном склерозе наблюдается значительная инфильтрация всех отделов ЦНС аутореактивными лимфоцитами. Лимфоциты длительно персистируют в очагах демиелинизации, ЦСЖ, паренхиме мозга и менингеальных оболочках. Значение клеточного иммунитета в патогенезе РС стало очевидным

после обнаружения активированных Т-лц в бляшках, что затем было установлено на экспериментальной модели РС. РС долгое время рассматривался как аутоиммунное демиелинизирующее заболевание ЦНС, опосредованное преимущественно Т-лц, реактивными к белкам миелина. Работы на общепринятой модели РС, экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ), показали, что заболевание может быть вызвано иммунизацией компонентами миелина. Было установлено, что ЭАЭ может быть пассивно перенесен активированными миелин-специфичными Т-клетками (Raine C.S. et.al., 1991). Также была обнаружена реактивность Т-клеток к различным антигенам миелина (основному белку миелина, олигодендроцитарному гликопротеину и др.) у больных РС (Schmidt S. et.al. 1999). Главенствующая роль Т-клеток в патогенезе РС длительное время доминировала в работах большинства исследователей.

Однако в настоящее время не вызывает сомнения, что В-клеточному звену иммунной системы также принадлежит ключевая роль в патогенезе РС. У пациентов с РС определяется значимое увеличение интратекальной популяции В-лц, представленных преимущественно CD27+ В-клетками памяти. Это повышение выделяется даже в сравнении с вирусными менингитами и нейросифилисом (Серок S. et.al., 2010). Роль интратекальных В-клеток и плазматических клеток в норме минимальна, поскольку концентрация иммуноглобулинов составляет менее 10% от общего белка ЦСЖ, большая часть которых поступает через ГЭБ за счет процессов диффузии (Серок S. et.al., 2010). При РС происходит значительная экспансия В-клеточного звена, начинает преобладать местный синтез иммуноглобулинов, который приводит к значительному увеличению иммуноглобулинов ЦСЖ, достигая 60-80% от общего белка (Sellebjerg F. et.al., 2000). Кроме того, изменяется характер синтеза иммуноглобулинов, который из поликлонального становится олигоклональным, а также отмечается значительная продукция фрагментов иммуноглобулинов - свободных легких цепей (Makshakov G. et.al., 2015).

Выявленные признаки клональной экспансии и соматических гипермутаций в генах В-клеток указывают на антиген-зависимую дифференцировку В-клеток, а также плазматических клеток, продуцирующих аутоантитела к миелину и другим

структурам, в ЦНС и в периферической циркуляции (Haubold K. et.al., 2004; Ritchie A.M. et.al., 2004; Uccelli A. et.al., 2005). В-клетки памяти и плазматцы присутствуют как в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), так и в воспалительных церебральных очагах при РС (Franciotta D.V. et.al., 2008). Антиген-специфичные В-клетки памяти, центробласты, секретирующие антитела плазмабласты и плазматические клетки ответственны за интратекальную продукцию иммуноглобулинов в ЦНС. Полученные данные в совокупности доказывают, что В-клетки, плазмабласты и плазматические клетки у пациентов с РС мигрируют в ЦНС, активируются и персистируют в ней многие годы (Franciotta D.V. et.al., 2008). Механизмы, регулирующие в ЦНС процессы трафика и активации В-лц при РС, в настоящее время интенсивно изучаются. Был доказан факт продукции В-клеточного хемокина CXCL13 в периваскулярных инфильтратах, расположенных в очагах активной демиелинизации («активные бляшки»), и выявлено повышение содержания данного хемокина в ЦСЖ больных РС, коррелировавшего с выраженностью интратекального синтеза иммуноглобулинов и численностью В-клеток (Krumbholz M. et.al., 2006). Исследования цитокинового профиля ликвора, характеризующего больных РС, позволили выявить закономерное повышение фактора активации В-клеток (B-cell activating factor (BAFF)) – антиапоптотического и активационного цитокина (Krumbholz M. et.al., 2005). Межклеточные взаимодействия Т- и В-лц через систему CD40-CD40L могут оказывать активирующее влияние на В-лц, что способствует пролиферации, дифференцировке В-лц и выработке антител (Смагина И.В. и соавт., 2015).

Феномен повышенного интратекального синтеза иммуноглобулинов в ЦСЖ, а также их олигоклональный паттерн рестрикции, хорошо описан при РС. Олигоклональные антитела признаны «золотым стандартом» лабораторной диагностики РС, хотя они имеют относительно умеренную специфичность, и их интерпретация потенциально субъективна (Макшаков Г.С. и соавт., 2016). Иммуноглобулины человека состоят из легкой и тяжелой цепей, которые кодируются на разных хромосомах и синтезируются независимо друг от друга. Все

легкие цепи делятся на два типа: каппа и лямбда. В норме легкие цепи могут обнаруживаться в биологических жидкостях в свободном состоянии – свободные легкие цепи (СЛЦ). При некоторых заболеваниях, характеризующихся дискразией гуморального звена иммунной системы, (множественная миелома, болезнь Вальдестрема и другие) наблюдается значительное увеличение концентрации СЛЦ в сыворотке крови, что предсказывает более тяжелое течение заболевания. При некоторых системных аутоиммунных заболеваниях (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, болезнь Крона) СЛЦ в сыворотке крови также повышается. Ряд исследователей показали, что у пациентов с РС и КИС повышены концентрации СЛЦ –каппа и СЛЦ-лямбда в ЦСЖ (Rinker J. et.al., 2006; Hassan-Smith G. et.al., 2014). Кроме того, высокая концентрация СЛЦ-каппа в ЦСЖ предсказывала переход пациента из КИС в РС (Senel M. et.al., 2014). Некоторые авторы также обнаружили корреляцию между концентрацией СЛЦ-каппа в ЦСЖ и значением шкалы EDSS в динамике через несколько лет от дебюта заболевания (Rinker J. et.al., 2006). СЛЦ обладают схожей чувствительностью и специфичностью с олигоклональными антителами, но являются количественным маркером, что дает им значительное преимущество (Hassan-Smith G. et.al., 2014).

Помимо синтеза аутоантител, В-клетки могут играть другие важные роли в иммунопатогенезе РС. В патогенезе РС в настоящее время показана роль следующих антителонезависимых В-клеточных механизмов: 1) Участие в процессах нелимфогенеза (Magliozzi R. et.al., ; 2) Презентация аутоантигенов Т-клеткам (Bettelli E., et.al., 2006; Seamons A. et.al., 2006) и активация аутореактивных Т-клеток (Bettelli E., et.al., 2006); 3) Продукция провоспалительных цитокинов (прежде всего лимфотоксина и TNF $\alpha$ ) (Duddy M. et.al., 2007; Смагина и соавт., 2019). Существование антитело-независимых механизмов впервые было установлено в серии экспериментов *in vivo*, с использованием животных, дефектных по продукции иммуноглобулинов В-лц (Chan O.T. et.al., 1999). Действительно, на животных моделях было показано, что аллергический энцефаломиелит не удастся воспроизвести после предварительной деплеции В-клеток (Myers K.J. et.al. 1992).

Значение В-клеток доказывается положительными результатами терапии с помощью анти-CD20 моноклонального антитела (ритуксимаб) в клиническом исследовании HERMES. Это исследование показало, что истощение пула В-клеток в периферической крови при единственном цикле терапии ритуксимабом уменьшает воспалительное повреждение мозга и клинические рецидивы на 48 недель (Cross A. et.al., 2006). При этом происходило выраженное снижение общего числа контрастных очагов и новых контрастных очагов уже к 12 неделе исследования (около 80%). На фоне терапии ритуксимабом наблюдалось резкое снижение содержания В-клеток и плазматиков в крови и ЦСЖ (Cross A. et.al., 2006). Замечено также, что целевой для ритуксимаба рецептор CD20 локализован на переходных к зрелым пре-В-клетках, но отсутствует на секретирующих антитела плазматических клетках, а деплеция В-клеток в крови и ликворе не приводит к снижению интратекальной продукции олигоклональных иммуноглобулинов (Cross A. et.al., 2006). Исследования также показали влияние В-клеток на состояние Т-клеточного звена, так как на фоне анти-В-клеточной терапии наступало значительное снижение концентрации Т-клеток в ликворе, что объясняется, вероятно, инициальным и быстрым эффектом ритуксимаба на антиген-представляющую функцию В-клеток Т-клеткам и на продукцию цитокинов, регулирующих поведение Т-клеток (Cross A. et.al., 2006; Piccio L. et.al., 2010). Антителонезависимые механизмы работы В-клеток при РС также являются основополагающими для поддержания и развития аутоиммунного воспаления, а деплеция В-клеток приводит к комплексному подавлению этого процесса.

Таким образом, В-клетки обеспечивают широкий спектр функций для развития и поддержания аутоиммунного воспаления, что говорит об их центральной роли в патогенезе рассеянного склероза. Ключевым вопросом является роль В-клеток на разных стадиях РС – каким образом происходит трансформация рецидивирующе-ремиттирующего течения в прогрессирующее и какую роль при этом выполняют В-лц. Выяснение подобных взаимосвязей обеспечит поиск новых способов диагностики и лечения рассеянного склероза.

#### 1.4 Роль В-лимфоцитов в патогенезе нейродегенерации при рассеянном склерозе

Воспалительная активность при РС неразрывно связана с нейродегенеративными изменениями. Прогрессирование заболевания сопровождается уменьшением объема головного мозга и его структур. Взаимосвязь функций В-клеток и плазматитов с процессами нейродегенерации исследована недостаточно. Окончательно не установлено, какие именно факторы способствуют развитию нейродегенерации, однако возможно, что именно В-клетки являются ключом к этим механизмам.

При РС В-клетки продуцируют антитела к миелиновым и немиелиновым структурам, что приводит к разрушению миелиновой оболочки, дестабилизации мембраны аксона с последующим разрушением нейрона. С другой стороны, неизвестно, влияет ли длительная продукция антител на прогрессирование РС при отсутствии обострений и новых очагов (ВПРС, ППРС). Результаты клинических исследований препаратов, блокирующих проникновение лимфоцитов через ГЭБ (натализумаб) и исследований с использованием аутологичной трансплантации стволовых клеток костного мозга демонстрируют отсутствие эффекта или слабый эффект на интратекальную продукцию иммуноглобулинов (Ransohoff R.M. et.al., 2007; Mancardi G. et.al., 2008). Указанные препараты не оказывали значимого влияния на течение заболевания в стадии прогрессирования. Однако следует отметить, что опубликованные в 2017 году результаты многолетнего проспективного исследования окрелизумаба (моноклонального антитела против молекулы CD20) свидетельствуют о значимом снижении скорости прогрессирования инвалидизации при первично-прогрессирующем РС (Попова Е.В. и соавт., 2017). Положительные результаты исследования доказывают роль В-лц в патогенезе нейродегенерации и обосновывают их изучение при РС.

Нейродегенерация при РС неразрывно связана с длительно персистирующим интратекальным воспалением, связанным с активностью именно В-лц. В исследовании группы пациентов на этапе клинически изолированного синдрома

наблюдалась значимая атрофия серого и белого вещества (Puthenparampil M. et.al., 2017). Толщина коры головного мозга была значимо ниже у пациентов с высокой концентрацией хемокина CXCL13 в ЦСЖ по сравнению с группой с низкой концентрацией хемокина ( $2.41 \pm 0.1$  vs  $2.49 \pm 0.1$  мм,  $p < 0.05$ ). Высокие концентрации CXCL13, в свою очередь, чаще наблюдались у пациентов с наличием интратекальной продукции олигоклональных иммуноглобулинов, чем без нее ( $27.7 \pm 33.5$  vs  $0.9 \pm 1.5$ , соответственно,  $p < 0.005$ ). Ряд исследований демонстрирует связь между общей атрофией головного мозга и интратекальной продукцией олигоклональных иммуноглобулинов, общей продукцией IgG в ЦСЖ (Brandão C. et.al., 2017; Rojas J. et.al., 2012). Сравнение объема головного мозга и его отдельных структур (базальных ганглиев, среднего мозга, мозжечка и гиппокампа) у пациентов с РС одинакового возраста с наличием олигоклональных полос IgG (ОП-IgG) и без них демонстрируют значимое уменьшение объемов всех структур у ОП-IgG -позитивных пациентов (Ferreira D. et.al., 2014). Интратекальный олигоклональный синтез IgM, по данным исследования Magraner с соавт., связан со значимой атрофией головного мозга через 2 года наблюдений (фракция паренхимы мозга (brain parenchymal fraction): 0.73 для IgM+, 0.76 для IgM-,  $p = 0.03$ ), при этом подобная связь не была отмечена для синтеза олигоклонального иммуноглобулина G (Magraner M. et.al., 2011). Повышенный интратекальный синтез IgG и IgM, наличие ОП-IgG были ассоциированы с большим очаговым поражением белого и серого вещества головного мозга (Calabrese M. et.al., 2011). Изучение циркулирующих В-лц также позволяет изучать взаимосвязь В-лц и нейродегенерации при РС. В исследовании M.Comabella с соавт. было показано, что наивные, изотип-переключенные и изотип-непереключенные В-лц у пациентов с высокой степенью нейродегенерации экспрессировали значительно больше маркеров активации CD80 и CD86, а также имели сниженную экспрессию генов FCRL, ингибирующих активацию В-лц (Comabella M. et.al., 2014)). В другом исследовании в периферической крови пациентов с ВПРС было выявлено повышение концентраций плазмабластов и DC-SIGN+ и CD83+ В-лц в периферической крови по сравнению с пациентами с РППС, а также, были

получены значимые позитивные корреляции между DC-SIGN+ В-лц в периферической крови и баллом по шкале EDSS (Christensen R. et.al., 2013).

Большинство исследований связи В-лц с нейродегенерацией посвящены изучению роли иммуноглобулинов. Однако, в последнее время появляются работы, изучающие механизмы нейродегенерации, не связанные с иммуноглобулинами. Некоторые авторы предполагают, что другие продукты В-клеток, помимо антител, могут вызывать гибель нейронов и олигодендроцитов при РС. Некоторые данные были получены на животных моделях. В исследовании Cristofanilli с соавт. очищенная от клеточных элементов ЦСЖ пациентов с рецидивирующе-ремиттирующей и прогрессирующими формами РС дважды в неделю вводился в интравентрикулярно мышам C57/BL6 в течение 4 недель (Christofanilli M. et.al., 2014). У всех мышей, получавших инфузии ЦСЖ пациентов с РС, в отличие от получавших ЦСЖ здоровых пациентов, развивался прогрессирующий тетрапарез и демиелинизирующее поражение мозолистого тела и других участков ЦНС. Демиелинизация и инфильтрация активированными Т—хелперами 17 типа предшествовала аксональному поражению и астроглиозу. Количество животных, у которых развились очаги демиелинизации, коррелировало с баллом EDSS пациентов-доноров ЦСЖ. Введение ЦСЖ от прогрессирующих форм РС вызывало больший астроглиоз и дегенерацию аксонов, чем введение ЦСЖ от рецидивирующе-ремиттирующих форм. При этом эффективная иммуномодулирующая терапия снижала выраженность демиелинизации. В другом исследовании, введение ЦСЖ пациентов с прогрессирующими формами мышам также вызывало ускоренную пролиферацию нейрональных клеток-предшественников, что может снижать эффективность ремиелинизации и нейропластичности (Christofanilli M. et.al., 2013). Исследования R. Lisak с соавт., проведенные *in vitro*, продемонстрировало токсическое влияние продуктов, секретлируемых активированными В-клетками пациентов с РС, на клетки олигодендроглии и нейронов (Lisak R. et.al., 2012; Lisak R. et.al., 2017). Механизм токсичности для нейронов был обусловлен запуском апоптоза, что подтверждалось экспрессией генов TUNEL. Иммуноглобулины были предварительно удалены из

этой среды, а в самой среде не определялась активация системы комплемента, поэтому данный эффект не был обеспечен антителами. Исследование не выявило корреляции между концентрацией любого из изученных цитокинов/хемокинов (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , лимфотоксин- $\alpha$ , IL-6, IL-10) и выраженностью гибели олигодендроцитов, что оставляет открытым вопрос о природе токсического агента. В ходе дальнейших экспериментов выяснилось, что вещество с молекулярной массой более 300 кДа оказывало наиболее выраженный токсический эффект. Авторы статьи высказывают гипотезу о том, что это мог быть некоторый не известный пока провоспалительный цитокин. Аналогичный эффект был обнаружен для олигодендроцитов: при воздействии супернатанта, секретлируемого активированными В-лц пациентов с РС, наблюдалось сокращение размеров, фрагментация мембраны и гибель олигодендроцитов (Lisak R. et.al., 2012).

Таким образом, исследования последних лет показали, что некоторые механизмы нейродегенерации не связаны с антитело-зависимой или клеточно-опосредованной нейротоксичностью. Некоторые исследования напрямую демонстрируют влияние В-лц. Эти механизмы требуют дальнейшего изучения.

### 1.5 Лептоменингеальные фолликулоподобные структуры – источник хронического интратекального воспаления

Существуют механизмы для поддержания хронического интратекального воспаления. Этот универсальный процесс требует длительного нахождения клеток, участвующих в воспалительной реакции, в очаге воспаления. Для этого необходимо создание определенной микросреды, содержащей факторы роста, активации и выживания лимфоцитов. В отсутствие ко-стимуляции и взаимодействия со стромальным компонентом хроническое воспаление невозможно. Такой микросредой для лимфоцитов при аутоиммунных реакциях являются эктопические лимфоидные фолликулы, имеющие все свойства лимфоидной ткани, но вынесенные на периферию, ближе к местам формирования воспалительной реакции. Эктопические структуры формируются при многих

аутоиммунных и инфекционных заболеваниях, а также опухолях (Pitzalis C. et.al., 2014). При рассеянном склерозе в результате иммунопатологического процесса, преимущественно на поздних стадиях, в субарахноидальном пространстве ЦНС формируются эктопические лимфоидные фолликулы – лептоменингеальные фолликулоподобные структуры (ЛМФС) (Serafini V. et.al., 2004).

В мозге больных РС эктопические фолликулы формируются периваскулярно и прилежат к пиальной мембране в пределах субарахноидального пространства. Выяснение механизмов образования и персистенции третичной лимфоидной ткани у больных с РС и при других аутоиммунных заболеваниях далеко от завершения. Одним из объяснений формирования эктопических структур в субарахноидальном пространстве, вероятно, являются свойства эндотелия его сосудов, экспрессирующих больше молекул адгезии (Р-селектин), обеспечивая тем самым облегченный трафик Т-хелперов в процессе иммунного надзора (Kivisäkk P. et.al., 2003). Таким образом, оболочки головного мозга являются менее иммунопривилегированными органами, чем паренхима мозга.

Одной из основных популяций лимфоцитов ЛМФС являются В-клетки. Обширная периваскулярная инфильтрация В-клетками ЛМФС была показана в работе Choi с соавт. (Choi S. et.al., 2012). Процесс агрегации В-клеток с формированием фолликулов опосредуется экспрессией лимфоидных цитокинов, в частности, хемокина CXCL-13 – селективного хемоаттрактанта для В-лц. ЛМФС располагаются преимущественно в глубине борозд больших полушарий, но встречаются также инфратенториально в субарахноидальном пространстве, окружающем мозжечок и ствол мозга. До сих пор не было показано наличия ЛМФС в паренхиме головного мозга. ЛМФС содержат Т- и В-лц, плазматиты и фолликулярные дендритные клетки (ФДК) (Serafini V. et.al., 2004). Дендритные клетки ЛМФС выделяют преимущественно CXCL-13, при этом Т-клеточные хемокины, такие как CCL21 и адрессин периферических лимфоузлов (peripheral node adressin (PNAd)) практически не экспрессируются, привлекая в большей степени В-лимфоциты (Serafini V. et.al., 2004). Пролиферация В-лимфоцитов внутри ЛМФС также преобладает над пролиферацией Т-лимфоцитов (Serafini V.

et.al., 2004). Особой популяцией Т-лц, участвующих в формировании ЛМФС, являются фолликулярные Т-хелперы, экспрессирующие хемокиновый рецептор CXCR5, обладающий тропностью к хемокину CXCL-13 (Serafini B. et.al., 2004).

Показано, что В-клетки, находящиеся в третичных фолликулах, ЦСЖ, паренхиме мозга и очагах демиелинизации представлены родственными клонами, исходя из анализа генов их тяжелых цепей иммуноглобулинов, что свидетельствует о повсеместном распространении патологических клонов В-клеток в ЦНС (Lovato L. et.al., 2011). Установлено также, что внутри ЛМФС происходит формирование герминативного центра, где В-лц пролиферируют, проходят стадию соматической гипермутации и реаранжировки генов иммуноглобулинов для созревания аффинности и переключения изотипа антител (Serafini B. et.al., 2004). Это подтверждается данными сравнительного анализа лимфоцитов, населяющих ЛМФС и шейные лимфоузлы, на модели мышинового ЭАЭ (Lehmann-Horn K. et.al., 2016). Т-хелперы при этом обеспечивают соответствующие ко-стимулирующие сигналы для активации и дифференцировки наивных В-лц, в то время как ФДК играют ключевую роль в презентации интактного антигена В-лц и в процессе селекции наиболее аффинных клонов (Van Nierop K. et.al., 2002). Дополнительными функциями ЛМФС могут быть обеспечение антиген-зависимой презентации и активации Т-лц В-лц и продукция про-воспалительных цитокинов. Плазматиты, секретирующие олигоклональные иммуноглобулины, могут использовать ЛМФС в качестве ниш для выживания (Pollok K. et.al., 2012).

Прогрессирование РС связано с воспалительными реакциями в неактивных очагах, НВБВ, сером веществе и мозговых оболочках, что при ВПРС и ППРС происходит в отсутствие значимой активности заболевания, т.е. без обострений и контрастных очагов, что нельзя объяснить только выработкой антител (Lassmann H. et.al., 2012). Прогрессирование инвалидизации достоверно связано с нарастающим поражением серого вещества. Атрофия серого вещества как маркер нейродегенерации является более чувствительным и специфичным в отношении прогноза дальнейшего прогрессирования заболевания, чем общая атрофия мозга

или атрофия белого вещества (Calabrese M. et.al., 2007; Chard D. et.al., 2009). Исследования Kutzelnigg et al. показывают, что на стадии вторичного прогрессирования и при первично-прогрессирующей форме РС отмечается значительное нарастание повреждения коры головного мозга с формированием обширных зон демиелинизации серого вещества, которые встречаются на стадии РРС значительно реже (Kutzelnigg A. et.al., 2015). Исследования аутопсийного материала Magliozzi с соавт. показывают прямую пространственную связь ЛМФС с очагами демиелинизации, апоптоза нейронов и активацией микроглии в подлежащих областях коры (Magliozzi R. et.al., 2010; Choi S. et.al., 2012). В таких очагах выраженность поражения уменьшается по градиенту, направленному от оболочек головного мозга, что, вероятно, связано с воздействием неустановленных токсических факторов, а не клеток или антител (Magliozzi R. et.al., 2010). Наличие ЛМФС было связано с более ранним возрастом наступления необратимой инвалидизации, однако, при этом, количество обострений в первые 3 года было выше у пациентов без ЛМФС, что говорит о разных механизмах прогрессирования в этих субпопуляциях (Magliozzi R. et.al., 2010).

### 1.6 Современные техники нейровизуализации лептоменингеального воспаления при РС

В последнее время, все больше внимания уделяется исследованию биомаркеров, не связанных с воспалением в белом веществе ЦНС, то есть, классических «бляшек» демиелинизации. Современные методы нейровизуализации с помощью высокопольной (3 Тесла) магнитно-резонансной томографии с применением импульсной последовательности (ИП) 3D Fluid-Attenuated Inversion-Recovery (FLAIR) с внутривенным контрастированием позволяют выявлять точечное или линейное накопление контрастного вещества на основе гадолиния в субарахноидальном пространстве и мягких мозговых оболочках – лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала (ЛОКУС) (Absinta M. et.al.,

2015). Это новый биомаркер РС с еще не определенной прогностической и диагностической значимостью.

Обнаружение ЛОКУС связано с большей чувствительностью 3D FLAIR к контрастирующим агентам, что позволяет выявлять накопление контраста в областях, по большей части недоступных для выявления методикой T1, которая чаще всего используется для определения накопления контраста при РС (Mamourian A.C. et.al. 2000). Накопление контраста в субарахноидальном пространстве происходит периваскулярно (Makshakov G. et.al. 2017). Вероятно, большая часть контрастного вещества перемешивается с ЦСЖ и не накапливается в необходимых для детекции количествах. Однако, у части пациентов происходит ограниченное накопление контраста периваскулярно в субарахноидальном пространстве, что и определяется с помощью ИП 3D FLAIR. Часть ЛОКУС также визуализируется в ИП T1, однако, из-за наличия значительного «шума» от других участков накопления контраста, остаются практически неразличимы.

По данным ретроспективного наблюдения группы R.Zivadinnov с соавт. отмечено, что ЛОКУС преобладали у пациентов с ВПРС (Zivadinnov R. et.al., 2016). Для ЛОКУС-позитивных пациентов было также характерно более длительное течение заболевания и старший возраст, хотя различия между группами не были статистически значимыми. Количество предшествующих обострений и тип иммуномодулирующей терапии не влияли на наличие ЛОКУС.

Данные аутопсии пациентов с РС подтверждают наличие периваскулярных ЛМ ФС в области накопления контраста, а также обширной зоны демиелинизации прилежащих областей коры (Absinta M. et.al., 2015). Отмечена связь между наличием ЛОКУС и динамикой атрофии серого вещества, коры и увеличением желудочков головного мозга за 5 лет наблюдений (Zivadinnov R. et.al., 2016).

Существует несколько нерешенных вопросов в изучении лептоменингеального воспаления: нет стандартизированного протокола исследования, не определены оптимальные характеристики и длительность экспозиции контраста, до конца не определена прогностическая и диагностическая значимость метода. Проблематичным для рутинной клинической практики является необходимость

использовать томограф более высокой напряженности магнитного поля, такие как 3 и 7 Тесла. Однако потенциальная прогностическая значимость в определении риска нейродегенерации и прогрессирования, а также потенциальная связь с терапией РС, представляют интерес для изучения ЛОКУС и внедрения его в клиническую практику.

На сегодняшний момент, разработаны и стандартизированы подходы к терапии рассеянного склероза, которые, однако, не позволяют добиться полного подавления проявлений болезни. Основные успехи были достигнуты в лечении пациентов на ранних стадиях заболевания, что позволяет существенно снизить инвалидизацию вследствие РС. Однако значительное количество пациентов по-прежнему переходят из рецидивирующе-ремиттирующей стадии во вторично-прогрессирующее течение. Обнаружение ЛОКУС у пациентов с РС уже на ранних стадиях может говорить о существенной интратекальной активности иммунной системы, что потенциально сделает попытки применения стандартной терапии неэффективными. Пациенты с ЛОКУС могут нуждаться в таргетной анти-В-клеточной терапии препаратами, имеющими достаточный уровень пенетрации в ЦНС. Эти данные показывают важность проведения данного исследования для более глубокого изучения влияния ЛОКУС на прогрессирование РС для разработки персонифицированного подхода к терапии РС.

Таким образом, неудовлетворенная потребность в эффективной терапии и разработка подхода, основанного на понимании патогенеза заболевания на разных стадиях заболевания с использованием клинических, лабораторных и радиологических биомаркеров, послужили поводом к данному исследованию.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Организация проводимой работы

Данное исследование проводилось с 2016 года по 2018 год с учетом обработки статистических данных и публикации полученных результатов. В соответствии с планом исследования, в период с 2016 по 2018 год было проведено клиническое, радиологическое и иммунологическое исследование отобранной когорты пациентов.

Основным местом проведения данной работы являлся городской центр рассеянного склероза (ГЦРС) ГБУЗ ГKB №31 г. Санкт-Петербург, созданный в 2011 году согласно распоряжению Правительства Санкт-Петербурга Комитета по здравоохранению. На сегодняшний момент в реестре ГЦРС состоит на диспансерном наблюдении более 4500 пациентов с рассеянным склерозом. Все пациенты с рассеянным склерозом проходили регулярное диспансерное наблюдение с частотой не реже 1 раза в 3 месяца. На каждого участника исследования была заведена отдельная регистрационная карта, фиксирующая набор исследуемых показателей.

Лабораторные исследования проводились на базе лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний Центра по молекулярной медицине ПСПбГМУ им.И.П.Павлова, а также на базе лаборатории иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Образцы цереброспинальной жидкости и сыворотки крови были отобраны из биобанка ГЦРС. Кровь для проточной цитометрии собиралась и анализировалась в день исследования.

Магнитно-резонансная томография была выполнена на базе ООО «НМЦ-Томография» клиники «Скандинавия».

Этическая экспертиза исследования проведена ЛЭК при ПСПбГМУ им.И.П.Павлова и локальным этическим комитетом Городской клинической больницы №31. Весь план исследований проводился с соблюдением всех правил надлежащей клинической практики РФ и декларацией Хельсинки. Все участники

приглашались в ГЦРС для ознакомления с процедурами и планом исследования. Всем пациентам предоставлялось достаточное количество времени для прочтения информационного листка, обсуждения с врачом-исследователем, родственниками. Все пациенты, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие перед включением в исследование.

## 2.2 Клиническая характеристика обследованных больных

На первом этапе работы была отобрана группа пациентов, отвечающим критериям включения в планируемые исследования. Всего в исследование было включено 204 пациентов с достоверным рассеянным склерозом и 22 донора без сопутствующей неврологической патологии. Средний возраст участников исследования составил  $40,2 \pm 14,6$  лет. Отношение мужчин/женщин составило 1:1.5. По типу течения пациенты разделились следующим образом: РРРС - 148/204 (73%), ВПРС – 40/204 (20%), ППРС – 16/204 (8%). Средняя длительность заболевания составила  $70,2 \pm 86,3$  месяца. Медиана балла EDSS для включенных в исследование пациентов составила 3,0 [2,0 – 6,0] балла. Были собраны подробные данные анамнеза и клинической картины заболевания.

В исследовании использовались общие подходы к диагностике и терапии рассеянного склероза на всем протяжении исследования. Диагноз «рассеянный склероз, рецидивирующее-ремиттирующее течение» устанавливался на основании критериев McDonald 2010 и 2017 года (Thmpson A. et.al. 2017). Критерием обострения, согласно критериям McDonald 2010 и 2017, являлось острое или подострое развитие симптомов, подозрительных на воспалительное демиелинизирующее заболевание, длительностью не менее 24 часов в отсутствие лихорадки или инфекции. В ходе наблюдения второе обострение регистрировалось, если развивалось не раньше 30 дней с момента развития первого обострения. Критерием перехода в достоверный вторично-прогрессирующий рассеянный склероз по Lublin и Reingold 1996 было доказанное прогрессирование

инвалидизации по шкале EDSS в течение минимум 6 месяцев (Lublin F. et.al., 1998). Для пациентов с баллом EDSS <5,5 значимым считалось нарастание EDSS на 1,0 балл, при EDSS  $\geq$  5,5 – на 0,5 балла. Балл EDSS пациентов фиксировался в период стойкой ремиссии, то есть в отсутствие документированных обострений РС в период фиксируемой даты. Если сбор данных приходился на период обострения, отсчет времени начала регистрации начинался не менее, чем за 30 дней до момента начала обострения.

Всем пациентам проводилась оценка неврологического статуса по расширенной шкале инвалидизации Kurtzke (Expanded Disability Scale Score (EDSS)). С целью нивелирования различий в сроках наблюдения пациентов и оценки связи скорости нарастания инвалидизации во второй группе нами был измерен индекс прогрессирования РС (Multiple Sclerosis Severity Score, англ. (MSSS)) (Roxburg R. et.al., 2005). Для его измерения были использованы балл EDSS и длительность заболевания при последнем осмотре. Данный индекс был разработан для отражения динамики прогрессирования инвалидизации при рассеянном склерозе и является более точным выражением этого процесса, чем простое отношение балла EDSS к длительности течения заболевания. Для расчета индекса использован специальный коэффициент, рассчитанный по данным международных регистров пациентов для нивелирования разброса подсчета балла EDSS.

### 2.2.1 Исследование встречаемости лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала и их связи с клинико-радиологическими и лабораторными показателями при рассеянном склерозе

Данное исследование имело кросс-секционный дизайн с ретроспективным анализом данных. Целью исследования было охарактеризовать встречаемость, демографические, клинические, лабораторные и радиологические характеристики пациентов с ЛОКУС и без них.

Критерии включения в исследование:

1. Наличие письменного информированного согласия;
2. Возраст пациентов 18-55 лет включительно;
3. Больные обоего пола с достоверным диагнозом рассеянного склероза (в соответствии с критериями МакДональда, 2010)
  - с рецидивирующее - ремитирующим течением
  - с вторично-прогрессирующим течением
  - с первично-прогрессирующим течением
4. Готовность следовать указаниям лечащегося врача, являться в срок в исследовательский центр для проведения процедур исследования.

Критерии невключения в исследование:

1. Предшествующая или планируемая терапия химиотерапевтическими препаратами (например, митоксантрон);
2. Предшествующая или планируемая терапия препаратами, направленными против молекулы CD20 и других поверхностных маркеров В-лимфоцитов (например, ритуксимаб);
3. Беременность на этапе отбора или желание зачать ребенка в процессе исследования;
4. Клинически значимые нарушения работы почек;
5. Наличие противопоказаний для выполнения МРТ головного мозга (например, металлические магнитные импланты или водители ритма, аллергия на контрастное вещество).

Для всех пациентов, включенных в исследование, после подписания согласия, были отобраны парные образцы сыворотки и ЦСЖ из биобанка ГЦРС и лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний ПСПбГМУ им.И.П.Павлова. Взятие биоматериала путем люмбальной пункции и забора парного образцы крови из периферической вены производилось на этапе диагностики РС не позднее 6 месяцев до момента выполнения МРТ. У всех пациентов была собрана информация о типе течения заболевания, времени первого обострения. У всех пациентов была проведена оценка неврологического статуса на момент включения исследование, проведена оценка по шкале EDSS, рассчитан индекс MSSS. Далее проводилась

МРТ головного мозга по специальному протоколу для детекции ЛОКУС. Дизайн исследования графически представлен на Рисунке 1.

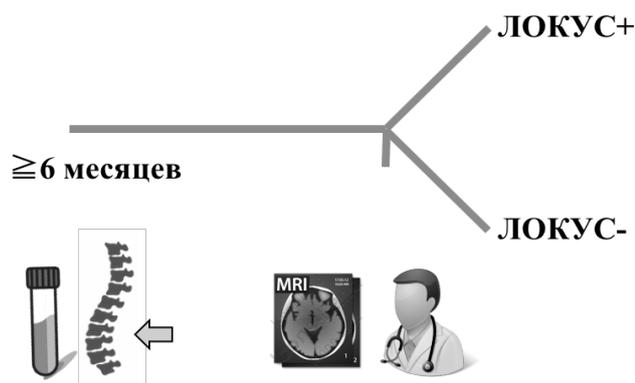


Рисунок 1 – Дизайн исследования 2.2.1.

Примечание: ЛОКУС – лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала

В исследование было включено 54 пациента с достоверным рассеянным склерозом. Медиана (межквартильный размах) возраста пациентов составила 43 (22,5) лет. Соотношение мужчин/женщин составило 1:1.7 (63% женщин). Характеристики исследуемой популяции представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Демографические и клинические характеристики исследуемой популяции пациентов

Показатель	Значения
Объем выборки	N=54
N (%) женщин	34/54 (63%)
Медиана возраста на момент включения (IQR), годы	43 (22,5)
Медиана длительности заболевания (IQR) на момент включения, месяцы	86 (149,1)
Медиана балла EDSS на момент обследования (25 <sup>ый</sup> и 75 <sup>ый</sup> перцентиль)	4 (2,5, 6,0)
Тип течения заболевания на момент включения, n (%):	
i. РРРС	i. 36/54 (77%)
ii. ВПРС	ii. 12/54 (22%)
iii. ППРС	iii. 6/54 (11%)

Примечание: EDSS – расширенная шкала инвалидизации (Expanded Disability Status Scale); IQR – межквартильный размах; РРРС – рецидивирующе-ремиттирующее течение; ВПРС – вторично-прогрессирующий рассеянный склероз; ППРС – первично-прогрессирующий рассеянный склероз

Все пациенты с РРРС и ВПРС на момент включения в исследование получали только стандартную иммуномодулирующую терапию препаратами, модифицирующими течение рассеянного склероза (ПИТРС) 1ой линии (глатирамера ацетат или интерфероны бета).

### 2.2.2 Исследование связи лептоменингеального воспаления с изменениями состава субпопуляций лимфоцитов в крови и цитокинов цереброспинальной жидкости при рассеянном склерозе

Данное исследование было предпринято с целью провести сравнительную характеристику профиля субпопуляций В-лц периферической крови у пациентов с ЛОКУС и без них, а также изучить взаимосвязи лимфоцитов периферической крови с показателями интратекального воспаления у ЛОКУС-позитивных и ЛОКУС-отрицательных пациентов.

Исследование носило кросс-секционный дизайн с ретроспективным анализом данных. В исследование приглашались пациенты с рассеянным склерозом, для которых в биобанке ГЦРС имелись образцы цереброспинальной жидкости.

Критерии включения для этого исследования были следующими:

1. пациенты с диагнозом РРРС, ВПРС или ППРС в соответствии с критериями McDonald 2010;
2. возраст: 18-65 лет, включительно;
3. Наличие добровольного информированного согласия;
4. Согласие на сдачу крови из периферической вены.

Критерии невключения были следующими:

1. предшествующая цитотоксическая терапия (например, митоксантрон),

2. предшествующая терапия моноклональными антителами и агентами, вызывающими В-клеточную деплецию (ритуксимаб, алемтузумаб и другие моноклональные антитела),
3. обострение РС и/или применение пульс-терапии глюкокортикоидными препаратами в течение 30 дней, предшествующих включению в исследование.
4. Клинически значимые нарушения работы почек
5. Наличие противопоказаний для выполнения МРТ головного мозга (например, металлические магнитные импланты или водители ритма, аллергия на контрастное вещество)

На этапе включения были собраны подробные данные анамнеза, проведен неврологический осмотр. Далее проводилась МРТ головного мозга по специальному протоколу. Группа наивных к терапии пациентов с РС (наивных) была отобрана для сравнения с основными популяциями ЛОКУС+ и ЛОКУС- для исключения влияния терапии ПИТРС на концентрации клеток. Группа здорового контроля была представлена пациентами без неврологической или аутоиммунной патологии и отобрана для сравнительного анализа концентраций субпопуляций лимфоцитов у пациентов с РС по сравнению со здоровыми людьми. Дизайн исследования схематически представлен на Рисунке 2.

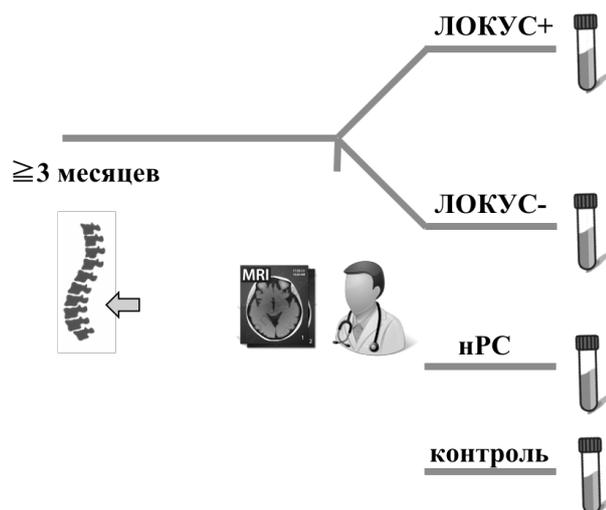


Рисунок 2 – Дизайн исследования 2.2.2. ЛОКУС – лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала; нРС – наивные к терапии пациенты с РС. В исследование были включены 52 пациента с РС и 20 здоровых доноров. МРТ

выполнялась части пациентов для определения ЛОКУС-статуса. После выполнения МРТ все пациенты были разделены на 4 группы: 1) 15 ЛОКУС-отрицательных пациентов с РС; 2) 22 ЛОКУС-положительных пациента с РС; 3) 15 наивных пациентов, не принимавших терапию ПИТРС (нРС), были включены в группу положительного контроля для оценки влияния терапии на субпопуляции лимфоцитов; 4) 20 неврологически здоровых донора, соответствующие по возрасту и полу пациентам групп 1 и 2. Пациенты из групп 1 и 2 получали одобренную терапию первой линии для РС (только интерферон-бета или глатирамера ацетат). Характеристики групп пациентов представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Демографические и клинические характеристики исследуемой популяции пациентов

Показатель	Группа 1 ЛОКУС- негативные, n=17	Группа 2 ЛОКУС- позитивные, n=26	Группа 3 Контрольная группа, n=22	Группа 4 нРС, n=15
1	2	3	4	5
Возраст, среднее $\pm$ SD	40,53 $\pm$ 11,54	43,91 $\pm$ 12,69	44,05 $\pm$ 2,645	30,5 $\pm$ 11,24* $\ddagger$ †
Пол (женский), n (%)	10/17 (58%)	16/26 (61%)	11/22 (50%)	9/15 (60%)
Фенотип заболевания	PPPC – 14/17 (82%); ПРС – 3/17 (18%)	PPPC – 17/26 (65%); ПРС – 9/26 (35%)		PPPC – 14/15 (93%); ПРС – 1/15 (7%)
Медиана продолжитель ности заболевания (IQR), месяцы	65 (124) **	73 (169,5) ***		14 (40)

1	2	3	4	5
Медиана продолжительности терапии (IQR), месяцы	21 (51)	16 (68)		Не применимо
Тип терапии ПИТРС	ИФН β – 10/17 (59%), ГА – 7/17 (41%)	ИФН β – 15/26 (58%), ГА – 10/26 (38%), 1/26 (4%) – не получал		Не применимо
Медиана балла EDSS (25 <sup>th</sup> - 75 <sup>th</sup> квартиль)	3,0 (3-4) ‡‡	3,75 (2-6) ††		1.5 (1-3)

Примечание: ИФН β – интерферон бета; ГА – глатирамера ацетат. ЛОКУС – лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала; нРС – пациенты с РС, наивные к терапии ПИТРС; ПИТРС – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза; EDSS – расширенная шкала инвалидизации. \* - ЛОКУС-негативные vs нРС:  $p=0,0223$ ; ‡ - ЛОКУС-позитивные vs нРС; нРС vs контрольная группа:  $p=0,0024$ ; † - контрольная группа vs нРС,  $p<0,0001$ ; \*\* - ЛОКУС-негативные vs нРС:  $p = 0,0048$ ; \*\*\* - ЛОКУС-позитивные vs нРС:  $p = 0,0029$ ; ‡‡ - ЛОКУС-негативные vs нРС:  $p = 0,0021$ ; †† - ЛОКУС-позитивные vs нРС:  $p = 0,0042$

Для всех пациентов с РС оценка балла EDSS осуществлялась сертифицированным неврологом во время посещения, на котором были забраны образцы крови. Объем очагового поражения на МРТ и количество контрастных очагов на T1 ВИ были рассчитаны на дату выполнения МРТ, которая выполнялась не более чем за 1 месяц с момента взятия крови.

### 2.2.3 Проспективное 2х-летнее исследование динамики МРТ-показателей лептоменингеального воспаления у пациентов с рассеянным склерозом

Проведено проспективное неинтервенционное исследование для оценки динамики количества ЛОКУС в течение 2 лет.

Цель исследования: изучить динамику количества ЛОКУС у пациентов с рассеянным склерозом в течение 2 лет.

Критерии включения в исследование:

1. Наличие письменного информированного согласия;
2. Возраст пациентов 18-55 лет включительно;
3. Больные обоего пола с достоверным диагнозом рассеянного склероза (в соответствии с критериями МакДональда, 2010)

- с рецидивирующее - ремитирующим течением

- с вторично-прогрессирующим течением

- с первично-прогрессирующим течением

4. Готовность следовать указаниям лечащегося врача, являться в срок в исследовательский центр для проведения процедур исследования.

Критерии невключения в исследование:

1. Предшествующая или планируемая терапия химиотерапевтическими препаратами (например, митоксантрон);

2. Предшествующая или планируемая терапия препаратами, направленными против молекулы CD-20 и других поверхностных маркеров В-лимфоцитов (например, ритуксимаб);

3. Беременность на этапе отбора или желание зачать ребенка в процессе исследования;

4. Клинически значимые нарушения работы почек;

5. Наличие противопоказаний для выполнения МРТ головного мозга (например, металлические магнитные импланты или водители ритма, аллергия на контрастное вещество).

После подписания информированного согласия пациенты выполняли МРТ головного мозга по специальному протоколу для определения ЛОКУС. Повторные исследования выполнялись на визитах через 12 и 24 месяца.

Всего в исследование было включено 30 пациентов. Демографические данные пациентов представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Демографические и клинические характеристики исследуемой популяции пациентов (n=30)

Показатель	Значения
% женщин	17/30 (57%)
Возраст на момент включения, лет, среднее $\pm$ SD	40,5 $\pm$ 13,4
Длительность заболевания, годы, среднее $\pm$ SD	7,9 $\pm$ 6,6
Тип течения РС, - РРРС - ВПРС - ППРС	- 20/30 (67%) - 8/30 (27%) - 2/30 (7%)
Медиана балла (IQR) EDSS на момент обследования, баллы	3,25 (3,125)
Терапия ПИТРС	ИФН бета: 18/30 (60%); ГА: 12/30 (40%)

Примечание: Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  SD, если не указано иное; EDSS – расширенная шкала инвалидизации (Expanded Disability Status Scale); РРРС – рецидивирующе-ремиттирующее течение РС; ВПРС – вторично-прогрессирующее течение РС; ППРС – первично прогрессирующее течение РС; ИФН бета – интерферон бета; ГА – глатирамера ацетат

#### 2.2.4 Исследование связи МРТ-показателей лептоменингеального воспаления с риском развития нейродегенерации и прогрессирования инвалидизации при рассеянном склерозе

Проведено когортное проспективное неинтервенционное исследование, проводимое в параллельных группах по оценке влияния ЛОКУС на показатели инвалидизации и нейродегенерации.

Цель исследования: изучить влияние ЛОКУС на риск подтвержденного прогрессирующего инвалидизации и атрофии головного мозга.

Для достижения данной был поставлен ряд задач:

1. Определить, влияет ли наличие ЛОКУС на этапе отбора на риск и скорость прогрессирующего инвалидизации при проспективном наблюдении за 24 месяца;
2. Изучить влияние ЛОКУС на скорость атрофии головного мозга и объемы отдельных его структур в разные временные точки;
3. Определить влияние ЛОКУС на показатели клинико-радиологической активности за 2 года;
4. Выявить количество пациентов, отвечающих критериям No Evident Disease Activity (NEDA)–3 через 2 года в группе ЛОКУС-позитивных и ЛОКУС-негативных.

Данное исследование было одобрено ЛЭК ПСБГМУ им. И.П.Павлова. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Всем пациентам было предоставлено достаточно времени, чтобы прочесть согласие, осознать и подписать его.

Критерии включения в исследование:

- Наличие письменного информированного согласия;
- Возраст пациентов 18-55 лет включительно;
- Больные обоего пола с достоверным диагнозом рассеянного склероза (в соответствии с критериями МакДональда, 2010) с рецидивирующее - ремитирующим течением, с вторично-прогрессирующим течением и первично-прогрессирующим течением
- Готовность следовать указаниям лечащегося врача, являться в срок в исследовательский центр для проведения процедур исследования.

Критерии невключения в исследование:

- Предшествующая или планируемая терапия химиотерапевтическими препаратами (например, митоксантрон)

- Предшествующая или планируемая терапия препаратами, направленными против молекулы CD-20 и других поверхностных маркеров В-лимфоцитов (например, ритуксимаб)
- Беременность на этапе отбора или желание зачать ребенка в процессе исследования
- Наличие противопоказаний для выполнения МРТ головного мозга (например, металлические магнитные импланты или водители ритма, аллергия на контрастное вещество)

Для участия в исследовании приглашались пациенты Городского Центра рассеянного склероза, получающие стандартную терапию ПИТРС.

Все пациенты, включенные в исследование и подписавшие информированное согласие, выполняли МРТ на исходном визите (Месяц 0). ЛОКУС определяли 2 независимых оценщика с опытом в оценке МРТ, заслепленные от клинических данных. Пациенты были распределены в группы ЛОКУС-позитивных и ЛОКУС-негативных.

На исходном визите проводилось полное неврологическое обследование, собирались данные анамнеза. Дальнейшие промежуточные визиты в ГЦРС происходили 1 р/3 месяца. МРТ выполнялась на контрольных визитах Месяц 12 и Месяц 24.

Все пациенты проходили регулярное диспансерное наблюдение в ГЦРС с частотой 1 р/3 месяца, в ходе которого производилась оценка неврологического статуса, оценка статуса по шкале EDSS, назначалась или корректировалась схема терапии ПИТРС, фиксировались обострения.

Прогрессирование инвалидизации, подтвержденное в течение 3х месяцев (3м-ППИ) было рассчитано, если балл EDSS пациента увеличивался выше порогового значения и стойко сохранялся в течение как минимум 3 месяцев (Karpos L. et.al., 2018). Процедура фиксации этого показателя состояла из 3 стадий.

1. Оценка базового уровня EDSS. Всем пациентам проводилась оценка базового уровня EDSS на момент включения в исследование. За время наблюдения могли происходить обострения РС. Повторная оценка базового

уровня EDSS (референтное значение) проводилась на первом визите, проведенном  $\geq 30$  дней с момента начала последнего обострения.

2. Начальное прогрессирующее инвалидизации (НПИ) считалось при нарастании балла EDSS по сравнению с референтным значением. Для пациентов с баллом EDSS  $< 5,5$  баллов клинически значимым считалось нарастание EDSS на 1 балл, для пациентов с баллом EDSS  $\geq 5,5$  б - нарастание на 0.5 балла. При этом, между оценкой референтного значения и НПИ не должно было быть обострений РС.
3. 3-месячное ППИ фиксировалось, если на повторном осмотре, проведенном не ранее, чем через 3 месяца от НПИ, сохранялось нарастание балла EDSS выше референтного значения. При этом, за 30 дней до и 30 дней после визита не должно было происходить обострений РС. Методика определения 3м-ППИ представлена на Рисунке 3.

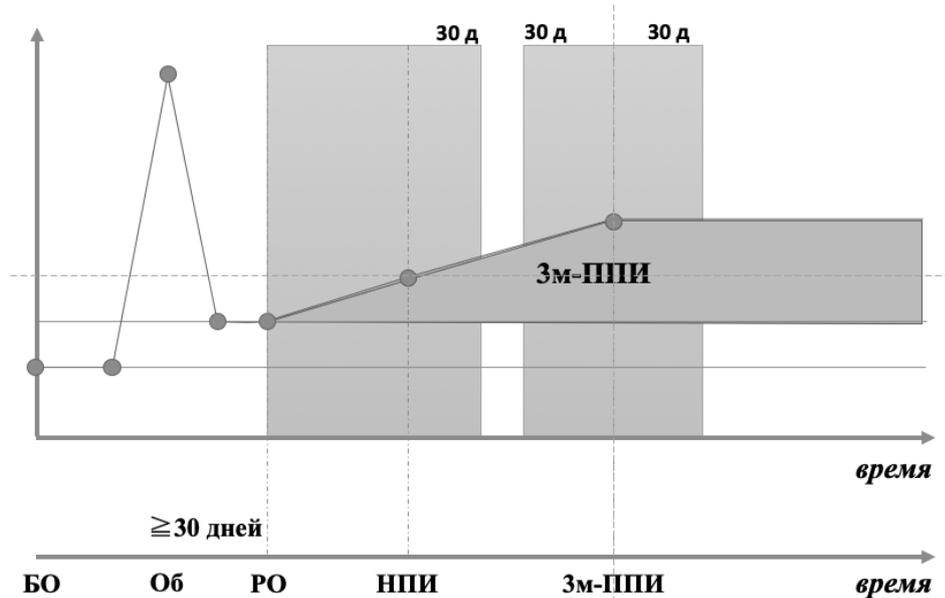


Рисунок 3 – Методика оценки 3м-ППИ. БО – базовая оценка; Об – обострение; РО – оценка референтного значения; НПИ – начальное прогрессирующее инвалидизации; 3м-ППИ – 3-месячное подтвержденное прогрессирующее инвалидизации

Дизайн исследования графически представлен на Рисунке 4.

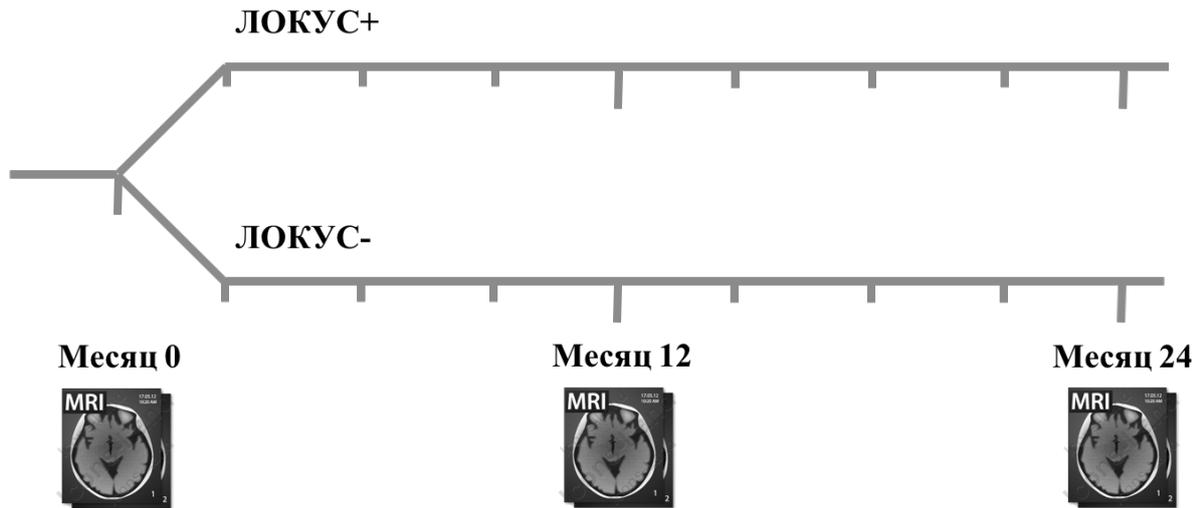


Рисунок 4 – Дизайн исследования 2.2.4.

Примечание: ЛОКУС-лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала

Данное исследование имело следующие конечные точки:

Первичная конечная точка исследования: Доля пациентов, достигших подтвержденного 3-месячного прогрессирования инвалидизации через 2 года в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с группой ЛОКУС-негативных;

Вторичные конечные точки исследования:

- Балл EDSS через 24 месяца в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с ЛОКУС-негативными;
- Среднегодовая частота обострений через 24 месяца в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с ЛОКУС-негативными;
- Количество контрастных очагов в режиме T1 на МРТ ГМ через 12 месяцев в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с ЛОКУС-негативными;
- Время достижения подтвержденного 3-месячного прогрессирования инвалидизации через 24 месяца в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с группой ЛОКУС-негативных;
- Доля пациентов, кому потребовалась эскалация терапии на ПИТРС 2ой линии в течение 24 месяца с момента включения в исследование в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с группой ЛОКУС-негативных;

- Доля пациентов, достигших критерия No Evidence of Disease activity (NEDA-3) через 24 месяца в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с группой ЛОКУС-отрицательных;
- Объем структур головного мозга через 12 месяцев в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с ЛОКУС-отрицательными;
- Объем структур головного мозга через 24 месяца в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с ЛОКУС-отрицательными;
- Процент изменения объема головного мозга (Percentage of brain volume change, PBVC) через 24 месяца в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с группой ЛОКУС-отрицательных;
- Объем очагового поражения белого вещества по данным 3D FLAIR в динамике через 12 месяцев в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с группой ЛОКУС-отрицательных;
- Объем очагового поражения белого вещества по данным 3D FLAIR в динамике через 24 месяца в группе ЛОКУС-положительных по сравнению с группой ЛОКУС-отрицательных;

Всего в исследование было включено 62 пациента. Демографические данные пациентов представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Демографические и клинические характеристики исследуемой популяции пациентов (n=62)

Показатель	Значения
1	2
% женщин	35/62 (56%)
Возраст на момент включения, лет, среднее $\pm$ SD	38,9 $\pm$ 12,06
Длительность заболевания, годы, среднее $\pm$ SD	88,5 $\pm$ 94,01
Тип течения РС, - РПРС - ВПРС - ППРС	- 47/62 (76%) - 12/62 (19%) - 3/62 (5%)

Продолжение таблицы 4

1	2
Медиана балла (IQR) EDSS на момент обследования, баллы	3 (2,5)
Терапия ПИТРС не момент включения в исследование	ИФН бета: 38/62 (61%); ГА - 24/62 (39%)

Примечание: Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  SD, если не указано иное; EDSS – расширенная шкала инвалидизации (Expanded Disability Status Scale); РРРС – рецидивирующе-реммиттирующее течение РС; ВПРС – вторично-прогрессирующее течение РС; ППРС – первично прогрессирующее течение РС; ИФН бета – интерферон бета; ГА – глатирамера ацетат

На результаты исследования могли повлиять 4 возможных источника систематических ошибок: ошибки отбора, ошибка классификации, потеря для дальнейшего наблюдения, статус воздействия.

Ошибки отбора могут быть обусловлены относительно широкими критериями включения. Поскольку на сегодняшний момент не установлена субпопуляция, для которой характерно появление ЛОКУС, в исследование включались пациенты с разным течением и длительностью заболевания. Количество пациентов, имеющих высокие шансы на прогрессирование РС в течение 2 лет может отличаться от реальной популяции. В нашем исследовании наблюдалось относительно большое количество участников более 40 лет, с прогрессирующими типами течения (ВПРС и ППРС). Это могло повысить вероятность наступления инвалидизации. В исследование также включались пациенты, только начинающие терапию в течение первого года заболевания. Включение молодых и недавно заболевших пациентов внесло разнообразие в выборку, однако снизило риск достижения конечной точки исследования и выявления ЛОКУС.

Ошибка классификации – неверное определение ЛОКУС. Точных критериев определения ЛОКУС на сегодняшний момент не разработано. Мы использовали критерии, выведенные в оригинальной статье Absinta с соавт. (Absinta M. et.al., 2015). Опыт 2х-летнего наблюдения позволил доработать предложенные критерии и сформулировать их в нашей оригинальной трактовке (см.ниже).

Потеря для дальнейшего наблюдения. Часть пациентов прекращала наблюдение в исследовании по разным причинам: невозможность выполнить МРТ, трудности транспортировки, отказ от продолжения исследования и т.д.

## 2.3 Инструментальные и лабораторные методы обследования

### 2.3.1 Протокол магнитно-резонансной томографии

Протокол исследования был адаптирован из первоначального исследования Absinta M. с соавт. (Absinta M. et.al., 2015).

Исследование проводилось на томографе General Electric (GE) Signa (General Electric Healthcare, Milwaukee, WI) с напряженностью магнитного поля 3 Тесла в Научно-методическом центре “Томография” клиники “Скандинавия”. Использовались следующие настройки томографа: производитель: General Electric; model discovery: 750 w; receive channels: 24; sequence name: CUBE; imaging plane: sagittal; imaging resolution (mm):  $1 \times 1 \times 1$ ; repetition time (TR, ms): 6500; echo time (TE, ms): 90; inversion time (TI, ms): 1956; ip angle (deg): 90; echo-train length: 140; bandwidth (Hz/pixel): 122; acquisition time (min:sec): 9:00. В ходе исследования применялись следующие импульсные последовательности (ИП): 3D T1, 3D T2, 3D Fluid attenuated inversion recovery (FLAIR), 3D двойная инверсия-восстановление (Double Inversion- recovery (DIR)). Сразу после введения 0.1 ммоль/кг контрастного вещества (гадобутрол («Гадовист»), Bayer AG, Leverkusen, Germany) проводилось исследование с помощью ИП T1, а через 10 минут после введения – в ИП FLAIR. Последняя ИП применялась для определения лептоменингеальных очаг контрастного усиления МР-сигнала (ЛОКУС). Изображения FLAIR до введения контраста были получены для всех пациентов для сравнения и оценки наличия/отсутствия ЛОКУС.

Просмотр изображений производился в специальной программе OsirixViewer (<http://www.osirix-viewer.com>) в аксиальной и сагитальной плоскостях. Наличие

ЛОКУС определялось опытным радиологом с более чем 10-летним опытом работы и опытным неврологом, специализирующимся на изучении РС, по взаимному соглашению. Данные клинического течения и лабораторных исследований были заслеплены для оценивающих специалистов, чтобы не допустить предвзятости в оценке. Все разночтения устранялись путем обсуждения и согласования.

Присутствие ЛОКУС на снимках 3D FLAIR-постконтраст считалось достоверным при наличии усиления сигнала в субарахноидальном пространстве, отличающегося по интенсивности от сигнала паренхимы мозга. Далее исследовался аналогичный участок в ИП FLAIR до введения контраста. Если усиления сигнала в аналогичном участке до введения контраста не определялось, зона усиления сигнала расценивалась как ЛОКУС. Для ЛОКУС также оценивались количество, локализация и наличие усиления сигнала в этой зоне на T1-контрастом изображении. Из анализа исключались области, лежащие близко к крупным кровеносным сосудам и венозным синусам головного мозга. К этому критерию также отнесены области межполушарной щели, где часто фиксировались проекции крупных сосудов с небольшими зонами накопления контраста на FLAIR ВИ. По нашему мнению, данный феномен патогенетически не связан с лептоменингеальным воспалением. Также исключались области, которые имели аналогичный по интенсивности сигнал на T1-постконтраст. Данное требование введено во избежание фиксации ЛОКУС в зонах сосудистых ангиом или локальных расширений крупных сосудов. Зоны накопления контраста, расположенные в твердой мозговой оболочке, не учитывались.

При морфометрическом исследовании основных структур ЦНС был рассчитан нормализованный объём головного мозга (НОМ) и белого вещества (НОБВ) при помощи полностью автоматизированной морфометрической методики под названием SIENAX, которая является частью программного пакета FSL (<https://fsl.fmrib.ox.ac.uk>). Объёмы представлены в мм<sup>3</sup>. SIENAX рассчитывает общий объём головного мозга, полученный из одного изображения, нормализованного по размеру черепа. Работа модуля SIENAX включает активацию нескольких программ FSL: сначала происходит извлечение мозга и отделение его от

окружающих тканей и черепа с помощью специального модуля Brain Extraction Tool (BET), затем программа использует данные черепа и мозга для нормирования размеров мозга относительно стандартного размера – условного изображения головного мозга по Монреальскому Неврологическому Институту (Montreal Neurological Institute, MNI-152). Далее происходит процедура сегментации – картирования и выделения участков головного мозга, умножая их размер на величину фактора нормализации, чтобы уменьшить вариабельность размеров головного мозга. Итоговые показатели представляются как нормализованный объем головного мозга, нормализованный объем серого и белого вещества. Для коррекции показателей по объему очагового поражения все гиперинтенсивные очаги были предварительно исключены из анализа путем наложения специальной маски, созданной с помощью приложения Lesion Segmentation Tool (LST, см. ниже) Скорость атрофии головного мозга была рассчитана с помощью полностью автоматизированного пакета SIENA, часть программы FSL. SIENA – это пакет программ для проспективной оценки атрофии (потери вещества головного мозга) между двумя точками. Метод SIENA используется в большинстве клинических исследований при рассеянном склерозе и позволяет детектировать изменения объема до 1% и менее. Это делает данный модуль достаточно точным, чтобы с его помощью делать выводы о годовом изменении объема головного мозга, которое у пациентов с РС достигает 0.5-1.5%/год при нормальной скорости атрофии до 0.4%/год (De Stefano N. et.al., 2019). SIENA измеряет процент изменения объема головного мозга между двумя изображениями. Программа использует несколько дополнительных подпрограмм для отделения головного мозга от прочих тканей и черепа, регистрации двух изображений головного мозга (используя размер черепа для нормализации объема внутричерепного пространства и минимизации вариабельности между изображениями).

Дополнительно применялся анализ с помощью программного пакета FreeSurfer (<http://freesurfer.net>) для расчета объемов нормализованного объема серого вещества (НОСВ), объема коры, подкоркового серого вещества,

желудочков, ствола мозга и гипоинтенсивных очагов на T1 взвешенном изображении (ВИ) («черные дыры»).

Для определения объемов очагового поражения белого и серого вещества методом полу-автоматического подсчета использовалась программа Slicer 4D (<https://www.slicer.org>). Данная методика применялась для кросс-секционного исследования, так как обладает достаточно высокой точностью определения очаговых изменений. Существенным минусом данной методики является необходимость ручной коррекции, что является крайне ресурсоемким процессом, а также подвержено риску субъективной оценки и может зависеть от оценщика. Для проспективной оценки изменения очаговых процессов использовалась методика Lesion Segmentation Tool (LST) программного пакета Statistical Parametric Mapping (SPM, <https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). Этот метод позволяет оценивать объем очаговых изменений полностью автоматически, однако не способен оценить объем поражения серого вещества по ИП DIR. В качестве исходных изображений использовались ИП T2 и FLAIR.

### 2.3.2 Лабораторные исследования

Образцы ликвора и сыворотки забирались для анализа у пациентов, включенных в исследование, в момент проведения дифференциальной диагностики РС. Интервал между временем забора анализов и выполнением МРТ в исследовании 3.2.1. составлял не более 6 месяцев, для исследования 3.2.2. – не более 3 месяцев. Все образцы ликвора и сыворотки крови после забора, центрифугирования и аликвотирования хранились при температуре - 80 градусов.

Определение ОП-IgG проводилось методом изоэлектрофокусирования в агарозном геле с последующим иммуноблоттингом сравниваемых парных образцов сыворотки и ЦСЖ. Анализ результатов проводился на основании международных рекомендаций (Freedman M. et.al. 2005). Анализ считался положительным, если в образце ликвора присутствовали две или более ОП-IgG при их отсутствии в парной

сыворотке. Метод изоэлектрофокусирования (ИЭФ) на данный момент является «золотым стандартом» лабораторной диагностики РС и признан большинством международных экспертов (Freedman M. et.al. 2005).

У всех пациентов было проведено определение концентрации каппа СЛЦ в ЦСЖ (К-СЛЦцсж). Для определения СЛЦ использовались наборы ИФА производства ООО «Полигност» (Санкт-Петербург, РФ). Исследование проводилось в соответствии с инструкцией производителя.

Уровень ВАFF и CD40L в ЦСЖ и сыворотке крови определяли с помощью ИФА (UmanDiagnostics AB) в соответствии с рекомендациями производителей. Образцы неразбавленной ЦСЖ исследовали в двух экземплярах и заслепляли от клинических данных. Исследование было выполнено в одном центре (лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний ПСПбГМУ им.И.П.Павлова) заслепленным от клинических данных оценщиком.

Анализ субпопуляций и клинический анализ крови проводились в день забора крови в лаборатории иммунологии Института Экспериментальной Медицины. Для фенотипирования В-клеток мы использовали технику, основанную на экспрессии трех основных поверхностных антигенов - IgD, CD38 и CD27. Субпопуляции В-клеток были описаны на основе различных поверхностных маркеров: IgD, CD38 и CD27. Выделены следующие субпопуляции В-лц: 1) непереключенные В-клетки (CD19+IgD+); 2) переключенные В-клетки (CD19+IgD-); 3) Фолликулярные В-клетки/клетки маргинальной зоны (CD19+IgD+CD38+); 4) центроциты герминативного центра (CD19+IgD-CD38+) 5) плазмабласты (CD19+CD27++CD38++); 6) В клетки памяти (CD19+CD27+). Фенотипирование периферических В-лц производилось с помощью анти-человеческих CD45-Krome Orange (клон J33, кат. В36294, Beckman Coulter, США) и CD19-APC-AF700 (клоне J3-119, кат. А78837, Beckman Coulter, США) антител. Дополнительно, В-клетки были помечены анти-человеческими антителами к поверхностному IgD (клон IA6-2, кат. В30652, Beckman Coulter, США), CD38 (clone LS198-4-3, кат. А07779, Beckman Coulter, США), CD27 (клон 1A4CD27, кат. А54823, Beckman Coulter, США), конъюгированными с FITC, ECD, PE и PC7,

соответственно. Окрашивание проводилось в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки окрашивались антителами в темном помещении при комнатной температуре в течение 15 минут. Эритроциты в образцах крови были лизированы с помощью добавления 975 мкл раствора VersaLyse к 25 мкл IOTest 3 фиксирующего раствора (оба - Beckman Coulter, США, кат. A09777 and A07800, respectively). После этого клетки однократно промывались 4 мл нейтрального фосфатного буферного раствора и центрифугированы при 330g в течение 7 минут. После промывания буферным раствором, клетки обрабатывались 250 фосфатного буфера с добавлением 2% нейтрального формалина (кат. HT5011-1CS, Sigma-Aldrich Co., USA). Данные проточной цитометрии были получены на цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США), оборудованного лазерными диодами с длиной волны 405-, 488- и 638-нм и анализированы с помощью Navios Software v.1.2 и Kaluza™ software v.1.2 (Beckman Coulter, США).

#### 2.4 Статистические методы анализа данных исследования

Статистическая обработка результатов была проведена с помощью программы GraphPad Prism 7 («GraphPad Software Inc.», США), IBM SPSS Statistics (IBM, США) и Statistica 13 (Statsoft). Полученные данные удовлетворяли условиям для проведения статистического анализа. Для проверки распределения на нормальность был использован тест Колмогорова – Смирнова, Шапиро-Уилка. Для сравнения 2х нормально распределенных значений использовался критерий t Стьюдента, при ненормальном распределении использовался U-критерий Манна-Уитни. Качественные переменные были проанализированы с помощью точного критерия Фишера.

Сравнение показателей атрофии в группах ЛОКУС-позитивных и ЛОКУС-негативных пациентов производилось с помощью ковариантного анализа (ANCOVA), скорректированного по возрасту, полу и длительности течения заболевания. Данный анализ применялся при кросс-секционном исследо-

вании и для анализа показателей в каждый год наблюдения в проспективном исследовании.

Множественные сравнения субпопуляций лимфоцитов производились с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферони на множественные сравнения. Корреляционный анализ проводился с помощью непараметрического  $\gamma$ -критерия Спирмена.

Анализ изменений показателей при проспективном наблюдении производился с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для попарного сравнения показателей. В зависимости от типа распределения использовался тест Фридмана (при ненормально распределенных группах) или однофакторная ANOVA с поправкой Geisser-Greenhouse на сферичность (при нормально распределенных показателях). В качестве исходного значения использовались показатели на этапе включения в исследование. Применялась поправки Dunn и Dunnett на множественные сравнения.

Для оценки времени достижения 3м-ППИ в группах ЛОКУС-позитивных и ЛОКУС-негативных использовался анализ выживаемости Каплана-Мейера. Выбывшие в процессе исследования пациенты цензурировались. Для проверки статистических гипотез использовался критерий Уилкоксона в обобщении Бреслоу.

Для комплексной оценки влияния ЛОКУС на достижение 3м-ППИ была разработана модель регрессионного анализа пропорциональных рисков Кокса. Время до 3м-ППИ было использовано как время до события (выживания). Выбывшие пациенты не включались в анализ. Значения, распределенные ненормально были логарифмированы ( $\log_{10}$ ). Изначально оценивалось влияние каждого из факторов, имеющих теоретические предпосылки к влиянию на прогрессирование инвалидизации: возраст, длительность заболевания, EDSS на исходном визите, среднегодовая частота обострений, нормализованный объем мозга, нормализованный объем белого вещества, нормализованный объем серого вещества, нормализованный объем желудочков. Влияние ЛОКУС оценивалось как кофактор. После оценки влияния каждой из ковариат для оценки комплексного

влияния была построена многофакторная регрессионная модель, включавшая факторы, оказывающие влияние на исход. Дополнительно в модель включалось наличие/отсутствие ЛОКУС в качестве ко-фактора. Был использован метод пошагового исключения для определения значимых предикторов.

Для оценки влияния ЛОКУС на исход и темпы нейродегенерации, была использована общая линейная модель (General Linear Model, GLM), включавшая все интересующие ковариаты и кофакторы: пол, возраст на момент МРТ и наличие/отсутствие ЛОКУС.

Нулевая гипотеза отклонялась при  $p < 0,05$ . Все критерии значимости были двусторонними. Данные представлены в зависимости от типа распределения как среднее (стандартное отклонение) или как медиана (межквартильный размах (IQR) или в виде: 25<sup>ый</sup>-75<sup>ый</sup> перцентиль).

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Исследование встречаемости лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала и их связи с клинико-радиологическими и лабораторными показателями при рассеянном склерозе

#### Клинико-демографические характеристики групп

Исследование в импульсной последовательности 3D FLAIR после введения контраста было проведено всем участникам исследования. По результатам МРТ, пациенты были разделены на 2 группы: ЛОКУС-негативные (32/54, 59%) и ЛОКУС-позитивные (22/54, 41%) пациенты. Был проведен сравнительный анализ демографических, клинических, радиологических и лабораторных показателей групп.

Пациенты женского пола чаще встречались в подгруппе ЛОКУС-позитивных пациентов, однако разница не была статистически значимой ( $p = 0,2615$ ). Медиана (IQR) возраста ЛОКУС-позитивных пациентов составила 44,5 (22) лет, ЛОКУС-негативных – 36,5 (24,25),  $p=0,071$ . Медиана (IQR) длительности течения РС составила 111 (156,25) месяцев для ЛОКУС-позитивных и 70,5 (123,05) месяцев для ЛОКУС - негативных,  $p=0,0098$ . Для анализа связи ЛОКУС с типом течения РС, пациенты с ВПРС и ППРС были объединены в 1 группу – прогрессирующий РС (ПРС). Для пациентов с РПРС было более характерно отсутствие ЛОКУС (75% ЛОКУС-негативных против 25% ЛОКУС-позитивных), однако у пациентов с прогрессирующим вариантом течения встречаемость ЛОКУС была примерно одинаковой (45,4% ЛОКУС-негативных против 54,6% ЛОКУС-позитивных). Для ЛОКУС-позитивных пациентов было характерно нарастание встречаемости ЛОКУС при увеличении длительности течения заболевания: 0-4 года – 26%, 5-9 лет – 40%, 10-19 лет – 46%, более 20 лет – 71%. Обратная картина наблюдалась в группе ЛОКУС - негативных: 0-4 года – 74%, 5-9 лет – 60%, 10-19 лет – 54%, более 20 лет

– 29%. Не было получено аналогичной зависимости от возраста начала заболевания.

Медиана (25<sup>ый</sup>, 75<sup>ый</sup> перцентиль) балла EDSS в группе ЛОКУС-позитивных пациентов составила 4,0 (3,25, 6,5) и была значимо выше, чем в группе ЛОКУС-негативных пациентов (3,75 (2,4, 4,5),  $p=0,039$ ). Индекс MSSS (медиана (25<sup>ый</sup>, 75<sup>ый</sup> перцентиль)) значимо не отличался между группами: ЛОКУС-негативные – 5,79 (4,32, 7,08), ЛОКУС-позитивные – 6,12 (3,62, 6,67),  $p=0,864$ . Не было получено разницы между группами по количеству обострений в течение 1 года и первых 5 лет течения заболевания ( $p=0,2362$ ,  $p=0,091$ , соответственно).

Количество контрастных очагов на T1 ВИ значимо не отличалось между подгруппами: ЛОКУС-негативные (медиана (IQR)) – 0 (0), ЛОКУС-позитивные (медиана (IQR)) – 0 (1),  $p=0,3842$ . Встречаемость очагов накопления контрастного вещества была одинаковой между подгруппами (50%). Данные подробно представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Характеристики групп пациентов в зависимости от наличия/отсутствия лептоменингеального контрастирования

Показатель	ЛОКУС - негативная группа, n = 32 (59%)	ЛОКУС - позитивная группа, n = 22 (41%)	Значение p
1	2	3	4
(n/N (%)) пациентов женского пола	18/32 (56%)	16/22 (73%)	0,2615*
Медиана (IQR) возраста на момент выполнения МРТ, лет	36,5 (24,25)	44,5 (22)	0,071
Медиана (IQR) продолжительности заболевания, месяцы	70,5 (123,05)	111 (156,25)	0,0098
Фенотип РС, n (%)			
- РРРС	24 (75%)	12 (25%)	0,148*
- ПРС	8 (45,4%)	10 (54,6%)	

1	2	3	4
Распространенность ЛОКУС в зависимости от длительности заболевания:			
- 0 – 4 лет	14 (74%)	5 (26%)	
- 5 – 9 лет	9 (60%)	6 (40%)	
- 10 – 19 лет	7 (54%)	6 (46%)	
≥ 20 лет	2 (29%)	5 (71%)	
Распространенность ЛОКУС в зависимости от возраста дебюта РС			
- до 19 лет	5 (71%)	2 (29%)	
- 20 – 29 лет	13 (59%)	9 (41%)	
- 30 – 39 лет	6 (67%)	3 (33%)	
- 40 – 49 лет	5 (50%)	5 (50%)	
≥ 50 лет	3 (50%)	3 (50%)	
Медиана балла EDSS (25 <sup>ый</sup> , 75 <sup>ый</sup> перцентиль)	3,75 (2,5, 4,5)	4 (3,25, 6,5)	0,039
Медиана индекса MSSS (25 <sup>ый</sup> , 75 <sup>ый</sup> перцентиль)	5,79 (4,32, 7,08)	6,12 (3,62, 6,67)	0,864
Медиана количества обострений в первый год заболевания (IQR)	2 (1)	1 (0,75)	0,2362
Медиана количества обострений в первые 5 лет заболевания (IQR)	2 (1)	2 (1)	0.091
Контрастные очаги на МРТ на T1 ВИ, n (%)			
- Определяются	7 (50%)	7 (50%)	0,5306*
- Не определяются	25 (62,5%)	15 (37,5%)	

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4
Медиана количества контрастных очагов на T1 ВИ (IQR)	0 (0)	0 (1)	0.3842
Позитивные по ОП-IgG n (%)	24 (88,9%)	13 (92,9%)	>0,9999*
Концентрация к-СЛЦЦСЖ, мкг/мл, среднее $\pm$ СО	0,88 $\pm$ 0,94	1,51 $\pm$ 0,89	0,136

Примечание: ЛОКУС- лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала; МРТ – магнитно-резонансная томография; РРРС – рецидивирующе-ремиттирующий рассеянный склероз; ПРС – прогрессирующий рассеянный склероз; EDSS – расширенная шкала инвалидизации; ВИ – взвешенное изображение; ОП-IgG – олигоклональные полосы; к-СЛЦЦСЖ – концентрации свободных легких цепей иммуноглобулинов типа каппа; л-СЛЦЦСЖ – концентрации свободных легких цепей иммуноглобулинов типа лямбда; СО – стандартное отклонение; IQR – межквартильный размах. \* для сравнения использовался точный критерий Фишера. Значимая разница выделена курсивом

### 3.1.2. Лабораторные данные

Среди ЛОКУС-негативных пациентов, у 24/27 (88,9%) определялись олигоклональные иммуноглобулины G. Близкая к этому встречаемость олигоклональных иммуноглобулинов определялась в подгруппе ЛОКУС-позитивных: 13/14 (92,9%),  $p > 0,9999$ . Концентрации СЛЦ иммуноглобулинов каппа (среднее  $\pm$  SD) в ЦСЖ в подгруппе ЛОКУС-негативных составила  $0,88 \pm 0,94$  мкг/мл и была в среднем ниже, чем в подгруппе ЛОКУС-позитивных –  $1,51 \pm 0,89$  мкг/мл, однако значимой разницы получено не было ( $p = 0,136$ ). Концентрации СЛЦ лямбда (среднее  $\pm$  SD) в ЦСЖ также значимо не отличались между подгруппами: ЛОКУС-негативные –  $0,45 \pm 1,14$  мкг/мл, ЛОКУС-позитивные –  $0,5 \pm 0,6$ ,  $p = 0,4097$  мкг/мл. Были определены концентрации цитокинов и хемокинов, влияющих на рост и активацию В- лц, а также биомаркеры нейродегенерации. Далее приведены значения их концентраций (среднее (SD)) для ЛОКУС-негативных и ЛОКУС-позитивных пациентов, соответственно: 1) sCD40 в ЦСЖ: 80,72 (39,9) нг/мл, 82,48

(57,61) нг/мл,  $p=0,5938$ ; 2) фактор, активирующий В-лц (BAFF) в ЦСЖ: 0,9014 (1,98) нг/мл; 0,5744 (0,5562) нг/мл,  $p=0,8024$ ; 3) гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) в сыворотке крови: 6,531 (12,28) пг/мл, 1,656 (2,053) пг/мл,  $p=0,2324$ ; 4) sCD40L в ЦСЖ: 42,65 (30,24) нг/мл; 50,67 (29,78) нг/мл,  $p=0,5678$ ; 5) легкие цепи нейрофиламентов в ЦСЖ: 173,4 (80,97) нг/л, 175,5 (95,37) нг/л,  $p=0,9446$ .

### 3.1.3. Анализ данных магнитно-резонансной томографии

При анализе 32 пациентов всего было выявлено 54 участка лептоменингеального накопления контрастного вещества. Примеры ЛОКУС представлены на Рисунке 5.

Число ЛОКУС варьировало от 1 до 7, среднее ( $\pm SD$ ) число ЛОКУС составило  $2 \pm 1,474$ . 31/54 (57%) участка имели точечную форму, 17/54 (32%) пластинчатую и 6/54 (11%) – линейную форму. Практически все участки (52/54 (96%)) были локализованы супратенториально и только 2/54 (4%) – инфратенториально. Супратенториальные участки определялись одинаково во всех гемисферах: 32/54 (59%) в левой и 20/54 (41%) в правой. Наиболее часто очаги располагались в глубине борозд (35/54 (65%)) и только 19/54 (35%) – на поверхности борозд. В 65% случаев в местах нахождения ЛОКУС определялось слабое усиление сигнала на постконтрастном T1 ВИ (см. Рисунок 5)

У ЛОКУС-негативных пациентов средний объем (SD) очагового поражения белого вещества, рассчитанного в ИП T2 и FLAIR, составил  $9,2 (7,7) \text{ мм}^3$ , а у ЛОКУС-позитивных пациентов  $13,6 (11,9) \text{ мм}^3$ , что не составляло значимую разницу ( $p=0,35$ ). Средний объем (SD) очагового поражения серого вещества, рассчитанного в ИП DIR составил  $1,6 (2,4) \text{ мм}^3$  для ЛОКУС-негативных и  $2,4 (4,3) \text{ мм}^3$  для ЛОКУС-позитивных, что также не составило значимую разницу ( $p=0,57$ ).

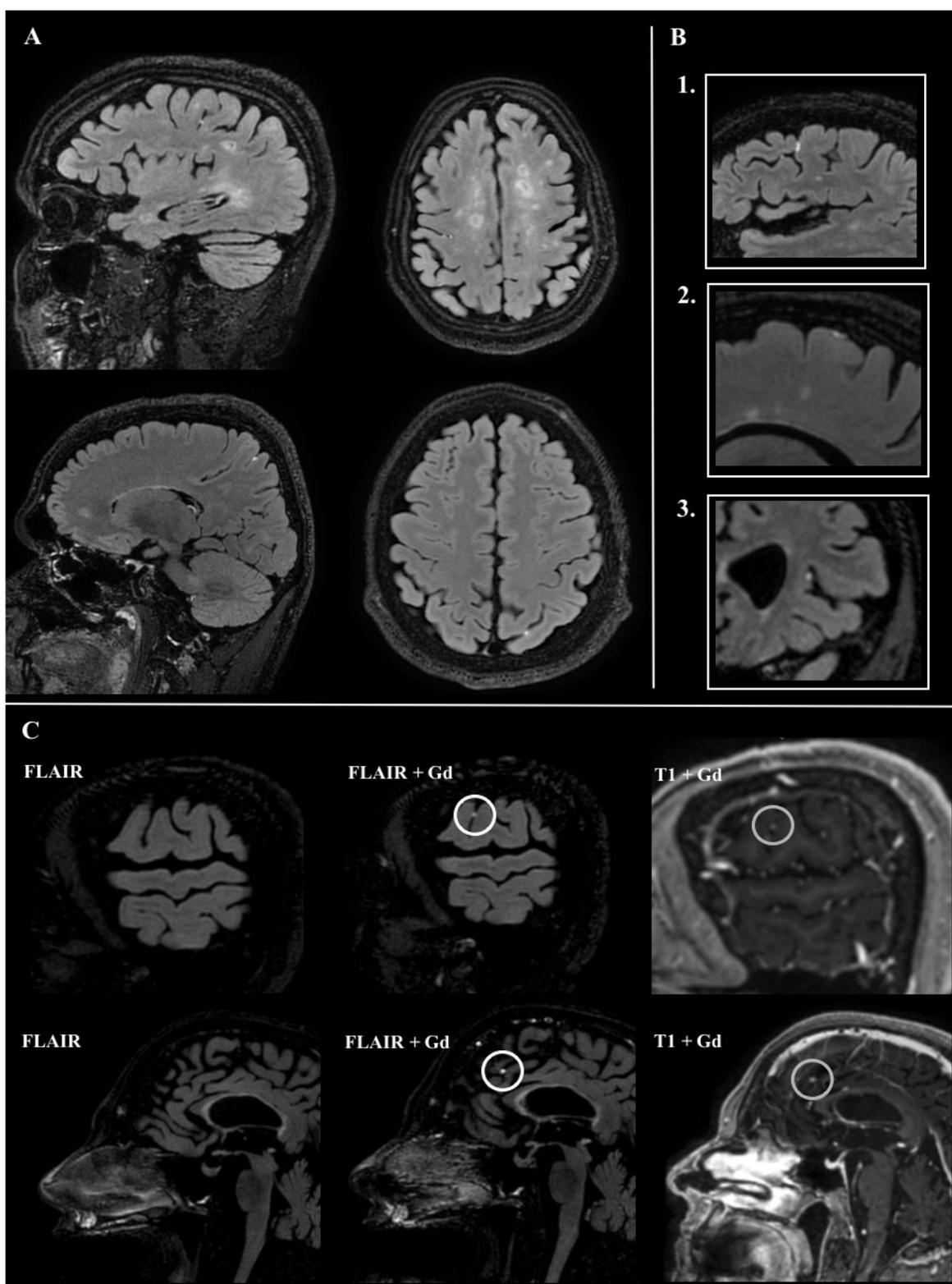


Рисунок 5 – Примеры и характеристики лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала. А – примеры расположения ЛОКУС; В – типы ЛОКУС по форме накопления контраста: 1 – пластинчатые, 2 – линейные, 3 – точечные; С – сравнение визуализации ЛОКУС при ИП FLAIR (ЛОКУС не определяются), постконтрастной FLAIR (визуализация ЛОКУС в сулькальном субарахноидальном пространстве) и постконтрастной T1 ВИ (трудно

дифференцировать ЛОКУС и внутрисосудистое усиление сигнала). Пациент П., 45 лет, рассеянный склероз, вторично-прогрессирующее течение (И/б 24825).

Был проведен морфометрический анализ структур головного мозга. У ЛОКУС-положительных пациентов по сравнению с ЛОКУС-негативными пациентами было выявлено значимое уменьшение объема коры головного мозга (среднее  $\pm$  SD:  $435,8 \pm 53,2$  vs  $452,1 \pm 48,9$ , соответственно,  $p = 0,043$ ,  $F = 2,529$ ), НОСВ (среднее  $\pm$  SD:  $582,4 \pm 67,2$  vs  $604,8 \pm 63,9$ , соответственно,  $p = 0,042$ ,  $F = 2,54$ ), увеличение общего объема желудочковой системы (среднее  $\pm$  SD:  $31,7 \pm 16,8$  vs  $23,2 \pm 8,9$ , соответственно,  $p = 0,039$ ,  $F = 2,605$ ), а также тренд к значимому уменьшению объема таламуса (среднее  $\pm$  SD:  $12,8 \pm 1,7$  vs  $13,4 \pm 1,6$ , соответственно,  $p = 0,05$ ,  $F = 2,428$ ). По всем остальным показателям не было показано значимых отличий между подгруппами. Данные расчетов представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Морфометрический анализ в зависимости от ЛОКУС-статуса

Показатель, структура головного мозга	ЛОКУС-негативная группа, n = 32 (59%), мм <sup>3</sup>	ЛОКУС-положительная группа, n = 22 (41%), мм <sup>3</sup>	Скорректированное значение p (эффект ЛОКУС)
1	2	3	4
НОМ	$1426,2 \pm 47,8$	$1389,8 \pm 82,9$	0,37
НОСВ	$604,8 \pm 63,9$	$582,4 \pm 67,2$	0,04
НОБВ	$678,6 \pm 29,6$	$658,1 \pm 44,4$	0,18
НОК	$452,1 \pm 48,9$	$435,8 \pm 53,2$	0,04
Объем желудочковой системы	$23,2 \pm 8,9$	$31,7 \pm 16,8$	0,04
Таламус	$13,4 \pm 1,6$	$12,8 \pm 1,7$	0,05
Хвостатое ядро	$6,5 \pm 1,5$	$6,6 \pm 0,8$	0,36
Скорлупа	$10,3 \pm 1,5$	$9,5 \pm 1,7$	0,23
Бледный шар	$2,7 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,4$	0,76
Гиппокамп	$8,1 \pm 1,2$	$7,8 \pm 1,3$	0,22

1	2	3	4
Ствол мозга	20,3 ± 2,4	19,6 ± 2,4	0,40
Гипоинтенсивные участки в белом веществе на T1 ВИ	4,6 ± 3,5	6,9 ± 4,9	0,27
Объем очагов в БВ	9,2 ± 7,7	13,6 ± 11,9	0,35
Объем очагов в СВ	1,6 ± 2,4	2,3 ± 4,3	0,57

Примечание: ЛОКУС – лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала; НОМ – нормализованный объем мозга; НОСВ – нормализованный объем серого вещества; НОБВ – нормализованный объем белого вещества; НОК – нормализованный объем коры; ВИ – взвешенное изображение; БВ – белое вещество; СВ – серое вещество. Данные представлены как среднее ± SD в миллилитрах. Значимые изменения выделены курсивом

### 3.2 Исследование связи лептоменингеального воспаления с изменениями состава субпопуляций лимфоцитов в крови и цитокинов цереброспинальной жидкости при рассеянном склерозе

Исследование посвящено изучению содержания различных субпопуляций В-клеток и фолликулярных Т-хелперов у больных РС в зависимости от статуса ЛОКУС, а также от наличия/отсутствия терапии ПИТРС и в группе здоровых доноров (контроля). Полученные данные представлены как изменения абсолютного и относительного содержания лимфоцитов и представлены в данном разделе.

Проведен анализ концентраций В-лц в объединенной группе пациентов с рассеянным склерозом (n=58) в сравнении с группой контроля (n=22) для сравнения концентраций В-лц в этих группах. Выявлена значимая разница в концентрации непереключенных В-лимфоцитов с повышением в группе РС (169,9 кл/мкл [129,8-230,6] vs. 121,8 кл/мкл [101,9- 197], p=0,0371). По остальным субпопуляциям не получено значимой разницы (данные не представлены).

Чтобы исключить влияние терапии ПИТРС, которую получали пациенты, мы сравнили концентрации В-лц в объединенной когорте пациентов из групп 1 и 2

(n=43) с концентрациями в группе 3 (n=15). Ни по одной субпопуляции не было показано значимых отличий (данные не представлены).

С целью определения влияния ЛОКУС на концентрации В-лц в крови, проведено сравнение концентраций субпопуляций В-лц в группах 1 и 2. В группе 1 (ЛОКУС-позитивные) выявлено статистически значимое снижение концентраций переключенных В-лимфоцитов и В-клеток памяти в сравнении с группой 2. Данные представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Сравнительный анализ концентраций субпопуляций В-лимфоцитов в группах 1 и 2

Субпопуляции	Группа 1 (ЛОКУС-негативные) кл/мкл n = 17	Группа 2 (ЛОКУС-позитивные), кл/мкл n = 26
CD19+IgD+ (непереключенные В-лц)	184,4 [141, 227,8]	169,9 [119,6, 232,1]
CD19+IgD- (переключенные В-лц)	54,25 [42,83, 76,24]	36,84* [21,81, 54,78]
CD19+ CD38+ IgD+ (клетки фолликулярной зоны/маргинальные клетки)	23,86 [11,07, 39,22]	20,2 [11,3, 37,59]
CD19+ CD38+ IgD- (центроциты)	3,63 [1,91, 7,78]	3,14 [1,53, 4,59]
CD19+CD27++CD38++ (плазмабласты)	0,94 [0,34, 3,01]	0,62 [0,34, 1,78]
CD19+CD27+IgD- (В-лц памяти)	71,41 [44,21, 108,8]	34,76** [26,12, 64,78]

Примечание: \*- p = 0,0264, \*\* - p = 0,0254, в остальных случаях разница статистически не значима. ЛОКУС - лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала. Данные представлены как медиана [25<sup>ый</sup> перцентиль, 75<sup>ый</sup> перцентиль]

Для изучения связи ЛОКУС с показателями интратекального воспалительного процесса, ассоциированных с В-лц, были измерены концентрации ВАФФ, к-СЛЦЦСЖ и CD40-L. Значимых отличий выявлено не было. Данные представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Концентрации цитокинов и продуктов активации В-лимфоцитов в зависимости от ЛОКУС-статуса

Концентрации	Группа 1, ЛОКУС-негативные, n=17	Группа 2, ЛОКУС-позитивные, n=26
к-СЛЦЦСЖ, мкг/мл	0,44 [0,21, 0,95]	0,95 [0,28, 2,26]
BAFF, нг/мл	0,3 [0,14, 1,76]	0,27 [0,15, 0,59]
CD40L, нг/мл	87,86 [63,08, 146,5]	82,93 [15,5, 114,9]

Примечание: Данные представлены как медиана [25<sup>ый</sup> перцентиль, 75<sup>ый</sup> перцентиль]

Проведен корреляционный анализ концентраций В-лц крови с концентрациями перечисленных маркеров ЦСЖ для демонстрации взаимосвязи процессов, ассоциированных с изменением состава В-лц в периферической циркуляции. Только в группе ЛОКУС-позитивных пациентов в сравнении с ЛОКУС-негативными концентрации к-СЛЦЦСЖ показали значимые обратные корреляции с концентрациями centroцитов герминативных центров ( $r = -0,5545$ ,  $p = 0,0423$ ), непереключенных В-клеток ( $r = -0,5809$ ,  $p = 0,032$ ), а также более сильные корреляции с концентрациями переключенных В-клеток ( $r = -0,7041$ ,  $p = 0,0063$ ) и В-клеток памяти ( $r = -0,6601$ ,  $p = 0,0122$ ). Другие биомаркеры не показали значимых корреляций. В группе ЛОКУС-позитивных пациентов значимых корреляций показано не было.

### 3.3 Проспективное 2х-летнее исследование динамики МРТ-показателей лептоменингеального воспаления у пациентов с рассеянным склерозом

В исследование были включено 30 пациентов с РС, подписавших добровольное информированное согласие на визите 1. Все пациенты выполнили повторные МРТ на Визите Месяц 12 и Месяц 24. Все пациенты получали терапию,

модифицирующую течения РС: 15/30 (50%) получали глатирамера ацетат и 15/30 (50%) получали препараты рекомбинантного интерферона бета-1б.

На этапе включения в исследование (Исходный визит) ЛОКУС определялись у 10/30 (33%) пациентов и не определялись у 20/30 (67%) пациентов. На визите месяц 12 ЛОКУС определялись у 10/30 (33%) пациентов и не определялись у 20/30 (67%) пациентов. На визите месяц 24 ЛОКУС определялись у 11/30 (30%) пациентов и не определялись у 19/30 (70%) пациентов.

Медиана (IQR) количества ЛОКУС среди ЛОКУС-положительных на неделе 0 пациентов составила 1 (1,75). При исследовании этой группы в динамике на неделе 48 медиана (IQR) количества ЛОКУС составила 1 (2,5), на неделе 96 – 1 (2,5). Сравнение динамики показателей за 2 года с помощью непараметрического парного теста ANOVA в вариации Фридмана с поправкой Dunn на множественные сравнения не выявило значимой разницы между временными отрезками ( $p = 0,3086$ ).

За период наблюдения отмечено появление 5 новых ЛОКУС у 3 пациентов на месяце 12 и 4 новых очагов у 2 пациентов на месяце 24. Выявлено исчезновение 6 ЛОКУС у 4 пациентов на месяце 12 и 4 ЛОКУС у 3 пациентов на месяце 24.

На основании результатов пациенты были разделены на 3 группы:

1. Группа 1. Пациенты со стабильно отсутствующими ЛОКУС (не определялись на исходном визите, месяце 12 и месяце 24);
2. Группа 2. Пациенты со стабильным наличием ЛОКУС (постоянно определяющиеся ЛОКУС в одной локализации на исходном визите, месяце 12 и месяце 24);
3. Группа 3. Пациенты с нестабильным определением ЛОКУС – пациенты, у которых при обследовании на месяце 12 и месяце 24 появлялись новые или исчезали имеющиеся ЛОКУС.

Распределение пациентов по группам составило: 1) Группа 1 – 19/30 (63%); 2) Группа 2 – 4/30 (13%); 3) Группа 3 – 7/30 (23%).

Среди пациентов группы 3 отмечена следующая динамика. На неделе 0 ЛОКУС присутствовали у 6/7 (86%) пациентов и отсутствовали у 1/7 (14%)

пациента. Через 2 года ЛОКУС присутствовали у всех пациентов, среднее количество (SD) составило 2 (1,5) очага.

Таким образом, в группе пациентов с отсутствием ЛОКУС на момент включения отмечалась крайне слабая динамика изменений (1 пациентка с появлением ЛОКУС). У большинства ЛОКУС-позитивных пациентов отмечена некоторая динамика количества ЛОКУС, однако полное исчезновение лептотомингеального контрастирования наблюдалось только у 2/7 (28%) пациентов.

Был проведен анализ демографических и клинических показателей в отобранных группах пациентов. Пациенты в группах 2 и 3 были старше, имели большую продолжительность заболевания, но меньшее количество обострений в первые 5 лет заболевания, однако изменения не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ). Данные представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Клинико-демографические характеристики групп пациентов

Показатель	Группа 1 (n=19)	Группа 2 (n=4)	Группа 3 (n=7)
Соотношение м/ж	9/10	1/3	3/4
Возраст, лет ( $\pm$ SD)	39,16 $\pm$ 12,46	48 $\pm$ 15,9	40,86 $\pm$ 15,19
Длительность заболевания, месяцы, среднее ( $\pm$ SD)	96,63 $\pm$ 86,52	112 $\pm$ 30,53	103,7 $\pm$ 85,37
Количество обострений за 1ый год заболевания, среднее ( $\pm$ SD)	1,79 $\pm$ 0,98	1,0 $\pm$ 0	1,71 $\pm$ 0,76
Количество обострений за первые 5 лет заболевания, среднее ( $\pm$ SD)	2,67 $\pm$ 1,44	1,75 $\pm$ 0,96	1,75 $\pm$ 0,96

При наблюдении в динамике анализировались следующие показатели: количество обострения за период исходный визит – месяц 12 и месяц 12 – месяц 24, балл EDSS на месяце 12 и месяце 24, среднегодовая частота обострений за 2 года наблюдений.

Медиана (IQR) обострений за период месяц 0-12 в группе 1 составила 0 (0), в группе 2 – 0 (0,5), группе 3 – 0 (0), что не составило статистически значимой разницы. Медиана (IQR) обострений за период месяц 12-24 в группе 1 составила 0 (1), в группе 2 – 0 (0), группе 3 – 0 (0), что не составило статистически значимой разницы.

Средний балл EDSS ( $\pm$ SD) на месяц 12 в группе 1 составил 3,68 (1,74), в группе 2 – 4,0 (1,35), группе 3 – 4,0 (1,83), что не составило статистически значимой разницы. Средний балл EDSS ( $\pm$ SD) на неделе 96 в группе 1 составил 3,92 (1,91), в группе 2 – 4,5 (2,12), группе 3 – 4,36 (1,95), что не составило статистически значимой разницы. Попарное сравнение балла EDSS по сравнению с баллом на неделе 0 не выявило значимой динамики во всех группах.

Медиана (IQR) среднегодовой частоты обострений за период месяц 0-12 в группе 1 составила 0,5 (0,5), в группе 2 – 1 (0,75), группе 3 – 0,5 (0,5), что не составило статистически значимой разницы.

На основании полученных данных был сделан предварительный вывод о том, что количество ЛОКУС с течением времени остается относительно стабильным, с небольшим количеством пациентов с полным исчезновением ЛОКУС. Всего у 1 пациента отмечено появление ЛОКУС, которое стойко сохранялось в течение наблюдения. Пациенты со стабильным определением ЛОКУС не отличались от группы с изменяющимся количеством ЛОКУС по клиническим и демографическим показателям.

#### 3.4. Когортное проспективное неинтервенционное исследование, проводимое в параллельных группах, по оценке связи МРТ-показателей лептоменингеального воспаления с риском развития нейродегенерации и прогрессирования инвалидизации при рассеянном склерозе

Все пациенты прошли МРТ на исходном визите. В группу 1 (ЛОКУС-положительные) включено 26/62 (42%) пациентов, в группу 2 (ЛОКУС-негативные) – 36/62 (58%) пациентов. Средний возраст на момент включения пациентов в группу

1 составил, в группе 2. 44/62 (71%) пациентов выполнили МРТ на визите Месяц 24. Схема наблюдения представлена на Рисунке 6.

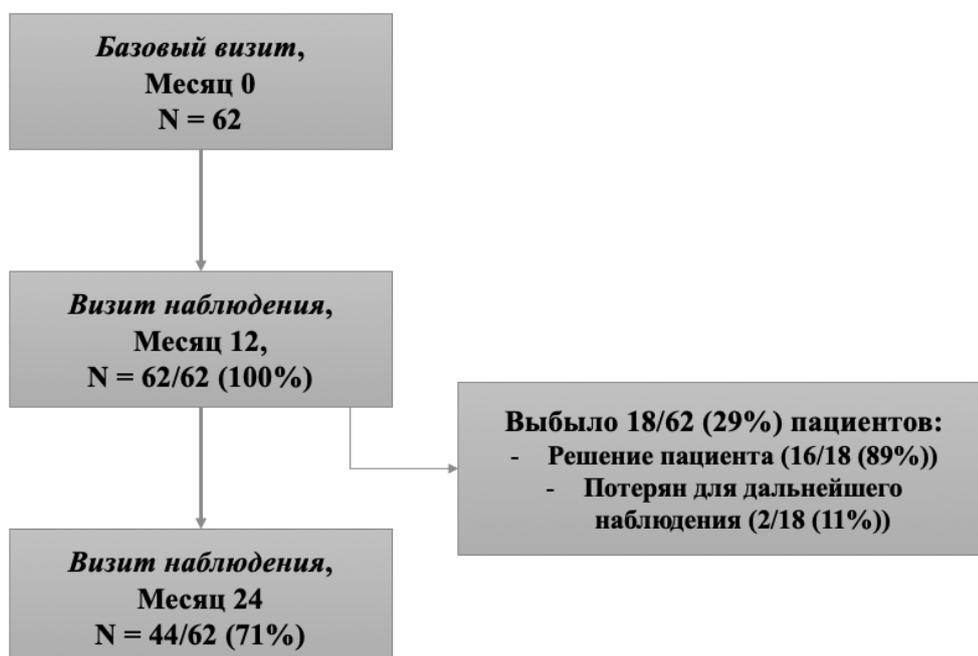


Рисунок 6 – Размер выборки, динамика наблюдения пациентов, причины выбывания из исследования

Характеристики групп 1 и 2 представлены в Таблице 10.

Таблица 10 – Клинико-демографические характеристики участников проспективного исследования

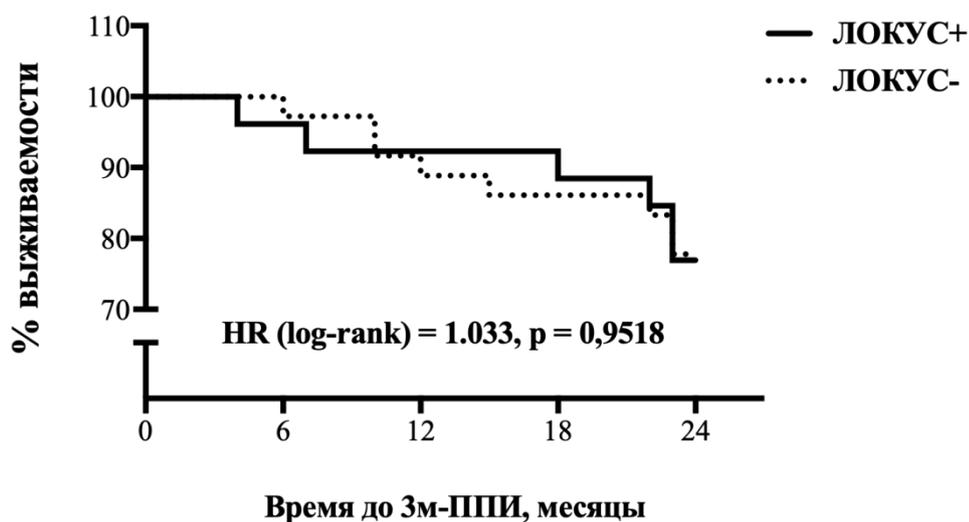
Показатели	Группа 1, ЛОКУС- позитивные (n=26)	Группа 2, ЛОКУС- негативные (n=36)	Значение p*
1	2	3	4
% женщин	19/26 (73%)	16/36 (44%)	0,0377
Возраст включения в исследование в годах, среднее ( $\pm$ SD)	43,04 $\pm$ 12,75	35,92 $\pm$ 10,74	0,0205

1	2	3	4
Тип течения РС (% от общего количества) - РРРС - ВПРС - ППРС	- 15/26 (58%) - 10/26 (38%) - 1/26 (4%)	- 32/36 (89%) - 2/36 (6%) - 2/36 (6%)	0,0068 0,0023 >0,9999
Длительность заболевания в месяцах, среднее ( $\pm$ SD)	126,8 $\pm$ 100,2	60,86 $\pm$ 79,74	0,0027
Возраст первого обострения в годах, среднее ( $\pm$ SD)	32,58 $\pm$ 11,06	30,72 $\pm$ 10,16	0,4971
Количество обострений в первый год заболевания, медиана (IQR)	1 (1)	2 (1)	0,0080
Балл EDSS на момент включения, медиана (IQR)	4 (4,125)	2,5 (2,5)	0,0297
Терапия ПИТРС (% получающих) - ГА (%) - ИФН бета (%)	- 9/26 (35%) - 17/26 (65%)	- 11/36 (31%) - 25/36 (69%)	>0,9999 0,7876
Тип синтеза ОП-IgG (% пациентов с 2ым типом синтеза)	17/18 (94%)	30/32 (94%)	>0,9999
Каппа СЛЦ в ЦСЖ, мкг/мл^ среднее ( $\pm$ SD)	1,256 $\pm$ 0,9139	0,8108 $\pm$ 0,8648	0,1304

Примечание: ЛОКУС- лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала; РС -рассеянный склероз; РРРС – рецидивирующе-ремиттирующий рассеянный склероз; ВПРС – вторично-прогрессирующий рассеянный склероз; ППРС – первично-прогрессирующий рассеянный склероз; EDSS – расширенная шкала инвалидизации; ОП-IgG – олигоклональные полосы; к-СЛЦЦСЖ – концентрации свободных легких цепей иммуноглобулинов типа каппа; SD – стандартное отклонение; IQR – межквартильный размах. \* для сравнения использовался точный критерий Фишера. Значимая разница выделена курсивом

Все пациенты проходили наблюдение лечащим врачом исследования. Информация о клиническом течении заболевания была собрана в том числе по пациентам, которые не выполнили МРТ на Месяце 24, за исключением 2 выбывших пациентов. 14/62 (23%) пациентов имели подтвержденное 3-месячное прогрессирование инвалидизации через 2 года. Между группами 1 и 2 не было отмечено значимой разницы в скорости и выраженности прогрессирования инвалидизации. Анализ первичной конечной точки показал, что в группе ЛОКУС-позитивных пациентов 3м-ППИ отмечено у 6/26 (23%) пациентов, в группе ЛОКУС-негативных у 8/36 (22%),  $p > 0,9999$ . Среднее ( $\pm$ SD) время до 3м-ППИ в группе 1 составило 16,17 ( $\pm$  8,52), в группе 2 – 15,63 ( $\pm$  7,44),  $p = 0,9012$ . Доля ЛОКУС-позитивных среди пациентов, достигших 3м-ППИ составила 6/14 (43%), а среди не достигших 3м-ППИ – 20/48 (42%),  $p > 0,9999$ .

Был проведен анализ выживаемости Каплана-Мейера для оценки влияния ЛОКУС на риск прогрессирования инвалидизации. По данным анализа не было выявлено существенного влияния ЛОКУС на риск достижения 3м-ППИ: HR 1,033, log-rank  $p = 0,9518$ , 95% ДИ 0,3574 - 2,984. Данные анализа представлены на Рисунке 7.



		Пациенты в группе риска				
ЛОКУС+		26	25	24	23	20
ЛОКУС-		36	35	32	31	28
		0	6	12	18	24
		Время до 3м-ППИ, месяцы				

Рисунок 7 – Анализ выживаемости Каплана-Мейера по времени достижения 3м-ППИ в зависимости от наличия ЛОКУС. ЛОКУС-лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала; 3м-ППИ – 3-месячное подтвержденное прогрессирование инвалидизации; HR – отношение рисков (hazard ratio)

Для оценки комплексного влияния ЛОКУС и других исходных предикторов на риск достижения 3м-ППИ был проведен регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса. Однофакторный анализ не выявил значимого влияния ЛОКУС на риск достижения 3м-ППИ: ОР 1,04, 95% ДИ 0,36-3,01,  $p = 0,9356$ . Среди остальных факторов значимым влиянием на исход исследования обладал объем серого вещества головного мозга (измеренный как % внутричерепного объема (% ВЧО)): ОР 0,83, 95% ДИ 0,8-1,0,  $p = 0,0464$ . Отмечен тренд в сторону значимого влияния возраста на момент первой МРТ ( $p=0,0893$ ) и исходного балла EDSS. Для оценки комплексного влияния была построена многофакторная регрессионная модель, включавшая факторы, оказывающие влияние на исход: возраст на момент включения, исходный балл EDSS, объем серого вещества. Дополнительно в модель включалось наличие/отсутствие ЛОКУС

в качества ко-фактора. Был использован метод пошагового исключения для определения значимых предикторов. Единственным фактором, определявшим риск прогрессирования инвалидизации в нашей модели, был объем серого вещества головного мозга (% ВЧО):  $\beta - 0,18$ , ОР 0,83, 95% ДИ 0,7 – 0,99,  $p = 0,0464$ . В нашей модели, большие значения объема серого вещества снижали риск прогрессирования инвалидизации. Включение ЛОКУС в модель не влияло на результат моделирования. Данные анализа пропорциональных рисков Кокса представлены в Таблице 11.

Таблица 11 – Унивариантный анализ пропорциональных рисков Кокса для достижения 3-месячного подтвержденного прогрессирования инвалидизации

Переменная	Коэффициент ( $\beta$ )	Стандартная ошибка	Статистика Вальда, $\chi^2$	p-значение	Отношение рисков	95% ДИ
Возраст, лет	3,44	2,03	2,89	0,0893	31,44	0,59-1678,35
Длительность заболевания, месяцы	0,36	0,47	0,56	0,4543	1,43	0,56-3,61
EDSS на исходном визите, балл	2,25	1,19	3,58	0,0585	9,51	0,92-98,08
СЧО М0-М24	-0,09	0,63	0,02	0,887	0,91	0,27-3,12
ЛОКУС	0,02	0,27	0,007	0,9356	1,04	0,36-3,01
НОМ, мл <sup>3</sup>	-4,09	12,36	0,11	0,7405	0,02	0-55,04
НОБВ, %ВЧО	1,81	11,41	0,03	0,8738	6,12	0-31,31
НОК, %ВЧО	-0,2	0,11	2,91	0,09	0,82	0,66-1,03
НОСВ, %ВЧО	-0,18	0,09	3,96	0,0464	0,83	0,8-1,0
НОЖ, %ВЧО	-0,2	1,29	0,03	0,8752	0,82	0,06-10,3

Примечание: ДИ – доверительный интервал; EDSS – расширенная шкала инвалидизации; СЧО – среднегодовая частота обострений; ЛОКУС- лептотомингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала; НОМ – нормализованный объем мозга; ВЧО – внутричерепной объем; НОБВ – нормализованный объем белого вещества; НОК – нормализованный объем коры; НОСВ – нормализованный объем серого вещества; НОЖ – нормализованный объем желудочков; ПИОМ – процент изменения объема мозга; М0 – месяц 0, исходный визит; М12 – месяц 12; М24 – месяц 24

Медиана балла EDSS через 2 года в группе 1 была значимо выше, чем в группе 2: 4.0 (3,0; 6.5) vs 2,5 (1,5; 4,5),  $p = 0,0085$ . Средняя разница ( $\pm$ SD) балла EDSS между Месяцем 24 и Исходным визитом в группе 1 составила  $0,29 \pm 0,68$  балла, а в группе 2 составила  $0,06 \pm 1,2$  балла,  $p = 0,3298$ .

За первый год в группе 1 средняя частота обострений была  $0,04 \pm 0,2$ , в группе 2 –  $0,5 \pm 0,66$ , что составило значимую разницу ( $p = 0,0008$ ). За второй год в группе 1 средняя частота обострений составила  $0,12 \pm 0,33$ , в группе 2 –  $0,29 \pm 0,58$ , что было статистически не значимо ( $p = 0,2526$ ).

В группе 1 среднее количество контрастных очагов за 2 года на МРТ составило  $0,19 \pm 0,4$ , в группе 2 –  $0,59 \pm 1,89$  ( $p=0,4031$ ).

Были проанализированы данные достижения критерия NEDA-3 за 2 года у 17 пациентов из группы 1 и 27 пациентов из группы 2, выполнивших МРТ на визитах Месяц 12 и Месяц 24. В группе ЛОКУС-позитивных статус NEDA-3 достигли 5/17 (29%) пациентов, а среди ЛОКУС-негативных 6/27 (22%),  $p = 0,7244$ .

Эскалация терапии на ПИТРС 2ой линии в общей когорте пациентов проведена преимущественно на натализумаб - 6/62 (10%) пациентов, офатумумаб в рамках клинического исследования – 1/62 (2%) пациент. В группе ЛОКУС-позитивных пациентов на натализумаб переведены 2/26 (8%) пациента, в группе ЛОКУС-негативных - 4/36 (11%) пациентов. У 2х ЛОКУС-позитивных пациентов, переведенных на Натализумаб, на МРТ на месяце 24 отмечен полный регресс ЛОКУС.

Была проанализирована динамика изменений объема очагов в белом веществе. В группе 1 средний (SD) объем очагов в белом веществе на исходном визите составил 15,08 (19,82) мл, на визите M12 – 13,71 (18,89), и на визите M24 - 16.04 (20.37). Однофакторный анализ ANOVA не выявил значимой разницы между группами,  $F = 0,8957$ ,  $p = 0,3675$ . В группе 2 средний (SD) объем очагов в белом веществе на исходном визите составил 5,98 (7,83) мл, на визите M12 – 5.92 (7,71), и на визите M24 – 6,26 (6,88). Однофакторный анализ ANOVA не выявил значимой разницы между группами,  $F = 0,308$ ,  $p = 0,6818$ . Сравнение объема очагов в белом веществе с помощью t-критерия Стьюдента не выявило значимой разницы между

группами 1 и 2 на исходном визите ( $p = 0,1296$ ), визитах Месяц 12 ( $p = 0,5867$ ) и Месяц 24 ( $p = 0,2691$ ).

Исследовано влияние ЛОКУС на атрофию структур головного мозга. Показатели объемов головного мозга на исходном визите, а также изменения объемов между исходным визитом и визитами M12 и M24, сравнивались между собой. Статистическая общая линейная модель (General Linear Model, GLM) была скорректирована по полу и возрасту. Данные представлены в Таблице 12.

На исходном визите в группе ЛОКУС-позитивных пациентов отмечено значимое снижение объемов головного мозга, белого вещества, подкоркового серого вещества, таламуса, скорлупы и ствола мозга. Дальнейшее наблюдение показало разнонаправленную динамику. В течение первого года наблюдения в группе ЛОКУС-позитивных пациентов наблюдалась меньшая скорость атрофии, чем в группе ЛОКУС-негативных, однако изменения не были статистически значимыми. При оценке динамики за 2 года наблюдения отмечена более выраженная степень атрофии объема мозга, коры и серого вещества, однако эти изменения также не были статистически значимы. Процент изменения объема головного мозга (percentage of brain volume change, PBVC) также статистически значимо не отличался между группами. Одной из структур, которая стабильно имела меньший объем в группе ЛОКУС-позитивных — это ствол мозга. Однако темпы нарастания атрофии значимо не различались среди обеих групп. Выраженную атрофию через 2 года продемонстрировала скорлупа, темпы изменения ее объема у ЛОКУС-позитивных пациентов практически в 10 раз превышали темпы ЛОКУС-негативных пациентов. Обратная ситуация показана с объемом таламуса. Через 2 года отмечено значимое увеличение объема таламуса в группе ЛОКУС-позитивных пациентов, а разница между исходным визитом и M24 была статистически значима. Более подробно данные представлены в Таблице 12.

Таблица 12 – Показатели исходных объемов структур головного мозга и динамика изменений с течением времени в зависимости от наличия ЛОКУС

Морфометрический показатель	Группа 1, ЛОКУС-положительные пациенты, n = 26	Группа 2, ЛОКУС-негативные пациенты, n = 36	F	Значение p
1	2	3	4	5
ОМ, %ВЧО				
- ИВ	73,8 ± 3,48	75,86 ± 3,07	5,79	0,0193
- M12	73,85 ± 3,99	75,41 ± 3,1	0,087	0,7692
- M24	71,97 ± 3,59	74,19 ± 2,81	1,58	0,2159
ОМ, % изменения от исходного				
- ИВ - M12	-0,401 ± 0,92	-0,68 ± 1,46		0,3907
- ИВ - M24	-2,14 ± 1,15	-2,04 ± 1,34		0,814
ПИОМ M0-M24	-0,6971 ± 1,137	-0,4185 ± 1,122		0,4350
НОБВ, %ВЧО				
- ИВ	27,95 ± 2,64	29,12 ± 2,15	4,19	0,0451
- M12	27,99 ± 3,08	28,86 ± 2,13	1,84	0,181
- M24	28,5 ± 2,87	29,82 ± 1,72	1,65	0,2071
НОБВ, % изменения от исходного				
- ИВ - M12	-0,31 ± 0,58	-0,27 ± 0,63		0,9801
- ИВ - M24	0,55 ± 0,8	0,68 ± 0,87		0,6296
ОК, %ВЧО				
- ИВ	30,85 ± 1,84	31,85 ± 1,95	3,04	0,0865
- M12	30,8 ± 2,1	31,59 ± 1,94	0,6	0,44
- M24	28,46 ± 2,06	29,43 ± 1,72	0,34	0,561
ОК, % изменения от исходного				
- ИВ - M12	-0,16 ± 0,74	-0,39 ± 1,06		0,2528
- ИВ - M24	-2,65 ± 0,61	-2,43 ± 1,08		0,4691
ОПкСВ, %ВЧО				
- ИВ	3,7 ± 0,33	3,88 ± 0,3	7,98	0,0065
- M12	3,69 ± 0,31	3,89 ± 0,26	4,17	0,0462
- M24	3,67 ± 0,29	3,87 ± 0,25	1,81	0,1868

1	2	3	4	5
ОПкСВ, % изменения от исходного - ИВ - М12 - ИВ - М24	-0,019 ± 0,08 -0,05 ± 0,09	-0,04 ± 0,06 -0,07 ± 0,13		0,5 0,6268
ОСВ, %ВЧО - ИВ - М12 - М24	41,48 ± 2,35 41,38 ± 2,57 38,87 ± 2,44	42,85 ± 2,37 42,62 ± 2,28 40,52 ± 2,14	3,83 1,32 0,655	0,0553 0,2566 0,4234
ОСВ, % изменения от исходного - ИВ - М12 - ИВ - М24	-0,24 ± 0,8 -2,74 ± 1,21	-0,47 ± 1,07 -2,48 ± 1,21		0,5 0,4519
Объем желудочковой системы, %ВЧО - ИВ - М12 - М24	1,78 ± 1,14 1,89 ± 1,33 1,87 ± 1,25	1,29 ± 0,58 1,32 ± 0,6 1,36 ± 0,64	1,9 0,1 0,13	0,1737 -0,7515 0,7225
Объем желудочковой системы, % изменения от исходного - ИВ - М12 - ИВ - М24	0,1 ± 0,2 0,14 ± 0,24	0,06 ± 0,09 0,09 ± 0,13		0,9139 0,3519
Таламус, %ВЧО - ИВ - М12 - М24	0,93 ± 0,09 0,94 ± 0,06 0,96 ± 0,09	0,95 ± 0,1 0,95 ± 0,08 0,91 ± 0,11	4,22 0,14 6,59	0,0444 0,7131 0,0142
Таламус, % изменения от исходного - ИВ - М12 - ИВ - М24	0,02 ± 0,07 0,02 ± 0,66	-0,02 ± 0,064 -0,06 ± 0,07		0,0634 0,0003
Скорлупа, %ВЧО - ИВ - М12 - М24	0,68 ± 0,1 0,68 ± 0,09 0,61 ± 0,1	0,73 ± 0,1 0,74 ± 0,09 0,73 ± 0,1	4,05 6,88 14,45	0,0487 0,0007 0,0005

1	2	3	4	5
Скорлупа, % изменения от исходного - ИВ - М12 - ИВ - М24	-0,007 ± 0,04 -0,07 ± 0,05	0,006 ± 0,04 -0,007 ± 0,03		0,3636 <0,0001
Ствол мозга, % ВЧО - ИВ - М12 - М24	1,39 ± 0,14 1,38 ± 0,15 1,34 ± 0,17	1,45 ± 0,11 1,46 ± 0,13 1,42 ± 0,12	8,79 6,61 3,94	0,0043 0,013 0,0542
Ствол мозга, % изменения от исходного - ИВ - М12 - ИВ - М24	-0,014 ± 0,04 -0,06 ± 0,07	-0,005 ± 0,055 -0,07 ± 0,06		0,4687 0,6002

Примечание: ЛОКУС – лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала; ОМ – объем мозга; ВЧО – внутричерепной объем; ИВ – исходный визит; ПИОМ – процент изменения объема мозга; НОБВ – объем белого вещества, ОК – объем коры, ОПкСВ – объем подкоркового серого вещества; ОСВ – объем серого вещества

Исследование показателей ПИОМ продемонстрировало существенный разброс значений, который мог повлиять на результаты статистического анализа. Для исключения вариабельности были взяты данные пациентов, находящиеся в диапазоне 25-75 квартилей. Скорость атрофии головного мозга у группе ЛОКУС-положительных пациентов была статистически значимо выше, чем в группе ЛОКУС-негативных:  $0,89 \pm 0,59$  vs.  $0,38 \pm 0,57$ ,  $p = 0,05$ , соответственно. % изменений от исходного объема подкорковых структур не показал значимой разницы, что было особенно заметно на фоне существенного увеличения объема таламуса в группе ЛОКУС-положительных пациентов. При исключении из анализа изменения объема таламуса, в группе ЛОКУС-положительных пациентов наблюдалась статистически значимая потеря объема ПкСВ между исходным визитом и месяцем 24 по сравнению с группой ЛОКУС-негативных пациентов:  $-0,08 \pm 0,07$  vs.  $-0,04 \pm 0,07$ ,  $p = 0,0448$ , соответственно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хронический воспалительный процесс при рассеянном склерозе, как показали исследования последних лет, проявляется не только классическими обострениями и очагами демиелинизации, но и диффузной нейродегенерацией, демиелинизацией серого вещества и лептоменингеальным воспалением. Ключевую роль в процессе воспаления при РС играют В-лц. У пациентов с РС определяется увеличение интратекальной популяции В-лц, представленных преимущественно CD27+ В-клетками памяти. Рядом исследователей установлено наличие эктопических В-лимфоидных структур в менингеальных оболочках (Corcione A. et.al., 2005; Serafini B. et.al., 2004), а также плазматических клеток, продуцирующих аутоантитела к миелину и другим антигенам, в ЦНС и в периферической циркуляции (Ritchie A.M. et.al., 2004). Выявлены признаки клональной экспансии и соматических гипермутаций в генах В-клеток, что указывает на антиген-зависимую дифференцировку В-клеток, а также плазматических клеток (Colombo M et.al., 2000). В-клетки памяти и плазматиты присутствуют как в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), так и в воспалительных церебральных очагах при РС (Haubold K. et.al., 2004). Антиген-специфичные В-клетки памяти, центробласты, секретирующие антитела плазмабласты и плазматические клетки ответственны за интратекальную продукцию иммуноглобулинов G в ЦНС. Полученные данные в совокупности доказывают, что В-лц, плазмабласты и плазматические клетки у пациентов с РС мигрируют в ЦНС и персистируют в ней многие годы (Uccelli A. et.al., 2005).

Для выживания и поддержания функций В-клеток в субарахноидальном пространстве ЦНС формируются ЛМФС (Serafini B. et.al., 2004). Процесс агрегации В-клеток с формированием фолликулов опосредуется экспрессией лимфоидных цитокинов, в частности, хемокина CXCL-13, селективного хемоаттрактанта для В-лц (Krumbholz M. et.al., 2006). В мозге больных РС эктопические фолликулы прилежат к пиальной мембране в пределах

субарахноидального пространства, рядом с сосудами мозговой оболочки. Представление о патогенезе ЛОКУС изображено на Рисунке 8.

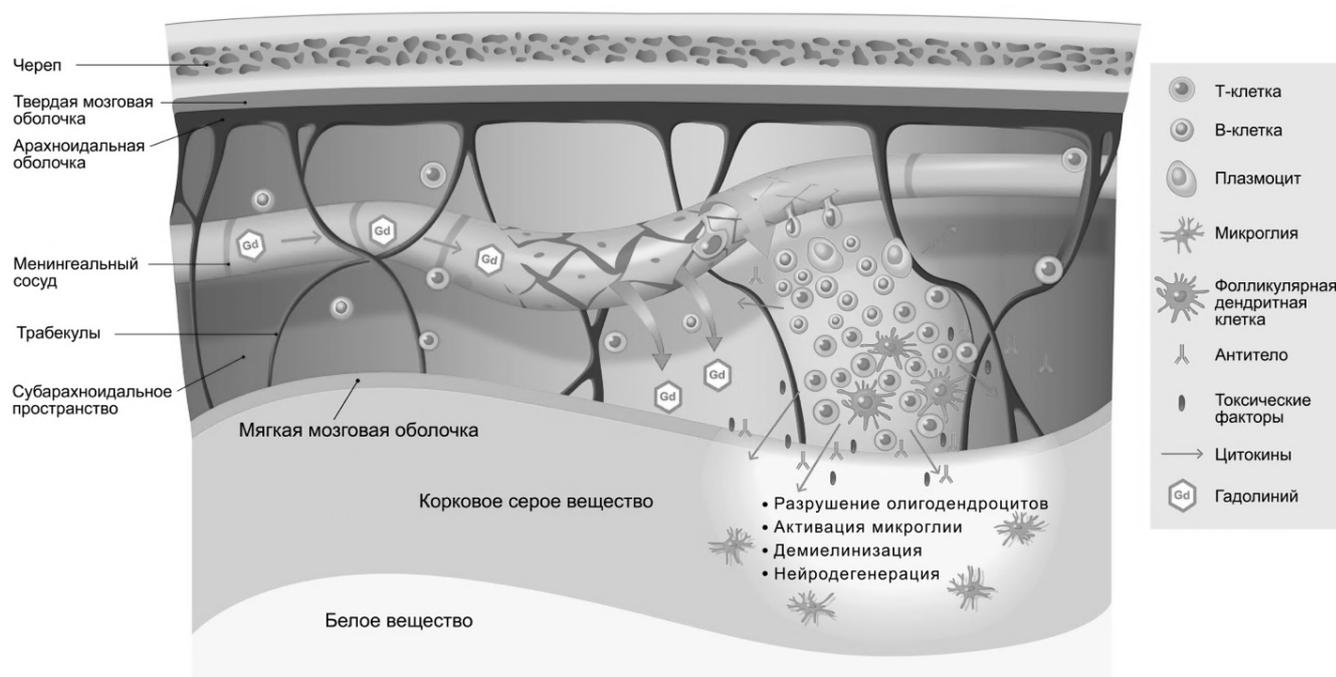


Рисунок 8 – Предполагаемые механизмы формирования лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала

Чрезвычайно важными представляются данные о том, что формирование третичных лимфоидных фолликулов сочетается с прогрессирующим инвалидизацией пациентов и нарастающей атрофией вещества головного мозга вследствие нейродегенерации (Choi S. et.al., 2012). Эти данные открывают перспективу выбора В-клеток в качестве терапевтической мишени при РС и поиску биомаркеров, связанных с формированием ЛМФС. Использование импульсной последовательности 3D FLAIR после введения контрастного вещества позволяет визуализировать очаги накопления контрастного вещества в подбололочном пространстве – ЛОКУС.

В нашем исследовании была оценена встречаемость лептоменингеального воспаления при РС, а также изучены некоторые аспекты его патогенеза и прогностическое значение в отношении нейродегенерации и прогрессирования

инвалидизации. Исследования других научных групп продемонстрировали, что наличие ЛОКУС связан со значительной корковой атрофией (Absinta M. et.al., 2015; Zivadinov R. et.al., 2016). Субпиальная демиелинизация коры является особым типом демиелинизации и связана с прогрессирующими стадиями заболевания, а также имеет иной патогенез, нежели очаги в белом веществе (Kutzelnigg A. et.al., 2015). В ходе нашего исследования мы также выявили, что ЛОКУС чаще встречаются у пациентов с прогрессирующими формами РС. Результаты нашего исследования позволят сформулировать новый взгляд на патогенез рассеянного склероза и взаимосвязь воспаления с прогрессированием инвалидизации.

Использованный метод контрастного 3D FLAIR позволил выявить ЛОКУС у 41% пациентов в кросс-секционном исследовании и 42% в проспективном исследовании. Показанная в нашем исследовании частота встречаемости ЛОКУС была выше, чем, что в статьях других авторов (Absinta M. et.al., 2015; Zivadinov R. et.al., 2016). Это может быть объяснено довольно высоким средним баллом EDSS в исследованной выборке пациентов из-за большего количества пациентов на поздних стадиях болезни. Как показывают некоторые исследования, на ранних стадиях РС ЛОКУС могут не определяться (Eisele P. et.al., 2015). Мы предполагаем, что включение пациентов с баллом EDSS более 3,0 может увеличить пропорцию ЛОКУС-позитивных пациентов. Исследования встречаемости ЛОКУС с помощью томографа с напряженностью магнитного поля 7 Тесла от коллектива Harrison с соавт. демонстрируют встречаемость ЛОКУС у 90% пациентов (Harrison D. et.al., 2017). Это говорит о высокой распространенности лептоменингеального воспаления, которое, однако, визуализируется на сверхвысокопольных томографах 7 Тесла. В условиях реальной клинической практики использование томографа 7 Тесла в настоящий момент невозможно, поэтому понимание закономерностей встречаемости ЛОКУС на томографе 3 Тесла является важным для клинической практики. Предположительно, с помощью 3 Тесла возможно выявлять пациентов с наиболее выраженным лептоменингеальным воспалением.

На сегодняшний день в литературе существует только 1 сравнительное исследование чувствительности томографов разных производителей в отношении

лептоменингеального воспаления при РС. В этом исследовании Titelbaum с соавт. показал, что сканеры, выполняющие последовательность 3D FLAIR CUBE (от компании General Electric), при напряжённости магнитного поля в 3 Тл получают интенсивность сигнала в два раза больше, чем на 3D FLAIR VISTA (Philips), и почти в 5 раз больше, чем на 3D FLAIR SPACE (Siemens) (Titelbaum D. et.al., 2018). Примечательно, что 3 Тл CUBE имеет интенсивность в два раза выше, чем 1.5 Тл CUBE (в случае VISTA и SPACE разницы между 3 Тл и 1.5 Тл нет). В нашем исследовании использовалась именно последовательность 3D FLAIR CUBE от General Electric, что также могло обеспечить такую высокую выявляемость ЛОКУС.

В данном исследовании последовательность 3D FLAIR выполнялась пациентам до введения контраста и через 10 минут после него. Нами проводился анализ сразу двух изображений, что позволило определять ЛОКУС точнее, исключая сомнительные участки. Исследование Zivadinov с соавт. показало, что такой метод анализа позволяет исключать ложноположительные результаты (Zivadinov R. et.al., 2018). Результаты постконтрастного 3D FLAIR всегда нужно сравнивать с изображениями до введения контраста. Дополнительно, в нашем исследовании срезы томосканов были выполнены толщиной 1 мм. Это позволило определять даже небольшие участки накопления контраста.

Нами впервые было проведено проспективное 2-летнее исследование динамики ЛОКУС. Для этого мы анализировали постоянство определения ЛОКУС на ежегодном МРТ. На основе полученных данных можно выделить 3 группы пациентов: пациенты со стабильным отсутствием ЛОКУС, пациенты со стабильно сохраняющимися ЛОКУС и пациенты с переменным числом ЛОКУС. Пациенты первых двух групп составляли большинство – 23/30 (77%), что говорит об относительной стабильности ЛОКУС как биомаркера для проспективных исследований. Среднее число ЛОКУС также оставалось стабильным на протяжении всего исследования. Это первое в мире проспективное исследование ЛОКУС. В исследовании Absinta с соавт. проспективное наблюдение не проводилось через фиксированные промежутки времени, однако это исследование

также показало даже большую стабильность ЛОКУС – 85% сохраняли свою форму и размер в течение в среднем 1,4 года (Absinta M. et.al., 2015). В нашем исследовании, ЛОКУС-позитивные пациенты, получавшие терапию глатирамера ацетатом и интерфероном бета, оставались ЛОКУС-позитивными. У 2х пациентов, получавших натализумаб, ЛОКУС регрессировали. Эти наблюдения позволяют сделать несколько выводов. Во-первых, для проспективных исследований в динамике ЛОКУС может использоваться в качестве первичной конечной точки, учитывая, что доля пациентов с исчезнувшими или вновь появившимися ЛОКУС остается небольшой. Во-вторых, требуются дальнейшие исследования для изучения влияния терапии ПИТРС на лептоменингеальное воспаление. Вероятно, требуется некоторая поправка на почти 30% нестабильность числа ЛОКУС при расчете размеров выборки. В-третьих, использование высокоактивной терапии ПИТРС может привести к исчезновению ЛОКУС.

Не было найдено связи между ЛОКУС и накоплением контраста в очагах в белом веществе на T1 ВИ. Наши данные подтверждаются результатами других авторов (Absinta M. et.al., 2015; Zivadinov R. et.al., 2016). Отсутствие связи ЛОКУС с частотой обострений и контрастных очагов T1 говорит о разных механизмах их образования. ЛОКУС связаны с хроническим воспалительным процессом, очаги контрастирования T1 – с временными вспышками воспалительной активности.

Наше исследование продемонстрировало, что большинство ЛОКУС были расположены супратенториально, в непосредственной близости к сосудам мозговой оболочки. Это подтверждает предположение, что ЛОКУС является следствием повышенной проницаемости сосудов мозговой оболочки. Остается неясным вопрос, почему становится возможным локальное накопление контрастного вещества, которое в норме просто вымывается с током ликвора. Возможно, что локальное воспаление внутри субарахноидального пространства приводит к ограниченному фиброзу и способствует снижению скорости тока ликвора в области ЛОКУС, что и дает возможность их визуализации. Однако точный патогенез формирования ЛОКУС в настоящий момент неясен.

В исследовании Absinta с соавт. впервые была продемонстрирована связь ЛОКУС с локальными периваскулярными инфильтратами Т- и В-клеток (Absinta M. et.al., 2015). Однако, данное исследование было проведено на 2 пациентах, поэтому звенья патогенеза ЛОКУС требуют уточнения. Нами было проведено кросс-секционное исследование периферической крови и цереброспинальной жидкости для изучения процессов активации и миграции лимфоцитов. В этом исследовании наличие ЛОКУС было связан со сниженными абсолютными концентрациями отдельных субпопуляций В-лц в периферической крови. Эти изменения касаются только зрелых, дифференцированных В-лц с признаками переключения класса иммуноглобулинов: переключенные В-клетки и В-клетки памяти. Наши данные соответствуют данным других исследований, показывающих уменьшение зрелых субпопуляций в периферической крови, по сравнению с ЦСЖ при РС (Eggers E. et.al., 2017). Подобные изменения могут быть характерны для процессов внутри герминативного центра эктопических лимфоидных структур. Возможно, что по аналогии с другими заболеваниями, мы могли бы ожидать повышения зрелых форм в периферической крови, которые циркулируют в ней перед проникновением в ЦНС (Будкова А.И. и соавт., 2017). В исследовании Christensen с соавт., пациенты с прогрессирующими формами РС имели высокие концентрации DC-SIGN-позитивных В-лц (Christensen J. et.al., 2013). Однако результаты нашего исследования демонстрируют обратную тенденцию. Низкие концентрации CD19+IgD- клеток в крови могут отображать более активные реакции герминативного центра внутри эктопических лимфоидных структур у ЛОКУС-позитивных пациентов. Переключенные В-лц могут длительное время сохраняться в мягкой мозговой оболочке после переключения Ig и не покидать эктопические лимфоидные фолликулы. В отличие от исследования Christensen с соавт., этом исследовании мы, вероятно, выявили другой аспект воспалительной реакции - наличие лептоменингеального воспаления, которое может объяснить различие в результатах. Результаты нашего исследования могут доказывать переход от системного к интратекальному воспалению у больных с РС с лептоменингеальным воспалением.

ЛМФС используются как ниши для выживания и пролиферации лимфоцитов (Chard D. et.al., 2007). Тот же процесс перераспределения показан для синдрома Шегрена, имеющего некоторые общие иммунологические характеристики с РС (Pollok K. et.al., 2012). Концентрации зрелых субпопуляций В-лц и centroцитов показали значительные обратные корреляции с Кл-СЛЦ<sub>ЦСЖ</sub>. Это может говорить о том, что мигрировавшие В-лимфоциты активируются и участвуют в реакции герминативного центра, а их терминально дифференцированные формы – плазмациты – вырабатывают Кл-СЛЦ<sub>ЦСЖ</sub>. Изменения ЦСЖ при РС характеризуются повышением В-клеток памяти, а не наивных В-лц (Haas J. et.al., 2011). Исследование Haas с соавт. показало, что переключенные в класс В-лц памяти были уменьшены в периферической крови. В то же время их концентрации в ЦСЖ были увеличены вместе с повышением в ЦСЖ CXCL13, который является главным В-лц хемокином (Haas J. et.al., 2011). Эти данные свидетельствуют о перераспределении зрелых субпопуляций В-клеток (в основном переключенных В-клеток и В-клеток памяти) внутрь ЦНС у пациентов с наличием ЛОКУС.

Терапия ПИТРС в данном исследовании не могла повлиять на результаты измерений. Лечение препаратами интерферона бета, как было показано, не оказывает значительного влияния на концентрации В-лц (Kasper L. et.al., 2014). По данным исследования глатирамера ацетата, он изменял В-клеточную реактивность, но не концентрации (Rovituso D. et.al., 2015). Т-клетки являются основной мишенью для большинства препаратов для лечения РС. В нашем исследовании мы не видели эффекта лечения на концентрации В-лц. Таким образом, полученные результаты не отражают влияние терапии ПИТРС, а являются следствием иммунологических сдвигов, ассоциированных с формированием ЛОКУС.

Значительным ограничением этого исследования было отсутствием анализа субпопуляций В-лц в ЦСЖ, который, возможно, предоставил бы дополнительные данные. Однако, количество клеток в ЦСЖ на уровне поясничного отдела позвоночника может быть очень низким и не отражать процессы, протекающие в мозговой паренхиме. Исследования цитокинов и продуктов синтеза В-клеток в этом смысле надежнее и эффективнее.

Данное исследование дополняет и подтверждает данные Absinta с соавт. о связи ЛОКУС с ЛМФС (Absinta M. et.al., 2015). На основе представленных данных следует вывод, что уменьшенные концентрации переключенных В-лц и В-клеток памяти в периферической являются следствием перераспределения В-лц из вторичных лимфоидных органов через кровь в эктопические лимфоидные фолликулы для участия в хроническом компартментализированном воспалении. В-лц могут играть важную роль в формировании ЛОКУС. Нужны дальнейшие исследования по оценке влияния анти-В-клеточной терапии на ЛОКУС.

Для изучения клинических аспектов, связанных с формированием ЛОКУС и оценки влияния ЛОКУС на прогрессирование инвалидизации и нейродегенеративных процессов были проведены кросс-секционное и проспективное исследования.

Наличие ЛОКУС было связано с более старшим возрастом, более длительной продолжительностью болезни, и более высоким баллом EDSS. Несмотря на более высокий балл EDSS, эти пациенты на ранних этапах РС не испытали больше обострений, чем в ЛОКУС-отрицательной группе. При анализе исследуемой популяции в проспективном исследовании выявлено, что у ЛОКУС-позитивных пациентов частота обострений РС в течение первого года болезни была меньше, чем в группе ЛОКУС-негативных. Аналогичные результаты показаны в исследовании Choi с соавт., где изучались уже эктопические лимфоидные структуры на аутопсии (Choi S. et.al., 2012). Эти результаты подтверждают, что наличие ЛОКУС не связано с более высокой частотой обострений РС в начале заболевания.

Результаты проспективного наблюдения не выявили разницы по частоте обострений и соответствию критериям NEDA-3 через 2 года в двух исследованных группах. Также не было выявлено разницы между количеством пациентов, которым потребовалась эскалация терапии ПИТРС 2ой линии. Преобладание прогрессирующих форм РС и более старший возраст в группе ЛОКУС-позитивных пациентов не влияло на клиническую активность заболевания. Можно предположить, что наличие ЛОКУС связано с интрате-кальным воспалением, а не

с периферическими иммунными реакциями. Поэтому, частота таких проявлений воспаления, как обострения и/или новые очаги на МРТ, не связана с ЛОКУС. Данные других исследователей подтверждают наши находки (Choi S. et.al., 2012)..

Исходно, пациенты с ЛОКУС имели более высокий балл EDSS и большую продолжительность болезни. В других исследованиях лептоменингеальное воспаление было также связано с более высокой инвалидизацией и темпом прогрессирования (Howell O.W. et.al., 2011). Эти данные соответствуют представлениям о том, что ЛОКУС связан с более выраженной нейродегенерацией (Zivadinov R. et.al., 2016). Однако, в нашем проспективном исследовании не было показано влияние ЛОКУС на скорость или риск 3-месячного подтвержденного прогрессирования инвалидизации. Единственным значимым фактором риска был низкий объем серого вещества головного мозга, который повышал риск прогрессирования инвалидизации. В нашей выборке можно предположить лишь косвенное влияние ЛОКУС через уменьшение объемов серого вещества. Отрицательный результат проспективного исследования мог быть получен из-за небольшой выборки пациентов, а также различного исходного балла инвалидизации. Нарастание балла EDSS у более инвалидизированных пациентов происходит медленнее, что могло отразиться на результатах. Более продолжительные исследования на большей выборке пациентов, возможно, смогут показать влияние ЛОКУС.

Гипотеза, выдвинутая в начале проспективного исследования, предполагала, что ЛОКУС будут связаны с большей атрофией головного мозга, особенно серого вещества и коры, что ранее было показано Zivadinov с соавт. (Zivadinov R. et.al., 2016). В нашем кросс-секционном исследовании с помощью статистического анализа, скорректированного по возрасту и полу, было показано влияние ЛОКУС на объем серого вещества, коры, таламуса и желудочковой системы. Поскольку наличие ЛОКУС не связано с воспалительной активностью РС (обострениями, новыми или контрастными очагами на МРТ), связь ЛОКУС с атрофией носит нейродегенеративный характер. Проспективные исследования показывают, что атрофия коры связана с большим риском прогрессирования инвалидизации, чем

атрофия головного мозга в целом (Charil A. et.al. 2007). Имеются данные о вкладе атрофии таламуса и других подкорковых структур в прогрессирование инвалидизации и когнитивных нарушений (Труфанов А.Г. и соавт., 2020; Krämer J. et.al., 2015). Атрофия таламуса и скорлупы определяется уже на ранних стадиях заболевания и ведет к разобщению нейронных связей, на которых основываются высшие корковые функции.

В проспективном исследовании влияния ЛОКУС на нейродегенеративные изменения пациенты наблюдались в течение 2 лет. Нами было показано, что изначально пациенты с ЛОКУС имеют более выраженные атрофические изменения практически всех важнейших структур головного мозга. Дальнейшее проспективное наблюдение дало противоречивые результаты. Не было показано, что ЛОКУС-позитивные пациенты имеют более высокие темпы атрофии головного мозга. Только более детальный анализ ограниченной выборки пациентов позволил зафиксировать значимое нарастание атрофии. Данные сложности встречаются при небольшом размере выборки, что было существенным ограничением данного исследования. В среднем, темпы атрофии коры, серого вещества и подкорковых структур за 2 года были выше в группе ЛОКУС-позитивных пациентов по сравнению с ЛОКУС-негативными, однако эти различия не были статистически значимы. Следует отметить, что в анализируемых моделях было выявлено сильное влияние возраста на исход анализа. Влияние ЛОКУС было умеренным. Одной из возможных причин может быть частичное перекрытие влияния возраста и ЛОКУС в связи с тем, что образование ЛОКУС нарастает с возрастом.

ЛОКУС-позитивные пациенты имели сниженный объем ствола мозга, что может быть признаком аксональной дегенерации и истончения проводящих путей. Не было показано повышение скорости атрофии ствола с течением времени.

Отмечено значимое увеличение размеров таламуса в группе ЛОКУС-позитивных пациентов. Это может быть, отчасти, объяснено процессами нейропластичности, протекающими у более молодых пациентов в данной группе. С другой стороны, отмечено выраженное увеличение темпов атрофии скорлупы у ЛОКУС-позитивных пациентов. Данная структура является сложным центром, где

происходит переключение многих нейронов. Атрофия скорлупы может быть связана с демиелинизацией и апоптозом нейронов коры головного мозга в местах, прилежащих к мягким мозговым оболочкам. Атрофические процессы вовлекают разные участки коры и головного мозга и приводят к уменьшению размеров таких релейных структур как скорлупа. Выявленные изменения не могут быть связаны с возрастной нейродегенерацией ввиду низкой подверженности подкорковых структур возрастным изменениям, а также использованной статистической модели, скорректированной по полу и возрасту.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о высокой клинической значимости определения ЛОКУС. Процесс формирования ЛОКУС связан с перераспределением В-лц в ЦНС. Появление ЛОКУС характерно для более инвалидизированных и более возрастных пациентов. Атрофия некоторых подкорковых структур, серого вещества больших полушарий и ствола мозга более выражена при наличии ЛОКУС.

## ВЫВОДЫ

1. Предложенный МРТ-протокол для визуализации лептоменингеального воспаления, включающий импульсную последовательность 3D FLAIR с контрастированием, выявил лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала у 41% пациентов с рассеянным склерозом, со средним количеством очагов  $2 \pm 1,5$ ; наличие лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала связано с большей длительностью рассеянного склероза ( $p=0,0098$ ), прогрессирующим течением (ВПРС и ППРС) и более высоким баллом инвалидизации по шкале EDSS ( $p = 0,039$ ), но не связано с более высокой частотой обострений ( $p = 0,2362$ ) или наличием контрастирующих МРТ-очагов в белом веществе ( $p = 0,5306$ );

2. Наличие лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала ассоциировано со значимым снижением концентраций субпопуляций зрелых В-лимфоцитов памяти ( $p<0,05$ ) в периферической крови, которое в свою очередь демонстрирует значимые обратные корреляции ( $p<0,05$ ) с концентрациями продуктов активации В-лимфоцитов (свободных легких цепей иммуноглобулинов) в цереброспинальной жидкости, что не наблюдалось в группе пациентов без лептоменингеального контрастирования.

3. Изучение динамики лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала не выявило изменений их количества и локализации у 23/30 (76%) пациентов через 2 года, а у 7/30 (23%) наблюдалась разнонаправленная динамика, при этом патогенетическая иммуномодулирующая терапия (интерфероны бета и глатирамера ацетат) продолжительностью 2 года не приводила к исчезновению лептоменингеальных очагов.

4. Наличие лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала ассоциировано с более выраженной атрофией паренхимы ( $p = 0,0193$ ) и серого вещества ( $p = 0,042$ ) головного мозга, а также с более быстрым нарастанием атрофии паренхимы головного мозга ( $p = 0,05$ ) и скорлупы ( $p < 0,0001$ ) при оценке через 2 года, при этом наличие лептоменингеальных очагов не было сопряжено с

риском прогрессирования инвалидизации через 2 года в нашей выборке (hazard ratio (log-rank) = 1,033, p = 0,9518).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При выполнении МРТ пациентам с РС для выявления и мониторинга лептоменингеального воспаления следует использовать расширенный протокол исследования на томографе с напряженностью магнитного поля 3 Тесла с добавлением ИП 3D FLAIR и шагом томосреза не более 1 мм. Исследование ИП 3D FLAIR необходимо выполнять до введения контрастного вещества, а повторное сканирование - через 10-12 минут после введения контраста;

2. Определение лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала целесообразно использовать в практике неврологов специализированных кабинетов и центров РС для определения прогноза в отношении прогрессирования атрофии головного мозга;

3. Иммуномодулирующая терапия рассеянного склероза препаратами с умеренной эффективностью (интерфероны бета и глатирамера ацетат) не изменяет количество лептоменингеальных очагов контрастного усиления МР-сигнала в связи с чем она может быть использована в качестве терапии сравнения в клинических исследованиях по оценке влияния других ПИТРС на лептоменингеальные очаги контрастного усиления МР-сигнала.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективой дальнейшего изучения темы является проведение проспективных клинических исследований по оценке влияния современных таргетных анти-В-клеточных препаратов и препаратов селективной иммунорекогнитуции на выраженность лептоменингеального воспаления. Положительные результаты этих исследований могут улучшить понимание патогенеза нейродегенерации при рассеянном склерозе, а также улучшить алгоритмы помощи пациентам. Для дальнейшего изучения роли лептоменингеального воспаления в аутоиммунном процессе при рассеянном склерозе целесообразно планировать проведение комплексных генетических исследований лимфоцитов цереброспинальной жидкости и крови с помощью биоинформационных методик секвенирования следующего поколения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бойко А.Н. Эпидемиология и этиология рассеянного склероза. В кн.: Рассеянный склероз, ред. Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н. // Медицина. - 2004. - С. 7-42.
2. Будкова А.И. Субпопуляционный состав в-клеток периферической крови у больных системной красной волчанкой / А.И. Будкова, С.В. Лапин, М.К. Серебрякова, И.В. Кудрявцев, И.Н. Тришина, А.Л. Маслянский, Арег А. Тотолян // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19. N.2. - С. 175-184
3. Кузьмина У. Ш. Роль глутамата в патогенезе рассеянного склероза / Кузьмина У.Ш., Зайнуллина Л. Ф., Вахитов В. А., Бахтиярова К. З., Вахитова Ю. В. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2019 - No. 119, вып. 8. - С. 160-167
4. Макшаков, Г.С. Современные представления об интратекальном гуморальном иммунном ответе и диагностическое значение выявления олигоклональных иммуноглобулинов при рассеянном склерозе / Макшаков, Г.С., Лапин С.В., Евдошенко Е.П. // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Рассеянный склероз. - 2016. - No 2, вып. 2. - С. 14-20.
5. Попова Е. В. Первично-прогрессирующий рассеянный склероз: современное состояние проблемы своевременной постановки диагноза / Попова Е.В., Бойко А. Н., Барабанова М. А., Антипова Л. Н., Бахтиярова К. З., Белова А. Н., Соловьева В. С., Бельская Г. Н., Лукашевич И. Г., Николаева Л. И., Волкова Л. И., Турова Е. Л., Краева А. В., Гончарова З. А., Малкова Н. А., Повереннова И. Е., Сиверцева С. А., Желнин А. В., Трушников Т. Н., Хабиров Ф. А., Хайбуллин Т. И. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. - 2017. - No 117, вып. 10-2. - С. 35-40.
6. Смагина И. В. Исследование связи между системой sCD40-sCD40L и течением рассеянного склероза / Смагина И. В., Переверзева О. В., Гридина

- А. О., Жданова Е. С., Ельчанинова С. А. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. - 2015 - No 115, вып. 8-2. - С. 22-24.
7. Смагина И. В. Патологические и протективные эффекты фактора некроза опухоли-альфа при рассеянном склерозе / Смагина И. В., Ельчанинова С. А., Палащенко А. С., Галактионова Л. П. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. - 2019. - No 119, вып. 10-2. - С. 14-20.
  8. Труфанов А.Г., Бисага Г.Н., Скулябин Д.И., Тёмный А.В., Юрин А.А., Попляк М.О., Полтавский И.Д., Литвиненко И.В., Одинак М.М., Тарумов Д.А. Значение дегенерации ядер таламуса при ремиттирующем и вторично-прогрессирующем рассеянном склерозе: результаты нейропсихологического и морфометрического исследования. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2020; 14(3): 21–30.
  9. Чикуров А.А. Структурные изменения эпендимы и субэпендимной зоны в перивентрикулярных очагах демиелинизации при рассеянном склерозе / Чикуров А.А., Онищенко Л.С., Гайкова О.Н., Бисага Г.Н., Одинак М.М. // *Вестник Военно-Медицинской академии*. - 2010 - No 1, вып. 29. - С. 141-145.
  10. Absinta, M. Gadolinium-based MRI characterization of leptomeningeal inflammation in multiple sclerosis / M. Absinta, L. Vuolo, A. Rao [et.al.] // *Neurology*. – 2015. – Vol. 85. N1. - P. 18-28.
  11. Allen, I. V. Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis / I.V. Allen, S. McQuaid, M. Miradkhur [et.al.] // *Neurol. Sci.* – 2001. – Vol. 22. – P. 141–144.
  12. Babbe, H. Clonal expansion of CD8<sup>+</sup> T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction / H. Babbe [et.al.] // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192. – P. 393–404.

13. Bagnato, F. Tracking iron in multiple sclerosis: a combined imaging and histopathological study at 7 Tesla / F. Bagnato [et.al.] // *Brain*. – 2011. - Vol. 134. – P. 3602–3615.
14. Barnett, M. H. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion / M.H.Barnett, J.W. Prineas // *Ann. Neurol.* – 2004. – Vol. 55. - P. 458–468.
15. Bedard, K The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology / K. Bedard, K.H. Krause // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 245–313.
16. Bettelli, E. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice / E. Bettelli [et.al.] // *J Clin Invest.* - 2006. – Vol. 116. N9. - P. 2393-402.
17. Black, J.A. Long-term protection of central axons with phenytoin in monophasic and chronic-relapsing EAE / J.A. Black, S. Liu, B.C. Hains [et.al.] // *Brain*. – Vol. 129, 3147–3149 (2006).
18. Brandão, C. Intrathecal Immunoglobulin G Synthesis and Brain Injury by Quantitative MRI in Multiple Sclerosis / C. Brandão, H. Ruocco, A. Farias [et.al.] // *Neuroimmunomodulation*. – 2017. - Vol. 13. N2. - P. 89-95.
19. Calabrese, M. Cortical atrophy is relevant in multiple sclerosis at clinical onset. / M. Calabrese, M. Atzori, V. Bernardi, [et.al.] // *Journal of Neurology*. – 2007. - Vol. 254. N9. - P.1212-1220.
20. Calabrese, M. The association of intrathecal immunoglobulin synthesis and cortical lesions predicts disease activity in clinically isolated syndrome and early relapsing–remitting multiple sclerosis/ M. Calabrese, L. Federle, V. Bernardi [et.al.] // *Multiple Sclerosis Journal*. 2011. – Vol. 18. N2. - P. 174-180.
21. Campbell, G. R. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis / G.R. Campbell [et.al.] // *Ann. Neurol.* – 2011. – Vol. 69. – P. 481–492.
22. Cepok, S. Accumulation of class switched IgD–IgM– memory B cells in the cerebrospinal fluid during neuroinflammation / S. Cepok, G. von Geldern, V.

- Grummel [et.al.] // Journal of Neuroimmunology. – 2010. – Vol.180. N1-2. - P. 33-39.
- 23.Chan, O.T. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus / O.T.Chan [et.al.] // J Exp Med. - 1999. – Vol. 189. N10. P. 1639-4828.
- 24.Chard, D. Grey matter pathology in clinically early multiple sclerosis: Evidence from magnetic resonance imaging / D. Chard, D. Miller // Journal of the Neurological Sciences. – 2007. - Vol. 282. N1-2. - P.5-11.
- 25.Chard, D. Grey matter pathology in clinically early multiple sclerosis: Evidence from magnetic resonance imaging / D. Chard, D. Miller // Journal of the Neurological Sciences. – 2009. – Vol. 282. N.1-2. – P. 5-11.
- 26.Charil, A. Focal cortical atrophy in multiple sclerosis: Relation to lesion load and disability / A. Charil, A. Dagher, J. Lerch [et.al.] // NeuroImage. – 2007. – Vol. 34. N2. - P. 509-517.
- 27.Choi, S. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis / S.Choi, O. Howell, D. Carassiti, [et.al.] // Brain. – 2012. – Vol. 135. N10. - P. 2925-2937.
- 28.Christensen, J. Systemic Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis Involves Follicular T-Helper, Th17- and Activated B-Cells and Correlates with Progression / J.Christensen, L. Börnsen, R. Ratzler [et.al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. N3. – P. e57820.
- 29.Coles, A. Alemtuzumab CARE-MS II 5-year follow-up / A. Coles, J. Cohen, E. Fox [et.al.] // Neurology. – 2017. – Vol. 89. N11. - P. 1117-1126.
- 30.Colombo, M. Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients / M. Colombo [et.al.] // J Immunol. - 2000. – Vol. 164. N5. - P. 2782-9.
- 31.Comabella, M. MRI phenotypes with high neurodegeneration are associated with peripheral blood B-cell changes / M. Comabella, E. Cantó, R. Nurtdinov [et.al.] // Human Molecular Genetics. – 2014 – Vol. 25. N2. - P.308-316.

32. Confavreux, C. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept / C. Confavreux, S. Vukusic // *Brain*. – 2006. – Vol. 129. N3. - P.606-616.
33. Corcione, A. B-cell differentiation in the CNS of patients with multiple sclerosis / A. Corcione [et.al.] // *Autoimmun Rev* – 2005 – Vol. 4. N8. - P. 549-54.
34. Craelius, W., Iron deposits surrounding multiple sclerosis plaques / W. Craelius, M.W. Migdal, P. Luessenhop, A. Sugar, I. Mihalakis // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 1982. – Vol. 106. – P. 397–399.
35. Cristofanilli, M. Cerebrospinal fluid derived from progressive multiple sclerosis patients promotes neuronal and oligodendroglial differentiation of human neural precursor cells in vitro / M. Cristofanilli, B. Cymring, A. Lu [et.al.] // *Neuroscience*. – 2013. – Vol. 250. – P. 614-621
36. Cristofanilli, M. Progressive multiple sclerosis cerebrospinal fluid induces inflammatory demyelination, axonal loss, and astrogliosis in mice / M. Cristofanilli, H. Rosenthal, B. Cymring [et.al.] // *Experimental Neurology*. – 2014. – Vol. 261. - P. 620-632.
37. Cross, A. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients / A. Cross, J. Stark, J. Lauber, M. Ramsbottom, J. Lyons, // *Journal of Neuroimmunology*. 2006. – Vol. 180. N1-2. - P. 63-70.
38. De Stefano, N. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes / N. De Stefano, A. Giorgio, M. Battaglini [et.al.] // *Neurology*. – 2010. – Vol. 74. N23. - P. 1868-1876.
39. De Stefano, N. Establishing pathological cut-offs of brain atrophy rates in multiple sclerosis / N. De Stefano, M. Stromillo, A. Giorgio [et.al.] // *Neurology*. – 2019.- Vol. 43. N2. – P. 666-675.
40. Duddy, M. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis / M.Duddy [et.al.] // *J Immunol*, 2007. 178(10): p. 6092-9.
41. Eggers, E. Clonal relationships of CSF B cells in treatment-naive multiple sclerosis patients / E. Eggers, B. Michel, H. Wu [et.al.] // *JCI Insight*. – 2017. – Vol. 2. N.22.

42. Eisele, P. Investigation of leptomeningeal enhancement in MS: A postcontrast FLAIR MRI study / P. Eisele, M. Griebe, K. Szabo [et.al.] // *Neurology*. – 2015. – Vol. 84. N8. – P. 770-775.
43. Ferreira, D. Multiple sclerosis patients lacking oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid have less global and regional brain atrophy / D. Ferreira, O. Voevodskaya, K. Imrell [et.al.] // *Journal of Neuroimmunology*. – 2014. – Vol. 274. N1-2. - P.149-154.
44. Franciotta, D. B cells and multiple sclerosis / D. Franciotta [et.al.] // *Lancet Neurol*. - 2008. – Vol. 7. N9. – P. 852-8.
45. Freedman, M. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis / M. Freedman, E. Thompson, F. Deisenhammer [et. al.] // *Arch Neurol*. – 2005. – Vol. 62. N6.
46. Friese, M. A. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system / M.A. Friese [et.al.] // *Nat. Med*. – 2007. – Vol. 13. – P.1483–1489.
47. Gaitan, M.I. Evolution of the blood brain barrier in newly forming multiple sclerosis lesions / M.I. Gaitan [et.al.] // *Ann. Neurol*. – 2011. - Vol.70. – P. 22–29.
48. Gajofatto, A. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? / A. Gajofatto, M. Benedett // *World Journal of Clinical Cases*. – 2015. – Vol. 3. N7. – P .545.
49. Giovannoni, G. Is multiple sclerosis a length-dependent central axonopathy? The case for therapeutic lag and the asynchronous progressive MS hypotheses / G.Giovanonni, G. Cutter, M. Sormani, [et.al.] // *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. – 2017. – Vol. 12. - P.70-78.
50. Haas, J. B cells undergo unique compartmentalized redistribution in multiple sclerosis / J.Haas, I. Bekeredjian-Ding, M. Milkova [et.al.] // *Journal of Autoimmunity*. – 2011. – Vol. 37, N4. - P. 289-299.
51. Haider, L. Oxidative damage and neurodegeneration in multiple sclerosis lesions/ L. Haider [et.al.] // *Brain*. – 2011. – Vol. 134. – P. 914–924.

52. Harrison, D.M. Leptomeningeal enhancement at 7T in multiple sclerosis: frequency, morphology, and relationship to cortical volume / D.M. Harrison, K.Y. Wang, J. Fiol [et al.] // *J Neuroimaging*. - 2017. - Vol.27. – P. 461–68
53. Hassan-Smith, G. High sensitivity and specificity of elevated cerebrospinal fluid kappa free light chains in suspected multiple sclerosis / G. Hassan-Smith, L. Durant, A. Tsentemidou, L. Assi [et.al.] // *Journal of Neuroimmunology*. – 2014. – Vol. 276. N1-2. - P. 175-179.
54. Haubold, K. B-lymphocyte and plasma cell clonal expansion in monosymptomatic optic neuritis cerebrospinal fluid / K. Haubold [et.al.] // *Ann Neurol*. - 2004. – Vol. 56. N1. – P. 97-107.
55. Hauser, S. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis / S.Hauser. A. Bar-Or, G. Comi [et.al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Vol. 376. N3. - P. 221-234.
56. Hickey, W.F. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system / W.F. Hickey // *Glia*. - 2001. – Vol. 36. N2. – P. 118-24.
57. Howell, O. W. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis / O.W. Howell [et.al.] // *Brain*. – 2011. – Vol. 134. – P. 2755–2771.
58. Kappos, L. Relapse-associated worsening and progression independent of relapse activity in patients with relapsing multiple sclerosis in the Phase III OPERA I and OPERA II studies / L. Kappos, J.S. Wolinsky , G. Giovannoni [et.al.] // *ECTRIMS Online Library*. – 2018. – Vol. 228391. - P547
59. Kasper, L. Immunomodulatory activity of interferon-beta / L. Kasper, A. Reder // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. – 2014. – Vol. 1. N8. - P. 622-631
60. Kivisäkk, P. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+T cells: Evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin / P. Kivisäkk, D. Mahad, M. Callahan [et.al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. N14. - P. 8389-8394.

61. Kotelnikova, E. Dynamics and heterogeneity of brain damage in multiple sclerosis / E. Kotelnikova, N. Kiani, E. Abad [et.al.] // PLOS Computational Biology. – 2017. – Vol. 13. N10. - P. e1005757.
62. Krämer, J. (2015). Early and Degressive Putamen Atrophy in Multiple Sclerosis / J. Krämer, S. Meuth, J. Tenberge [et.al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16. N10. - P. 23195-23209.
63. Kremenutzky, M. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: Observations on the progressive phase of the disease / M. Kremenutzky, G. Rice, J. Baskerville, D. Wingerchuk, G. Ebers // Brain. – 2006. – Vol. 129. N3. - P.584-594.
64. Krumbholz, M. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma / M. Krumbholz [et.al.] // J Exp Med. - 2005. – Vol. 201, N2. - P. 195-200.
65. Krumbholz, M. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment / M. Krumbholz [et.al.] // Brain. – 2006. – Vol. 129. Pt 1. – P. 200-11.
66. Kuhle, J. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. / J. Kuhle, G. Disanto, R. Dobson [et.al.] // Multiple Sclerosis Journal. – 2015. – Vol. 21. N8. - P.1013-1024.
67. Kutzelnigg, A. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis / A. Kutzelnigg // Brain. – 2015. – Vol. 128. N11. - P. 2705-2712.
68. Lassmann, H. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis / H.Lassmann, J. van Horssen, D. Mahad // Nature Reviews Neurology. – 2012. – Vol. 8. N11. - P. 647-656.
69. Lehmann-Horn, K. B cell repertoire expansion occurs in meningeal ectopic lymphoid tissue / K. Lehmann-Horn, S. Wang, S. Sagan, S. Zamvil, H. von Büdingen, // JCI Insight. – 2016. – Vol. 1. N20.
70. Lisak, R. B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro / R.Lisak, L. Nedelkoska, J. Benjamins, J. [et.al.] // Journal of Neuroimmunology. – 2017. – Vol. 309. - P. 88-99.

71. Lisak, R. Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro / R. Lisak, J. Benjamins, L. Nedelkoska [et.al.] // *Journal of Neuroimmunology*. – 2012. – Vol. 246. N1-2. - P. 85-95.
72. Louveau, A. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels / A. Louveau, I. Smirnov, T. Keyes [et.al.] // *Nature*. – Vol. 523. N.7560. – P. 337-341.
73. Lovato, L. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis / L. Lovato, S. Willis, S. Rodig, S. [et.al.] // *Brain*. – 2011. – Vol. 134. N2. - P. 534-541.
74. Love, S. Oxidative stress in brain ischemia / S. Love // *Brain Pathol*. – 1999. – Vol. 9. – P. 119–131.
75. Lublin, F. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey/ F. Lublin, S. Reingold // *Neurology*. – 1998. – Vol. 46. N4. - P. 907-911.
76. Lublin, F. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions / F. Lublin, S. Reingold, J. Cohen [et.al.] // *Neurology*. – 2014. – Vol. 83. N3. - P. 278-286.
77. Lucchinetti, C.F. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis / C.F. Lucchinetti [et.al.] // *N. Engl. J. Med*. – 2011. – Vol. 365. – P. 2188–2197.
78. Magliozzi, R. A gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis / R. Magliozzi [et.al.] // *Ann. Neurol*. – 2010. – Vol. 68. – P. 477–493.
79. Magliozzi, R. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology / R. Magliozzi [et.al.] // *Brain*. – 2007. – Vol. 130. Pt. 4. - P. 1089-104.
80. Magraner, M. Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes / M. Magraner, I. Bosca M. Simó-Castelló [et.al.] // *Neuroradiology*. – 2011. – Vol. 54. N1. - P.5-12.
81. Mahad, D. J. Mitochondrial changes within in multiple sclerosis / D.J. Mahad [et.al.] // *Brain*. – 2009. – Vol. 132. – P.1161–1174.

82. Mahad, D. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. / D. Mahad, I. Ziabreva, H. Lassmann, D. Turnbull // *Brain*. – 2008. – Vol. 131. – P. 1722–1735.
83. Makshakov, G. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis / G. Makshakov, V. Nazarov, O. Kochetova // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10. N11. – P. e0143375.
84. Makshakov, G. Leptomeningeal Contrast Enhancement Is Associated with Disability Progression and Grey Matter Atrophy in Multiple Sclerosis / G. Makshakov, E. Magonov, N. Totolyan [et.al.] // *Neurology Research International*. – 2017. - P.1-7.
85. Mamourian, A.C. Visualization of intravenously administered contrast material in the CSF on fluid-attenuated inversion-recovery MR images: an in vitro and animal-model investigation / A.C. Mamourian, P.J. Hoopes, L.D. Lewis // *AJNR Am J Neuroradiol*. – 2000. – Vol. 21. – P. 105–111
86. Mancardi, G. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis / G. Mancardi, R. Saccardi // *The Lancet Neurology*. – 2008. – Vol. 7. N7. - P. 626-636.
87. Miller, D.H. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis / D.H. Miller [et.al.] // *Brain*. – 1988. – Vol. 111. – P. 927–939.
88. Myers, K.J. Synergy between encephalitogenic T cells and myelin basic protein-specific antibodies in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis / K.J. Myers [et.al.] // *J Neuroimmunol*. - 1992. – Vol. 41. N1. - P. 1-8.
89. Ouardouz, M. Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: I. GluR6 kainate receptors / M. Ouardouz [et.al.] // *Ann. Neurol*. – 2009. – Vol. 65. – P. 151–159.
90. Piccio, L. Changes in B- and T-Lymphocyte and Chemokine Levels With Rituximab Treatment in Multiple Sclerosis / L. Piccio, R. Naismith, K. Trinkaus [et.al.] // *Arch Neurol*. – 2010. – Vol. 67. N6.

91. Pitzalis, C. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity / G.W. Jones, M. Bombardieri, S.A. Jones // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – Vol. 14. – P. 447.
92. Pollok, K. The chronically inflamed central nervous system provides niches for long-lived plasma cells / K. Pollok, R. Mothes, C. Ulbricht [et.al.] // *Acta Neuropathologica Communications.* – 2012. – Vol. 5. N1.
93. Prineas, J. W. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis / J. Prineas, R.G. Wright // *Lab. Invest.* – 1978. – Vol. 38. – P. 409–421.
94. Puthenparampil, M. BAFF Index and CXCL13 levels in the cerebrospinal fluid associate respectively with intrathecal IgG synthesis and cortical atrophy in multiple sclerosis at clinical onset / M. Puthenparampil, L. Federle, S. Mianze [et.al.] // *Journal of Neuroinflammation.* – 2017. – Vol. 14. N1.
95. Raine, C.S. Multiple sclerosis: a pivotal role for the T cell in lesion development / Raine C.S. // *Neuropathol Appl Neurobiol.* - 1991. – Vol. 174. – P. 265-274.
96. Ransohoff, R.M. Natalizumab for multiple sclerosis / R.M. Ransohoff // *N Engl J Med.* - 2007. – Vol. 356. N25. - P. 2622-9.
97. Rinker, J. Elevated CSF free kappa light chains correlate with disability prognosis in multiple sclerosis / J. Rinker, K. Trinkaus, A. Cross // *Neurology.* – 2006. – Vol. 67. N7. – P. 1288-1290.
98. Ritchie, A.M. Comparative analysis of the CD19+ and CD138+ cell antibody repertoires in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis / A. M. Ritchie [et.al.] // *J Immunol.* - 2004. – Vol. 173. N1. - P. 649-56.
99. Rojas, J. Oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid and increased brain atrophy in early stages of relapsing-remitting multiple sclerosis / J. Rojas, L. Patrucco, S. Tizio, E. Cristiano // *Arq. Neuro-Psiquiatr.* – 2012. - Vol.70. N8. – P.574-577.
100. Rovituso, D. The brain antigen-specific B cell response correlates with glatiramer acetate responsiveness in relapsing-remitting multiple sclerosis patients / D. Rovituso, C. Duffy, M. Schroeter [et.al.] // *Scientific Reports.* – 2015. – Vol.5. N1.

101. Roxburgh, R. Multiple Sclerosis Severity Score: Using disability and disease duration to rate disease severity / R.Roxburgh, S. Seaman, T. Masterman [et.al.] // *Neurology*. – 2005. – Vol. 64. N7. - P. 1144-1151.
102. Schmidt, S. Candidate autoantigens in multiple sclerosis / S. Schmidt // *Mult Scler.* - 1999. – Vol. 5. N3. – P. 147-60.
103. Seamons, A. Endogenous myelin basic protein is presented in the periphery by both dendritic cells and resting B cells with different functional consequences / Seamons, A., A. Perchellet, J. Goverman // *J Immunol.* – 2006. – Vol.177. N4. – P. 2097-2106.
104. Sellebjerg, F. Intrathecal IgG synthesis and autoantibody-secreting cells in multiple sclerosis / F.Sellebjerg, C.V. Jensen, M. Christiansen // *J Neuroimmunol.* – 2000. – Vol.108. N1-2. P. 207-15.
105. Senel, M., Cerebrospinal Fluid Immunoglobulin Kappa Light Chain in Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis / M. Senel, H. Tumani, F. Lauda [et.al.] // *PLoS ONE*. 2014. – Vol. 9. N4. - P. e88680.
106. Serafini, B. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis / B. Serafini [et.al.] // *Brain Pathol.* - 2004. – Vol. 14. N2. – P. 164-74.
107. Steinman, L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. / L. Steinman // *Nat Immunol.* - 2001. – Vol. 2. N9. - P. 762-4.
108. Thompson, A. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria / A. Thompson, B. Banwell, F. Barkhof [et.al] // *The Lancet Neurology*. – 2018. – Vol. 17. N2. - P.162-173.
109. Tintore, M. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis / M.Tintore, A. Rovira, J. Río [et.al.] // *Brain*. – 2015. – Vol. 138. N7. - P.1863-1874.
110. Titelbaum, D. Inter-scanner variability may lead to differences in detection rate of leptomeningeal enhancement on 3D-FLAIR MRI in multiple sclerosis / D. Titelbaum, R. Engisch , E. Schwartz [et.al.] // *ECTRIMS Online Library*. – 2018. – 228324

111. Trojano, M. Real-life impact of early interferon $\beta$  therapy in relapsing multiple sclerosis / M.Trojano, F. Pellegrini, D. Paolicelli [et.al.] // *Annals of Neurology*. – 2009. – Vol. 66. N4. - P. 513-520.
112. Uccelli, A. Unveiling the enigma of the CNS as a B-cell fostering environment / A. Uccelli, F. Aloisi, V. Pistoia // *Trends Immunol.* - 2005. – Vol. 26. N5. - P. 254-9.
113. Van Horsen, J. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis / J. Van Horsen, M.E. Witte, G. Schreibelt, H. de Vries // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1812. – P. 141–150.
114. Van Horsen, J. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression / J. Van Horsen [et.al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – Vol. 45. – P. 1729–1737.
115. van Nierop, K. Human follicular dendritic cells: function, origin and development / K. van Nierop // *Seminars in Immunology*. – 2002. – Vol. 14. N4. – P. 251-257.
116. Weinshenker, B.G. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. / B.G. Weinshenker. [et al.] // *Brain*. - 1989. – Vol. 112. Pt 1. - P. 133-46.
117. Witte, M. E. Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions. / M.E. Witte [et.al.] // *J. Pathol.* – 2009. – Vol. 2. – P. 193–204.
118. Zamboni, J. L. Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis / J.L. Zamboni [et.al.] // *Brain*. – 2011. – Vol. 134. – P. 1901–1913.
119. Zivadinov, R. Evaluation of Leptomeningeal Contrast Enhancement Using Pre-and Postcontrast Subtraction 3D-FLAIR Imaging in Multiple Sclerosis / R. Zivadinov, D. Ramasamy, J. Hagemeyer [et.al.] // *American Journal of Neuroradiology*. – 2018. – Vol. 39. N4. - P. 642-647.
120. Zivadinov, R. Leptomeningeal contrast enhancement is associated with progression of cortical atrophy in MS: A retrospective, pilot, observational

longitudinal study / R. Zivadinov, D. Ramasamy, M. Vaneckova [et.al.] //  
Multiple Sclerosis Journal. – 2016. – Vol. 23. N10. – P. 1336-1345

## Список пациентов

№ п/п	ФИО	№ и/б	год	№ п/п	ФИО	№ и/б	год
1	2	3	4	5	6	7	8
1	А-ва Е.А.	11656	2016	119	Ш-ов Г.А.	11675	2017
2	Б-ва О.З.	57462	2016	120	Л-ко М.С.	18765	2016
3	Б-ва К.З.	67463	2017	121	О-ко Г.Т.	10097	2017
4	Т-ян Н.А.	7564	2016	122	В-ев Р.Л.	54362	2016
5	Н-ов Н.А.	5673	2016	123	Г-ов Г.К.	7765	2016
6	Е-ко Е.П.	7563	2017	124	Т-ец О.К.	54653	2017
7	С-ец Т.А.	9897	2016	125	В-ов Р.Б.	88762	2017
8	Т-на О.М.	8876	2018	126	В-оц А.Р.	11835	2017
9	Ч-ко Е.П.	4352	2016	127	Л-ва Д.И.	65345	2017
10	Б-на А.Ю.	11243	2016	128	В-ва О.Н.	22263	2017
11	Р-ин А.Ю.	11263	2015	129	Д-ва Т.П.	6520	2016
12	А-ин Н.О.	8463	2016	130	Р-ов К.С.	99212	2016
13	А-ко Н.В.	26251	2016	131	В-ев И.Р.	27161	2016
14	Я-ий А.Ф.	27463	2017	132	Ш-ня Н.М.	22178	2016
15	Л-ев А.Т.	11234	2017	133	С-ва Е.В.	19867	2017
16	А-ва О.Ю.	65180	2016	134	Г-ва К.В.	1998	2016
17	А-ва М.А.	10424	2016	135	Р-ва Н.И.	10897	2016
18	Б-ко Н.В.	3530	2016	136	П-ва Ю.Б.	2017	2017
19	Б-ан Е.Н.	64165	2016	137	Д-ая В.И.	2087	2018
20	Б-ов А.И.	59347	2016	138	О-ва Н.В.	44567	2018
21	В-ва Е.О.	11097	2017	139	Я-ес А.С.	8765	2018
22	Д-ик Е.А.	64824	2016	140	М-на Н.И.	66675	2016
23	Ж-ва М.С.	11103	2017	141	Г-ва Е.В.	4532	2016

1	2	3	4	5	6	7	8
24	З-на О.В.	2164	2016	142	С-ин Н.А.	11271	2017
25	К-ва Н.Г.	61284	2016	143	П-га Е.Г.	9535	2016
26	К-ун М.А.	2318	2016	144	П-ва З.И.	59912	2016
27	Л-ов А.В.	1218	2017	145	Р-ко Т.В.	2311	2017
28	Л-ва Т.А.	65517	2016	146	Р-ов Р.Г.	61928	2017
29	М-ва Н.Д.	1565	2016	147	С-ва Н.Д.	42417	2017
30	Н-ая И.А.	1253	2017	148	С-да А.А.	61390	2017
31	А-ко Г.А.	16252	2016	149	Т-ва И.П.	2323	2016
32	Е-ев Р.О.	16251	2016	150	У-ев А.В.	1500	2016
33	М-ов Г.С.	11002	2016	151	Ф-ва Н.И.	1992	2018
34	М-ов С.А.	11172	2017	152	Ч-ев Д.С.	62104	2018
35	М-ва Н.Н.	55645	2016	153	Я-ва Н.С.	1661	2016
36	Л-ко С.Б.	3324	2016	154	Б-ов И.А.	1306	2018
37	А-ев И.А.	22315	2017	155	Б-ва Е.И.	61389	2018
38	Д-ин И.А.	11674	2016	156	Б-ко А.В.	2120	2016
39	Д-ко А.И.	11285	2017	157	Д-ов И.В.	22435	2017
40	А-ев О.Н.	11102	2018	158	К-ва И.В.	11000	2016
41	М-ев Н.В.	11917	2016	159	Ж-ва Е.А.	11442	2016
42	П-ин А.С.	1164	2016	160	Х-ен Т.В.	11632	2016
43	Т-ой Л.Н.	5746	2016	161	В-ен М.К.	56799	2016
44	Д-ий Ф.М.	46352	2016	162	П-ла М.Х.	45217	2016
45	Ш-ин Ф.М.	11675	2018	163	Ш-ин Е.И.	11987	2016
46	Ш-ин А.Ю.	12346	2016	164	К-ва Е.И.	17372	2017
47	О-ко О.И.	11786	2018	165	Б-ко А.Н.	76243	2017
48	Л-ко Д.М.	11524	2017	166	К-ов В.В.	99786	2017
49	Ж-ов Л.Н.	57564	2016	167	Ж-ва Л.П.	92543	2016
50	В-ев И.С.	54624	2016	168	Б-ев Т.С.	11548	2016
51	В-ва Г.Н.	5432	2017	169	Н-ко Г.В.	9987	2016

1	2	3	4	5	6	7	8
52	А-ев О.Н.	7785	2016	170	М-ев Н.О.	764552	2016
53	Б-ин А.В.	61644	2017	171	Л-ин И.С.	62564	2016
54	Г-ин Д.В.	42803	2017	172	М-ва Н.Н	2496	2016
55	Г-ев И.А.	59803	2017	173	М-ов Ф.Е.	61416	2017
56	Д-ик В.Л.	2237	2016	174	М-ян Н.Б.	62118	2016
57	Е-ва Ю.В.	64694	2016	175	Н-ва М.Г.	61559	2017
58	Е-ин Д.Е.	64232	2016	176	Н-ов М.А.	64397	2016
59	Ж-ов Д.С.	11579	2016	177	П-ов В.В.	62128	2016
60	Ж-ва Ю.С.	61457	2017	178	П-ва Д.В.	64289	2018
61	И-ин С.Ю.	9118	2016	179	П-ко И.Н.	61455	2016
62	К-ов С.В.	62616	2016	180	Р-ов В.В.	61125	2016
63	К-ов А.М.	61731	2016	181	Р-на А.С.	63285	2018
64	К-ин С.А.	62120	2016	182	С-на Л.Г.	62478	2016
65	Л-ва А.П.	61856	2017	183	С-ая О.Б.	1829	2016
66	В-ко Г.Р	11270	2016	184	В-ва Л.Р	11264	2016
67	К-ва О.А.	77865	2017	185	К-ич О.И.	77775	2017
68	К-ов В.С.	7665	2016	186	К-на В.И.	17650	2016
69	М-ка Ю.А.	77654	2016	187	М-ев Г.А.	77654	2016
70	Н-ов В.Д.	77998	2016	188	Д-ич А.Д.	70976	2016
71	М-ка К.С.	11656	2016	189	О-ко О.О.	11006	2016
72	А-ев А.А.	77601	2016	190	А-на Г.С.	87603	2016
73	А-ов А.А.	88887	2016	191	Я-ин К.С.	87680	2016
74	М-ск И.А.	11067	2016	192	Ч-ов А.П..	22067	2016
75	С-ин С.Д.	10001	2017	193	Б-ва О.А.	19005	2017
76	П-ин В.В.	1111	2016	194	М-ев Д.А.	10076	2016
77	Р-ий П.И.	17269	2016	195	Р-ко А.Р.	12003	2016
78	С-ов О.Т.	19285	2016	196	С-ич О.О.	18779	2016
79	С-ва С.А.	72099	2017	197	Л-ва К.К.	18765	2017

1	2	3	4	5	6	7	8
80	Б-ко О.В.	71293	2016	198	Б-йн О.Г.	77054	2016
81	Т-ев С.А.	59998	2016	199	Д-ко К.С.	11253	2018
82	Х-ва В.О.	60577	2016	200	О-ва О.Г.	11187	2016
83	Ч-ва Е.Ю.	61537	2017	201	А-ич Л.В.	22765	2017
84	Ч-ва А.А.	62495	2017	202	У-ва О.В.	11108	2016
85	Я-ий В.А.	1713	2016	203	Н-ич Е.Е.	11156	2017
86	Я-ин А.М.	61699	2016	204	Л-ва Н.С.	86756	2016
87	П-ак Б.М.	76401	2017	205	В-ва К.В.	20955	2016
88	Т-ко К.В.	76134	2016	206	О-ва Л.Н.	7564	2016
89	А-ев М.Р.	88765	2016	207	С-ва Л.Н.	87536	2018
90	З-ва М.С.	11726	2018	208	В-ва Л.В.	7562	2018
91	А-ич М.Г.	7765	2016	209	Г-ев С.Н.	11836	2016
92	Г-рг И.Н.	9901	2016	210	К-ов С.Н.	75645	2016
93	М-ев В.С.	76452	2016	211	Л-ев О.Г.	11986	2018
94	К-ев И.В.	67452	2016	212	Д-ко А.А.	6654	2016
95	М-ов Г.В.	65102	2018	213	А-ев Д.Н.	11123	2017
96	Б-ов А.Ю.	7155	2016	214	В-ко Я.Ю.	22835	2016
97	Б-ов И.Б.	88432	2016	215	У-ва Н.Э.	99815	2017
98	М-ов А.С.	18273	2016	216	Д-ян Э.М.	40321	2016
99	М-ов А.А.	10987	2017	217	О-йн Г.Л.	11215	2016
100	М-ец И.Д.	11725	2016	218	А-ва Г.Р.	11524	2016
111	Д-ич И.И.	11726	2016	219	М-ий А.Л.	76594	2017
112	Х-ич И.Д.	77607	2017	220	Л-ин С.В.	11176	2016
113	Ч-ов Ф.Д.	1524	2016	221	Н-ин Ю.А.	19789	201
114	Р-ов Г.Д.	876	2016	222	Д-ов Д.В.	1675	2018
115	С-ко К.Б.	72761	2016	223	П-ов М.П.	44536	2018
116	Л-ко О.Д.	6785	2016	224	Г-ев Л.Т.	66857	2018
117	К-ов О.Ю.	43119	2016	225	А-ов И.А.	2019	2018

118	Г-ва Д.А.	11110	2016	226	Д-ев И.Л.	20210	2018
-----	-----------	-------	------	-----	-----------	-------	------



«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач СПб ГБУЗ Городская  
клиническая больница №31, д.м.н.,  
заслуженный врач РФ  
Рывкин А.Ю.



**АКТ  
О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ В ПРАКТИКУ  
ЛЕЧЕБНОЙ РАБОТЫ**

1. **Наименование предложения:** Способ определения лептоменингеального воспаления у пациентов с рассеянным склерозом с помощью магнитно-резонансной томографии.
2. **Краткая аннотация:** Разработан метод прижизненного определения лептоменингеального воспаления с помощью магнитно-резонансной томографии с использованием импульсной последовательности FLAIR в виде очагов контрастного изменения сигнала. Определена встречаемость данного маркера в популяции пациентов с рассеянным склерозом, определены ассоциации с тяжестью течения заболевания, биомаркерами В-лимфоцитов и выраженностью степени нейродегенеративных изменений и тяжести клинического течения болезни.
3. **Эффект от внедрения:** Разработанный метод позволяет выявлять лептоменингеальное воспаление у пациентов с рассеянным склерозом и может быть использован в качестве биомаркера дальнейших клинических исследований при прогрессирующих формах рассеянного склероза, а также в рутинной клинической практике.
4. **Место и время внедрения:** Поликлиническое отделение №1 по обслуживанию пациентов с рассеянным склерозом и другими демиелинизирующими заболеваниями (Городской центр рассеянного склероза) на базе СПб ГБУЗ Городская клиническая больница №31, 2016-2019 гг.
5. **Форма внедрения:** обследование и лечение пациентов с рассеянным склерозом.
6. **Название темы:** Оценка роли в-лимфоцитов и менингеального воспаления в развитии нейродегенерации и тяжести клинического течения рассеянного склероза

**Автор:**

очный аспирант кафедры неврологии ФГБОУ ВО  
ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России

(Макшаков Г.С.)

**Руководитель базы внедрения:**

Заведующая поликлиническим отделением №1  
по обслуживанию пациентов с рассеянным склерозом  
и другими демиелинизирующими заболеваниями

(Шумилина М.В.)

« 09 » ноября 2020 г.