

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НЕВРОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

*На правах рукописи*  
УДК 616.832-004.2 (577.1)

ВОРОБЬЕВА АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**МАРКЕРЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ  
ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ  
(КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

**14.01.11 – Нервные болезни  
03.01.04 – Биохимия**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:  
доктор медицинских наук

М.Н. Захарова

доктор биологических наук,  
профессор

Н.В. Гуляева

Москва 2014

**Оглавление**

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. Обзор литературы .....	8
Нейродегенерация при РС .....	8
Биомаркеры при РС .....	13
Биомаркеры нейродегенерации.....	14
Аутоантитела к белкам нейрофиламентов и бета-амилоида при РС .....	25
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования .....	29
Общая характеристика пациентов.....	29
Биохимические методы исследования.....	36
Забор и подготовка биологического материала.....	36
Биохимические методы исследования.....	36
Статистическая обработка результатов.....	41
ГЛАВА 3. Результаты исследования.....	42
Исследование белков бета-амилоидов и цепей нейрофиламентов .....	42
Исследование аутоантител к белкам бета-амилоидов и цепям нейрофиламентов.....	55
ГЛАВА 4. Обсуждение результатов.....	56
ВЫВОДЫ .....	74
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	76
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	77
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91

## ВВЕДЕНИЕ

### АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рассеянный склероз (РС) является мультифакториальным, аутоиммунным, хроническим воспалительным демиелинизирующим заболеванием центральной нервной системы (ЦНС). Средний возраст дебюта заболевания составляет 29 лет, соотношение женщин и мужчин среди заболевших обычно приближается к 3:1 [9, 13]. Инвалидизация при РС прежде всего связана с нарушением двигательной функции, нарушением зрения, координации, тазовых функций. РС - вторая по распространенности причина инвалидности среди молодого населения и является не только социально, но и экономически значимым заболеванием [5, 140].

До недавнего времени считалось, что нарушение проводящей функции аксонов при РС происходит только вследствие многоочагового поражения миелиновой оболочки [149]. Однако более поздние исследования показали, что нейродегенерация (то есть невоспалительное повреждение серого и белого вещества головного мозга) имеет место уже на ранних стадиях РС, и играет большое значение в формировании необратимого неврологического дефицита [14, 44, 77, 114]. Более того, выявлены четкие корреляции степени инвалидизации при РС с данными о дегенеративных изменениях головного мозга, в то время как МР-картина воспалительных изменений может существенно диссоциировать с клинической картиной [16, 58]. Данные о патогенезе первичной нейродегенерации при РС крайне немногочисленны, остаются неясными основные причины и механизмы ее развития. Данные исследований, доступных в клинической практике, не позволяют оценить вклад нейродегенеративных изменений в неврологический дефицит конкретного больного, прогнозировать течение заболевания и эффективность терапии.

Стоит отметить, что, несмотря на значительные успехи в терапии РС, все препараты с доказанной эффективностью являются иммуномодуляторами. Проведено большое количество исследований, посвященных эффективности

нейропротективной (нейротрофической) терапии [4, 23, 24, 25, 27, 172]. Однако в многоцентровых исследованиях до настоящего момента ни один препарат, влияющий в первую очередь на нейродегенеративный процесс, не подтвердил своего действия.

Таким образом, разработка маркеров нейродегенерации для оценки динамики и выраженности данного процесса, имеет на настоящий момент большое значение как для уточнения патогенеза заболевания, выявления новых мишеней терапии, так и для клинического представления о природе неврологического дефицита конкретного больного, прогнозирования темпа прогрессирования болезни.

**Цель исследования:** Изучение маркеров нейродегенерации у больных с рассеянным склерозом, определение их иммуногенности и диагностической значимости.

**Задачи исследования:**

1. Определить уровень маркеров аксонопатии тяжелых и легких цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови
2. Исследовать наличие антител к тяжелым и легким цепям нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови
3. Определить уровень бета-амилоида 1-40 и бета-амилоида 1-42 в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови
4. Исследовать наличие антител к бета-амилоиду 1-40 и бета-амилоиду 1-42 в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови
5. Оценить проницаемость гематоэнцефалического барьера по альбуминовому индексу (отношение концентрации альбумина в ликворе к концентрации его в плазме крови)
6. Изучить корреляции полученных биохимических данных и клинических характеристик пациентов

7. На основании полученных данных определить диагностическую значимость исследованных маркеров

#### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА**

Впервые проведено комплексное клинико-биохимическое исследование наиболее изученных на настоящий момент маркеров нейродегенерации, принципиально отличающихся по патофизиологическому механизму образования. Выполнен твердофазный иммуноферментный анализ цереброспинальной жидкости и сыворотки крови на содержание тяжелых и легких цепей нейрофиламентов, бета-амилоидов 1-40 и 1-42 при ремиттирующем рассеянном склерозе, проведено сравнение концентрации данных белков при ремиттирующем рассеянном склерозе, в отсутствие неврологических заболеваний и при боковом амиотрофическом склерозе. Показана гетерогенность биохимических параметров нейродегенеративного процесса, в зависимости от стадии активности воспалительного процесса.

#### **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Установлено достоверное отличие фазы обострения и ремиссии РС по уровню бета-амилоидов 1-40 и 1-42. Получено биохимическое подтверждение деструкции аксона во все фазы заболевания. Данные результаты позволяют более точно оценить выраженность нейродегенеративного процесса в каждом клиническом случае, понять причину необратимого неврологического дефицита, что может быть полезным в прогнозировании степени инвалидизации пациента.

#### **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

1. Нейродегенерация уже на ранних стадиях РС может быть подтверждена при биохимическом анализе ЦСЖ изменением уровня структурных компонентов цитоскелета и продуктов расщепления трансмембранных белков

2. Нейродегенеративный процесс протекает неодинаково в различные фазы заболевания: в острой стадии воспаления в процессе нейродегенерации происходит не только деструкция аксона, но и метаболические изменения в их мембранах
3. Деструкция аксона имеет место как в острую фазу нейровоспалительного процесса, так и в период его ремиссии
4. Уровень структурных компонентов цитоскелета нейрона в ЦСЖ отражает выраженность нейродегенерации при РС и позволяет провести сравнение по данному параметру с БАС
5. Соотношение маркеров непосредственной деструкции аксона и маркеров метаболических изменений характерных для РС может иметь диагностическое значение.

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НЦН» РАМН. Протокол № 5/12 от 11.03.2012г.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ:**

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на расширенном заседании научных сотрудников 2, 3, 5, 6 неврологических отделений, отделения реанимации и интенсивной терапии, научно-консультативного отделения, отделения лучевой диагностики, лаборатории ультразвуковых исследований ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН и лаборатории функциональной биохимии нервной системы Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук 23 июня 2014 года.

Материалы диссертации были представлены на: II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012), 24<sup>th</sup> Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the American Society for Neurochemistry (ASN) (Cancun, Mexico, 2013), VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции (Новосибирск, 2013), XIX всероссийская

конференция «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» (Санкт-Петербург, 2013), XXI World Congress of Neurology (Vienna, 2013), European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) (Copenhagen, 2013), I Национальной конференции с международным участием «От фундаментальной неврологической науки к клинике» (Москва, 2014), Joint Congress of European Neurology (Istanbul, 2014).

Полученные результаты внедрены в практику работы 6 неврологического отделения ФГБУ «НЦН» РАМН.

## ГЛАВА 1

### Обзор литературы

#### *Нейродегенерация при РС*

В 85% и более случаев заболевания имеет место ремиттирующее течение (РРС), то есть чередование периодов обострений, проявляющихся в клинике острой или подострой неврологической симптоматикой, и периодов ремиссии, когда происходит регресс неврологического дефицита [17]. Симптомы в период ремиссии могут регрессировать не полностью, такой остаточный дефицит объясняется необратимым повреждением аксона в период обострения [43]. В оставшихся 15% случаях симптомы многоочагового поражения ЦНС появляются постепенно, без четких обострений и ремиссий, такое течение заболевания называют первичнопрогредиентным (ППРС). У больных с РРС через несколько лет течение заболевания, как правило, становится все более приближенным к паттерну прогредиентного прогрессирования, такой вариант РС принято называть вторичнопрогредиентным (ВПРС) [10]. Таким образом, значение нейродегенерации в патогенезе РС было известно уже на этапе клинических наблюдений и патоморфологических исследований [22]. На поздних же стадиях заболевания нейродегенеративные изменения продолжают происходить даже в отсутствии воспалительной активности [61].

С развитием методов исследования нейродегенерация на ранних стадиях РС получила большое количество дополнительных подтверждений.

МР - исследование позволило накопить данные о нейродегенеративном процессе как нейровизуализационном феномене [26]. Нейродегенеративные изменения белого вещества в очагах воспаления подтверждаются снижением интенсивности сигнала в T1 режиме, то есть увеличением доли жидкостного составляющего в участке паренхимы, при выполнении исследования после регресса острой воспалительной инфильтрации. Относительное уменьшение объема головного мозга при РС происходит диффузно, без преимущественного

вовлечения отдельных анатомических структур. Снижение объема головного мозга начинается уже на ранней стадии заболевания и не ассоциировано напрямую с локальным повреждением белого вещества [56, 71]. МРТ исследования позволили выявить уменьшение объема спинного мозга у пациентов с очагами демиелинизации в головном мозге еще на доклинической стадии заболевания [48].

Методом МР-спектроскопии *in vivo* было обнаружено снижение количества N-ацетиласпартата в неизмененном на T2 белом веществе, что подтверждает деструкцию аксонов вне очагов воспаления при РС [11, 57].

Методом оптической когерентной томографии сетчатки было показано, что при РС изменения аксонов сетчатки происходят даже при отсутствии анамнестических данных о перенесенном оптическом неврите. Более того, было выявлено, что толщина волокон сетчатки коррелируют с тяжестью неврологического дефицита и данными МР-спектроскопии о степени диффузной дегенерации белого вещества головного мозга [11, 12].

Цитологическое и гистологическое исследования бляшек демиелинизации позволяют обнаружить признаки патологии аксонов в них уже на самых ранних стадиях заболевания: увеличенные дистальные окончания прерванных аксонов являются следствием накоплением в них по-прежнему антероградно транспортируемых белков и органелл, отмечается также уменьшение диаметра поперечных сечений аксонов [133, 185]. Гистохимически показано, что необратимое повреждение аксонов происходит уже на этапе воспаления, однако в стадию регресса воспалительных изменений число поврежденных аксонов продолжает расти [18, 170]. При сравнении плотности аксональных волокон в шейном отделе спинного мозга (вне очаговых изменений) и в области хронических бляшек демиелинизации у пациентов с длительным анамнезом болезни, значимого отличия выявлено не было, что подтверждает Валлеровскую дегенерацию аксонов при длительном хроническом воспалении [74]. Необходимо также отметить, что ранним маркером аксонального повреждения является увеличение экспрессии на

аксональной мембране белка предшественника амилоида (БПА), которое при РС пропорционально интенсивности Т-лимфоцитарной инфильтрации [103].

Принято выделять острое аксональное повреждение при РС, то есть происходящее непосредственно во время воспаления, и хроническую аксональную дегенерацию, развивающуюся в последующем.

Наиболее вероятной причиной повреждения аксона в острый период воспаления кажется воздействие протеолитических ферментов, цитокинов, продуктов окислительного стресса и свободных радикалов, продуцируемых активированными клетками глии и лимфоцитами [1, 6, 19, 21, 48].

Возможные причины хронической аксональной дегенерации также продолжают широко изучаться.

Одной из таких причин является митохондриальная дисфункция. Митохондрии - основной источник энергии для клеток, и нарушение митохондриальных комплексов окислительного фосфорилирования приводит к гибели клетки. Нарушение работы данного вида органелл показано при таких нейродегенеративных заболеваниях как болезнь Паркинсона и болезнь Гентингтона [87, 94]. Энергетические затраты нейрона на проведение импульса в условиях демиелинизации возрастают, однако клетки не всегда могут быть обеспечены энергией достаточно из-за воспалительного повреждения дыхательных комплексов.

При демиелинизации нарушается сальтаторное проведение по аксонам, так как происходит перераспределение натриевых каналов Nav1.6 и Nav1.2, ранее локализованных в перехватах Ранвье, по всему волокну [45]. Повышенная энергопотребность нейрона приводит к нарушению ионного гомеостаза в аксоне, накоплению натрия и кальция [55]. Кальций активирует внутриклеточные протеазы, что приводит к повреждению микротрубочек и других структур клеток. При воспалении кальций также высвобождается в интрацеллюлярное пространство из внутриклеточных компартментов (эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи). В результате повышенного уровня кальция происходит сенсбилизация NMDA-рецепторов.

При ЭАЭ все эти процессы приводят к перегрузке нейрона кальцием и его гибели [137, 166]. Роль кальция доказана в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний [2]. На модели ЭАЭ показано вовлечение кальций-зависимой кальпаиновой системы внутриклеточных протеаз в процесс воспаления нервной ткани [20]. В активированных макрофагах и клетках микроглии также увеличивается экспрессия натриевых каналов [54, 132]. Блокировка этих каналов фенитоином, например, приводит к уменьшению инфильтрации воспалительными клетками в очагах демиелинизации. На моделях животных были исследованы другие блокаторы натриевых каналов: сафинамид и флекаинид; было выявлено уменьшение активности макрофагов и микроглии, уменьшение выраженности симптомов [132]. Блокаторы натриевых каналов были рассмотрены как потенциальные иммуномодулирующие препараты. Ламотриджин, блокатор натриевых каналов, одобренный для терапии эпилепсии, также показал положительный эффект при ЭАЭ, в цитогистологическом исследованиях препарат продемонстрировал также нейропротекторное действие [40]. Однако, в клиническом исследовании ламотриджин в сравнении с плацебо не оказал эффекта на течение РС. Таким образом, роль ионных каналов аксонов и воспалительных клеток доказана в патогенезе демиелинизирующих заболеваний, но для достижения клинического эффекта только ингибирования этих каналов оказывается недостаточно [32].

Существуют также доказательства роли калиевых каналов в патогенезе РС. Кислото-чувствительные калиевые каналы 1 (TASK1) – это мембранные протеины, экспрессируемые Т-клетками и нейронами, работающие как калиевые каналы [42, 125]. Их действие особенно важно для поддержания потенциала покоя клетки. При фармакологическом выключении данных каналов или в случае нокаутированных по гену канала животных активация Т-клеток происходит в меньшей степени, также уменьшается степень нейродегенерации при ЭАЭ.

Кислото-сенсibiliзируемые ионные каналы 1 (ASIC-1) - мембранные белки нейронов, открывающиеся при снижении рН ткани, то есть в том числе и

при остром воспалении. Через эти каналы в очаге воспаления в нейрон поступают натрий и кальций [188, 191]. У мышей нокаутированных по гену ASIC-1 при ЭАЭ симптомы воспаления выражены в меньшей степени и нейродегенерация развивается медленнее. Применение специфического блокатора данных каналов, амилорида (препарата одобренного для лечения гипертонической болезни) при ЭАЭ уменьшает выраженность симптомов и приводит к уменьшению олигодендро – и нейронопатии [73]. Также показано, что в очагах демиелинизации повышена экспрессия протеина ASIC-1, что подтверждает вовлеченность данного канала в развитии патологического процесса [184].

Как при РС, так и при ЭАЭ выявлена также повышенная экспрессия потенциал-зависимого рецептора меластатина (TRPM4) [163]. Этот канал может быть активирован повышенным уровнем кальция или пониженным уровнем АТФ в цитоплазме клетки. Оба из указанных триггерных процессов имеют место в клетках на ранних этапах развития демиелинизации. Активация канала приводит в основном к повышению уровня интрацеллюлярного натрия. Антагонистом TRPM4 является препарат для лечения сахарного диабета, глибенкламид. Применение глибенкламида у мышей с ЭАЭ снижает активность воспалительного процесса, уменьшает проявления нейродегенерации [163].

Во многих исследованиях показано значительное изменение соотношения нейротрансмиттеров и трофических факторов при РС. BDNF (brain-derived neurotrophic factor), например, влияет на процессы роста аксонов и пластичности синапсов ЦНС. Важно, что BDNF синтезируется не только нейронами, но и Т- и В-лимфоцитами. Повышение синтеза BDNF лимфоцитами происходит при терапии глатирамер ацетатом.

Глутамат индуцируемая эксайтотоксичность –важнейший пример связи процессов нейровоспаления и нейродегенерации. Глутамат является основным возбуждающим медиатором ЦНС. Данная аминокислота влияет на ионный гомеостаз клетки путем NMDA и AMPA рецепторов, приводя к повышению уровня внутриклеточного кальция [192]. Повышенный уровень глутамата был

выявлен в активных бляшках демиелинизации при РС, было подтверждено его влияние на степень повреждения аксонов и олигодендроцитов [173]. Источником глутамата при тех или других патологических состояниях могут быть разнообразные клетки: нейроны, астроциты, иммунные клетки [123, 148]. Изменение экспрессии рецепторов глутамата олигодендроцитами показано в активных бляшках РС [134].

Применение блокаторов рецепторов глутамата при ЭАЭ приводит к уменьшению повреждения аксонов и олигодендроцитов [137, 148, 166]. В исследованиях также показано снижение внутриклеточного уровня кальция, что косвенно подтверждает роль глутамата в прогрессировании заболевания. Известно два одобренных для применения в терапии блокаторов NMDA-рецепторов: мемантин, препарат для лечения когнитивных расстройств при болезни Альцгеймера, и амантадин, препарат для лечения проявлений болезни Паркинсона. На настоящий момент продолжаются клинические исследования мемантина и амантадина при РС [66, 186].

Таким образом, РС это гетерогенное заболевание, в патогенезе которого важнейшее значение имеет взаимодействие процессов нейровоспаления и нейродегенерации. Повреждение аксона и нейрона может являться прямым и опосредованным следствием воспалительного процесса. На настоящий момент разработан ряд препаратов, влияющих на различные этапы воспалительного процесса, однако эффективной терапии, направленной на коррекцию нейродегенеративных изменений, на настоящий момент не разработано.

### *Биомаркеры при РС*

Биомаркерами называют поддающиеся количественному определению параметры (например, концентрация фермента, присутствие в биологических жидкостях определенных веществ), которые служат для оценки физиологических и патологических процессов в организме, таких как риск возникновения заболевания, воздействие внешних факторов и др.

В настоящее время продолжается активный поиск биомаркеров РС, способных предсказать и оценить темп прогрессирования заболевания, помочь

в определении тактики лечения и оценить его эффективность, прояснить во многом еще неизученный патогенез заболевания и, наконец, выявить новые мишени для терапии. Кроме того, учитывая неспецифичность клинических проявлений РС, также исследуются диагностические маркеры, позволяющие выявить заболевание на максимально раннем этапе развития и своевременно начать патогенетическую терапию.

### *Биомаркеры нейродегенерации*

Биомаркерами нейродегенерации могут быть продукты деструкции аксонов, продукты изменения метаболизма и специфические протеины цитоплазмы нейронов.

В результате деструкции аксона в межклеточное пространство попадают в большом количестве структурные элементы цитоскелета. На настоящий момент в практику введены методы определения в биологических жидкостях маркеров нейродегенерации, являющихся именно структурными элементами, а именно, цепей нейрофиламентов. Другой значимый компонент цитоскелета – микротрубочки, которые состоят из альфа и бета-субъединиц тубулина. С микротрубочками и микрофиламентом актином ассоциирован тау-белок. Повышение уровня тубулина и актина в ЦСЖ выявлено при прогрессивных формах РС, но не при ремиттирующем течении заболевания. В случае прогрессивного течения заболевания уровень тубулина и актина в ЦСЖ коррелирует с инвалидизацией и оценкой по шкале EDSS [165]. Тау-протеин играет важную роль в сборке и стабилизации структуры микротрубочек. Повышение уровня данного белка в ЦСЖ описано при болезни Альцгеймера [38]. Тау-белок также содержится в небольшом количестве в глиальных клетках. Было сделано предположение, что повышение уровня тау-протеина имеет место и при РС, однако однозначных корреляций уровня протеина с активностью заболевания и неврологическим дефицитом не выявлено, результаты проведенных исследований противоречивы [179]. Повышенный уровень тау-протеина и ФНФТ был выявлен и в дебюте заболевания, для ФНФТ показано большая в сравнении с МРТ прогностическая значимость [46].

Изменение метаболизма при дегенеративных процессах отражают появление продуктов расщепления белка предшественника бета-амилоида (БПА): бета-амилоида 1-40 и бета-амилоида 1-42.

Белок 14-3-3 – цитоплазматический высокорастворимый протеин, содержащийся в большинстве тканей млекопитающих. Повышение белка 14-3-3 характерно для болезни Крейтцфельдта-Якоба. Уровень белка 14-3-3 также доступен детекции в ЦСЖ при РРС, однако прогностическая его значимость остается неясной, а низкая концентрация делает его изучение пока труднодоступным [179]. В цитоплазме нейрона и в меньшей степени в аксоне содержится гамма-изоформа нейронспецифической енолазы. Данный фермент широко изучался как маркер нейронального повреждения при РС, однако значимых отличий от контроля получено не было [108].

#### *Цепи нейрофиламентов*

Цитоскелет нейрона состоит из пяти протеинов. В нейронах взрослого организма содержатся тяжелые, средние и легкие цепи нейрофиламентов (ФНФТ, ФНФС, НФЛ). Номенклатура основана на молекулярном весе протеинов: 68 кДА, 150 кДА, 200кДА, соответственно. Четвертый протеин, компонент нейронального цитоскелета, - альфа интернексин, был открыт позже путем более тщательной очистки цепей нейрофиламентов. Пятый протеин, периферин, представлен в основном в периферических волокнах. Благодаря специфичному содержанию именно в отростках нейронов и относительно большому количеству данных белков в клетке, именно нейрофиламенты могут быть использованы как биомаркеры нейродегенерации, то есть деструкции аксона при различных патологиях нервной системы [67].

При болезни Альцгеймера показана постоянность концентрации ФНФТ и ФНФС в ЦСЖ с течением заболевания [75], в случае БАС показана диагностическая и прогностическая значимость уровня ФНФТ [120], содержание ФНФТ в ЦСЖ повышается при гнойном менингите [75], при опухолевом поражении головного мозга, ишемическом инсульте и закрытой черепно-мозговой травме [146], при ВИЧ-инфекции уровень НФЛ отражает

эффективность антиретровирусной терапии [124]. По нейрофиламентам, как маркерам нейродегенерации при демиелинизирующих заболеваниях, на данный момент выполнены следующие исследования (Таблица 1).

Таблица 1. Исследования по нейрофиламентам в ЦСЖ, как маркерам нейродегенерации при демиелинизирующих заболеваниях.

№	НФ	Год публикации	Количество пациентов			Основной вывод
			с РС	с ОМ	с ОРЭМ	
116	НФЛ	1998	60			Уровень выше, чем в контрольной группе; коррелирует с EDSS
86	НФЛ	2004	47			Уровень выше, чем в контрольной группе
118	НФЛ	2003	66			Уровень превышает таковой в контрольной группе во всех фазах заболевания, достигает максимума в фазу обострения
138	НФЛ	2003	47			Уровень выше, чем в контрольной группе
193	НФЛ	2007	63	15		Уровень при ОМ выше, чем в контрольной группе, не отличается от РС
129	ФНФТ	2007	24	24		Уровень при ОМ выше, чем при РС
162	НФЛ	2010	99			Показана прогностическая значимость
177	ФНФТ	2010	27	33	6	Уровень при РС и ОМ не отличаются, при ОРЭМ выше, чем при РС
105	ФНФТ	2010	95			Уровень выше, чем в контрольной группе
35	НФЛ	2012	67			Уровень выше, чем в контрольной группе
97	ФНФТ	2013	67			Положительная корреляция с неврологическим дефицитом и уменьшением объема головного мозга в течение последующего года
69	НФЛ	2013	62			Уровень выше, чем в контрольной группе
70	ФНФТ	2013	62			Разница не выявлена
52	НФЛ	2014	44			Коррелируют с данными МРТ по степени дегенерации
36	НФЛ	2014	35			Отражает эффективность иммуносупрессивной терапии
195	ФНФТ	2014	36	5	7	Значимое отличие групп РС, ОРЭМ и БАС от контрольной, причем группы РС, ОРЭМ и БАС между собой значимо не отличались.

№ - номер публикации в списке литературы

Следует обратить внимание на большую вариабельность абсолютных значений концентрации нейрофиламентов в ЦСЖ, полученных в исследованиях. Так уровень НФЛ варьирует от 26нг/л до 2500нг/л, ФНФТ – от 51 нг/л до 600 нг/л. Такой разброс данных свидетельствует о нестандартизованности метода в лабораториях. В 2010г большой исследовательской группой была предпринята попытка валидации ИФА для определения количественного содержания НФЛ в 35 лабораториях набором реактивов одного производителя. Межлабораторный коэффициент вариабельности в данном исследовании составил 59%, после устранения допущенных отклонений в протоколе выполнения исследования коэффициент вариабельности снизился до 14%. Таким образом, учитывая выполнения исследований приведенных в Таблице №1 различными тест-системами в различных лабораториях мира, объяснимо, что вариабельность результатов очень высока [144].

В сравнении с ЦСЖ сыворотка крови является более доступным биологическим материалом. Ее получение является гораздо менее инвазивной процедурой, выполнение которой не требует условий стационара. В связи с этим исследования по содержанию нейрофиламентов в сыворотке крови пациентов с демиелинизирующими заболеваниями представляют также большой интерес. Выполненные на настоящий момент исследования уровня нейрофиламентов в сыворотке крови при демиелинизирующих заболеваниях приведены в таблице 2.

Таблица 2. Исследования уровня нейрофиламентов в сыворотке крови при демиелинизирующих заболеваниях.

№	НФ	Год публикации	Заболевание	Количество пациентов	Основной вывод
193	НФЛ	2007	РС	78	Ниже предела детекции
141	ФНФТ	2010	Оптический неврит, РС	457	Коррелирует с тяжестью повреждения
145	ФНФТ	2012	Оптико-миелит	48	Превышает уровень в группах оптического неврита и РС
69	НФЛ	2013	РС	62	Ниже предела детекции
70	ФНФТ	2013	РС	62	Ниже предела детекции
82	ФНФТ	2014	Р	100	Уровень при РС не отличался от контроля

№ - номер публикации в списке литературы

Таким образом, исследования уровня нейрофиламентов в сыворотке крови крайне немногочисленны и в большинстве случаев при РС уровень нейрофиламентов в сыворотке крови оказывался на пределе или ниже уровня детекции. Принимая во внимание низкую точность метода ИФА в области крайне низких и крайне высоких значений, можно заключить, что достоверно определить концентрацию нейрофиламентов в сыворотке крови больных с РС методом ИФА до настоящего времени не удалось.

#### *Белки бета-амилоида*

Протеины бета-амилоиды формируются из белка предшественника бета-амилоида (БПА). БПА представляет из себя трансмембранный протеин с большим экстрацеллюлярным N-концом и цитоплазматическим C-участком,

состоящим из 59 аминокислотных остатков [157]. БПА синтезируется всеми тканями организма, в том числе нейронами ЦНС. Ген белка БПА локализован на длинном плече 21-ой хромосомы. В результате сплайсинга может формироваться 8 изоформ БПА, размеры которых варьируют от 365 до 770. Самыми распространенными формами являются белки состоящие из 695, 751 и 770 аминокислот. Прошедший сплайсинг белок антероградно транспортируется из тела нейрона в аксон. С того момента как было выяснено, что БПА является предшественником бета-амилоидов, было сделано много предположений о роли самого БПА. В 1993г было сделано предположение о том, что интрацеллюлярный домен БПА является рецептором, ассоциированным с ГТФ-связывающим протеином, в многочисленных исследованиях показан его положительный эффект на жизнеспособность клеток и их рост [50, 179]. Возможно, что интрацеллюлярный фрагмент БПА является лигандом ядерного рецептора, и участвует в регуляции транскрипции подобно трансмембранному белку Notch. В то же время показано, что данный интрацеллюлярный фрагмент может быть нейротоксичен [98]. В 2009г показано, что повышение экспрессии БПА приводит к увеличению числа нейронов средних размеров и уменьшению числа нейронов малых размеров [111]. Также выявлена роль БПА в формировании синапсов и миграции нейронов [109, 126, 158, 182]. БПА подвергается ферментативному расщеплению в клетках ЦНС в норме и патологии. Альфа-секретаза расщепляет БПА таким образом, что дальнейший метаболизм идет по не амилоидогенному пути: приводит к формированию растворимых амилоидов. БПА может быть также расщеплен бета-секретазой (BACE1,  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1) на растворимый бета-БПА и остающийся в цитоплазме 99-аминокислотный фрагмент. Данный фрагмент может быть подвержен далее действию гамма секретазы, что приводит в образованию бета-амилоидов 1-40 и 1-42 [34]. В 2009г было сделано предположение о том, что эктодомен БПА может быть лигандом DRP6 (протеина рецептора смерти 6) и, связываясь с ним, активировать каспазы 3 и 6, индуцируя таким образом апоптоз [136].

Для понимания физиологической роли бета-амилоида выполнено много исследований. В 1991г продемонстрировано, что введение бета-амилоида в пиколярных, то есть физиологичных, концентрациях приводит к улучшению обучения и запоминания у мышей [131, 151]. Применение же антител к амилоиду – бета приводит к снижению способности обучаться у мышей, крыс и кур [92, 127, 131].

Активация фосфоинозитол – 3 – киназы - важный биохимический этап в формировании памяти. Пиколярные концентрации бета-амилоида активируют фосфоинозитол – 3 – киназу, в то время как микролярные концентрации ингибируют активность данного фермента [37, 115]. Бета-амилоид активирует никотиновые рецепторы ацетилхолина и увеличивает их экспрессию в клетках гиппокампа [131, 143]. Также низкие дозы бета-амилоида приводят к большей разветвленности дендритоподобных отростков, усиливает жизнеспособность клеток и миграционную активность нейронов [102, 131, 143]. Накоплено большое количество данных о прямом и опосредованном влиянии бета-амилоида на функцию митохондрий. Бета-амилоид может быть транспортирован в митохондрию специфическим белком ТОММО40 (Translocase of the Outer Mitochondria Membrane Homolog) [175]. Увеличение продукции БПА приводит к снижению активности и ТОММО40, и, соответственно, уменьшению активности транспортировки бета-амилоида в цитоплазму митохондрии [181]. В эндоплазматическом ретикулуме нейронов, астроцитов и глиальных клеток амилоид активирует NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), что приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов и нарушению функционирования митохондриальной ДНК. Последнее влечет ингибирование комплекса I со снижением соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН, уменьшению продукции АТФ, снижению активности цитохрома, потребления кислорода и утилизации глюкозы [153]. Бета-амилоид также приводит к увеличению продукции Drp-I (dynamin-related protein-1) и увеличению S-нитрозилирования Drp (посредством свободнорадикального механизма), что приводит к уменьшению активности

комплекса I. Нарушение нормального функционирования цепи транспорта электронов приводит к повышенной продукции реактивных форм кислорода и соединений азота, что в свою очередь приводит к оксидативному повреждению [62]. Оксидативное повреждение приводит к гиперфосфолированию тау-протеина и снижению транспорта митохондрий [155]. Бета-амилоид повреждает динамин-подобный протеин, что посредством Drp-1, приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий и даже фрагментации данной органеллы [189]. Бета-амилоид также снижает активность транспорта кальция [121].

Все эти данные о патологии митохондрий при изменении метаболизма БПА важны в контексте выявленной роли митохондрий при демиелинизирующем процессе, как было описано выше.

При болезни Альцгеймера бета-амилоид 1-42 аккумулируется в ткани мозга в виде нерастворимых бляшек, вероятно этот факт объясняет снижение уровня растворимого бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ при болезни Альцгеймера [87]. Изменение уровня данного протеина имеет прогностическое значение при умеренных когнитивных нарушениях [30]. Причина аккумуляции данного протеина не выяснена, наиболее вероятной кажется нарушение его выведения из ЦСЖ в кровотоки через ГЭБ [59, 65, 93].

Изменения в метаболизме белков бета-амилоида продолжают изучаться при многих патологиях и в норме. Было показано, что у здоровых добровольцев концентрация бета-амилоида 1-42 коррелирует с сохранностью белого вещества головного мозга [78], физиологично не снижается в утренние часы при депривации ночного сна, изменяется при приеме антидепрессантов [139]. При дисциркуляторной энцефалопатии также происходит снижение уровня бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ [96]. У больных с БАС в одном из исследований было выявлено сравнимое с болезнью Альцгеймера снижение концентрации бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ [168], однако в последующих исследованиях данные не получили подтверждения [174]. На модели БАС (мыши с мутацией

SOD1(G93A) ) выявлено, что уже в начале заболевания происходит накопление БПА и бета-амилоидов в нейронах и глиальных клетках [51].

При РС синтез БПА в нейронах увеличивается, также возрастает мобильность мембранной бета-секретазы, участвующей в формировании нейротоксичного бета-амилоида 1-42 и бета -амилоида 1-40, чаще ассоциированного с микроангиопатией [79, 90, 112].

При гистохимическом исследовании в норме БПА большей частью обнаруживается в стенках сосудов, в олигодендроцитах и нейронах. В области же активных бляшек демиелинизации уровень БПА был значительно выше, белок определялся в Т-лимфоцитах, пенистых макрофагах, активированных клетках микроглии и астроцитах. В области угасающих бляшек отмечено снижение общего количества БПА, отсрочено он продолжал экспрессироваться в астроцитах и их отростках, в меньшей степени в макрофагах и клетках микроглии. Данные результаты продемонстрировали, что синтез БПА индуцируется в клетках глии и Т-лимфоцитах в условиях воспаления [76]. Также показаны протективные свойства бета-амилоида при воспалении: на примере ЭАЭ выявлено, что введение бета-амилоида приводит к уменьшению степени выраженности парезов и распространенности воспалительных изменений путем ингибирования активированных лимфоцитов [80]. При морфологическом исследовании выявлено, что в области бляшек демиелинизации в периферической части аксона происходит аккумуляция БПА, аналогичная происходящей при травматическом повреждении белого вещества головного и спинного мозга, при чем данное изменение характерно исключительно для активных бляшек, то есть для острой фазы воспалительного процесса [68, 103, 106, 119].

Выполненные на настоящий момент исследования уровня бета-амилоида 1-40 и бета-амилоида 1-42 в сыворотке крови при демиелинизирующих заболеваниях приведены в таблице 3.

Таблица 3. Исследования уровня бета-амилоида 1-40 и 1-42 в ЦСЖ при демиелинизирующих заболеваниях.

№	Бета-амилоид	Год публикации	Количество пациентов с РС	Основной вывод
89	1-40 1-42	2008	21	Уровень не отличался от контрольной группы
183	1-42	2008	23	Уровень при РС выше, чем в контрольной группе
169	Не указано	2011	65	Уровень бета-амилоида при РС ниже, чем в контрольной группе
130	1-42	2011	30	Уровень при РС ниже, чем в контрольной группе
176	142	2013	27	Уровень не отличался от контрольной группы
122	1-42	2009	66	Уровень при РС ниже, чем в контрольной группе
117	1-42	2011	42	Уровень не отличался от контрольной группы
34	1-42	2013	33	Уровень при ВПРС ниже, чем в контрольной группе, при РРС от контроля не отличается.
128	1-42 1-40	2011	37	При ОРС уровень обоих пептидов ниже, чем в контрольной группе

№ - номер публикации в списке литературы

Следует также иметь в виду, что не во всех приведенных в таблице 3 исследованиях четко детерминирована фаза заболевания (ремиссия или обострение), в которую проводился забор материала у пациентов. Вариабельность значений концентраций бета-амилоидов также как и нейрофиламентов была значительной: бета-амилоид 1-42 - от 230 до 911 пг/мл, бета-амилоид 1-40 - от 267 до 5883 пг/мл

В сыворотке крови продукты метаболизма БПА определялись в следующих исследованиях: методом ИФА выявлено, что соотношение бета-амилоида 1-40и 1-42 отличается от контрольной группы при депрессии [99]; этим же методом выявлено, что уровень бета-амилоида 1-40 в сыворотке крови повышается при инсульте [110].

#### *Аутоантитела к белкам нейрофиламентов и бета-амилоида при РС*

В основе патогенеза РС лежит аутоиммунная реакция, в связи с чем огромное значение имеет изучение аутоантител и аутоантигенов, имеющих значение в развитии заболевания и его прогрессировании. Вовлечение аутоантител в патогенез заболевания бесспорно подтверждается обнаружением комплексов антитело-антиген в макрофагах активных бляшек при РС [161, 113], выявлением олигоклональных интрацеллюлярно синтезируемых антител.

Однако специфический аутоиммунный маркер аутоиммунного заболевания нервной системы открыт на настоящий момент только один – это антитела к аквапорину-4 при оптикомиелите Девика [194, 196]. При РС в качестве ключевых аутоантигенов рассматривались многие белки олигодендроцитов: основной белок миелина [156], олигодендроцитарный белок миелина [60], протеолипидный белок миелина [23, 81]. Однако далеко не во всех случаях удается детерминировать аутоантитела к белкам миелина, к тому же они могут определяться и при других демиелинизирующих заболеваниях, например при ОРЭМ и изолированном оптическом неврите. В процессе нейродегенерации происходит разрушение клеток и иммуннокомпетентным клеткам могут быть презентированы новые антигены интрацеллюлярных структур. При условии иммунной сенсбилизации новые аутоантигены могут

потенцировать аутоиммунную реакцию и провоцировать дальнейшее развитие заболевания. Аутоантитела к продуктам деструкции клеток при РС были определены во многих проведенных исследованиях. Результаты исследований аутоантител к цепям нейрофиламентов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Исследования аутоантител к нейрофиламентам при демиелинизирующих заболеваниях.

№	Антитела	Год публикации	Количество пациентов с РС	Основной вывод
167	анти-ФНФТ, анти-НФЛ	2002	67	Анти-НФЛ повышены при прогрессивных формах РС, коррелируют с данными МРТ
64	анти-НФЛ	2003	51	Анти-НФЛ повышены при РС, коррелируют с данными МРТ
63	анти-НФЛ	2004	130	Анти-НФЛ повышены при ППРС
39	анти-ФНФМ	2007	49	Анти-ФНФМ повышены при РС
70	анти-ФНФТ	2013	62	Анти-ФНФТ не отличались в группах
69	анти-НФЛ	2013	62	Анти-НФЛ не отличались в группах
152	анти-НФЛ	2012	20	Анти-НФЛ повышены при РС

№ - номер публикации в списке литературы

Антитела к нейрофиламентам также были выявлены при БАС: сывороточные анти-НФЛ и анти-НФТ ЦСЖ коррелируют с тяжестью состояния [135, 150, 178]. Антитела к ФНФТ, НФЛ, ФНФМ были выявлены при синдроме Дауна<sup>147</sup>. Таким образом наличие антител к структурам цитоскелета даже при нейродегенеративных заболеваниях подтверждает их иммуногенность.

Уровень аутоантител к бета-амилоиду и их avidность подробно изучался в связи с предполагаемой протективной ролью аутоиммунитета при

болезни Альцгеймера, а также в связи с теорией о возможности терапии болезни Альцгеймера иммуноглобулином к бета-амилоиду. В 2004г методом ИФА выявлено повышение антител к пептиду 25-35 бета-амилоида при болезни Альцгеймера в сравнении с контрольной группой [84]. Позже тем же методом было выявлено более низкое содержание антител к бета-амилоиду в сыворотке больных болезнью Альцгеймера [47, 171, 187]. К тому же была выявлена проблема неспецифического связывания при ИФА: более интенсивное связывание может происходить с плашкой покрытой только буферным раствором, в сравнении с ячейками покрытыми исследуемым антигеном, также антитела могут неспецифически связываться даже с белком обратной последовательности, амилоидом 42-1, или бычьим сывороточным альбумином. Данная проблема при выполнении непрямого ИФА на антитела к белкам бета-амилоида известна уже давно [3, 72, 142]. Однако должного внимания ей обычно не уделялось. В 2010г проведено исследование о возможности нивелировании неспецифического связывания в ИФА. Были предприняты попытки корректировки блокирующего раствора, диссоциации иммунных комплексов, использования сэндвич ИФА и плашек с менее протеин-абсорбирующими свойствами. Ни одна из предпринятых мер не позволила устранить неспецифическое связывание. Максимально эффективным оказалось введение 20% раствора бычьей сыворотки в качестве блокирующего раствора, что позволило снизить неспецифичность примерно на половину, однако в результате исследования сделан вывод, что неспецифичность связывания необходимо учитывать в каждом исследовании аутоантител в биологических жидкостях и, вероятно, наиболее перспективным в этом отношении является разработка методов позволяющих в принципе избежать связывания белка с пластиком [101].

Таким образом, на настоящий момент накоплено большое количество данных о том, что патогенез РС включает не только аутоиммунное воспаление, но и первичную нейродегенерацию. Вклад нейродегенерации в формирование неврологического дефицита у пациентов с РС, ее взаимосвязь с

воспалительным процессом остаются до конца невыясненными, не разработано препаратов, способных эффективно влиять на нейродегенеративный процесс. К основным методам изучения нейродегенерации относятся, прежде всего, различные варианты визуализации измененной ткани: иммуногистохимические, методы лучевой диагностики. Однако применение иммуногистохимических методов ограничено необходимостью выполнения биопсии. Методы же лучевой диагностики высоко чувствительны, но не специфичны. Последние достижения биохимии позволяют с высокой точностью детектировать в биологических жидкостях исследуемые вещества и позволяют изучать биохимические аспекты физиологических и патологических процессов в организме человека. Поэтому исследование именно патохимических аспектов нейродегенеративного процесса при РС является актуальным и перспективным для понимания патогенеза заболевания и разработки новых методов диагностики.

## ГЛАВА 2.

### Материалы и методы исследования

#### *Общая характеристика пациентов*

В исследование были включены больные с достоверным диагнозом РРС согласно обновленным критериям McDonald 2010 [53]. В группу сравнения были включены пациенты с достоверным диагнозом БАС, установленным согласно Эль-Эскориальским критериям [49]. В контрольную группу были включены пациенты с хирургической патологией, которым проводилась спинальная анестезия, без соматической и неврологической патологии.

В группу обострения (ОРС) были включены пациенты с РРС, у которых в течение 24 часов наблюдалось появление новой очаговой неврологической симптоматики или усугубление ранее имевшейся и которые при этом в течение предыдущих 30 дней были стабильны [15, 159]. В группу ремиссии РРС были включены пациенты стабильные по неврологическому статусу более 30 дней. Неврологический дефицит пациентов с РС был оценен по шкале EDSS (Expanded Disability Status Scale), 10-бальной шкале тяжести состояния при РС [107], подробнее описанной в Приложении 1. Нарушение когнитивных функций, а именно самый распространенный его вариант при РС, снижение скорости обработки информации, оценивалось с помощью теста PASAT (paced auditory serial addition test, пошаговый аудиотест на серийное сложение чисел) [29]. Подробное описание теста представлено в Приложении 2 [83, 154].

Диагноз БАС ставился согласно пересмотренным критериям El Escorial [49] с применением электромиографического алгоритма [53]. Оценка функционального состояния пациентов с БАС была выполнена по шкале ALS FRS-R (revised ALS functional rating scale), подробнее описанной в Приложении 3.

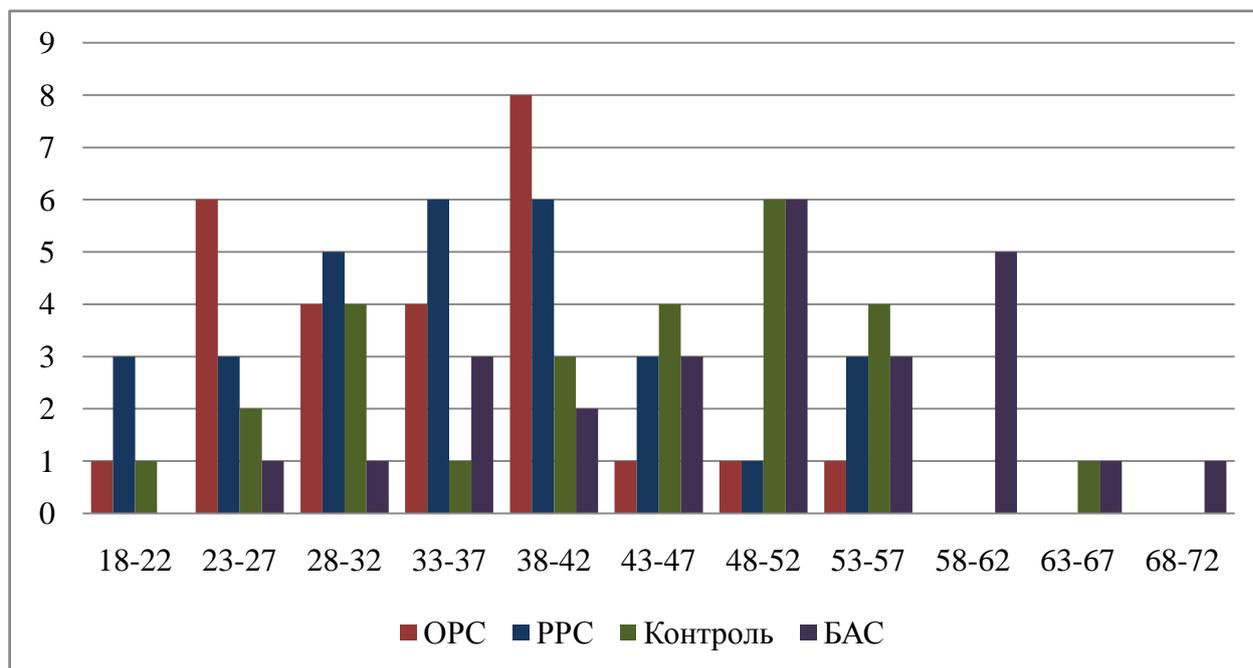
Более подробная информация по исследуемым группам пациентов представлена в таблице 5.

Таблица 5. Общая характеристика пациентов исследуемых групп

	Число пациентов, мужчины/ женщины	Возраст, лет М [Q1, Q2]
ОРС	26 (11/15)	35,5 [27; 39]
РРС	30 (13/17)	35,5 [30; 42]
БАС	26 (12/14)	52 [42;58]
контроль	26(10/16)	45,5 [31;51]

Статистически значимо группы не отличались друг от друга по половому составу и продолжительности заболевания. По возрасту группа БАС отличалась от групп ОРС и РРС, однако зависимости исследуемых параметров от возраста ни в одной из групп выявлено не было, в связи с чем сравнение этих групп можно считать допустимым и оправданным. Подробнее распределение пациентов исследуемых групп по возрасту представлено на диаграмме 1.

Диаграмма 1. Распределение пациентов исследуемых групп по возрасту



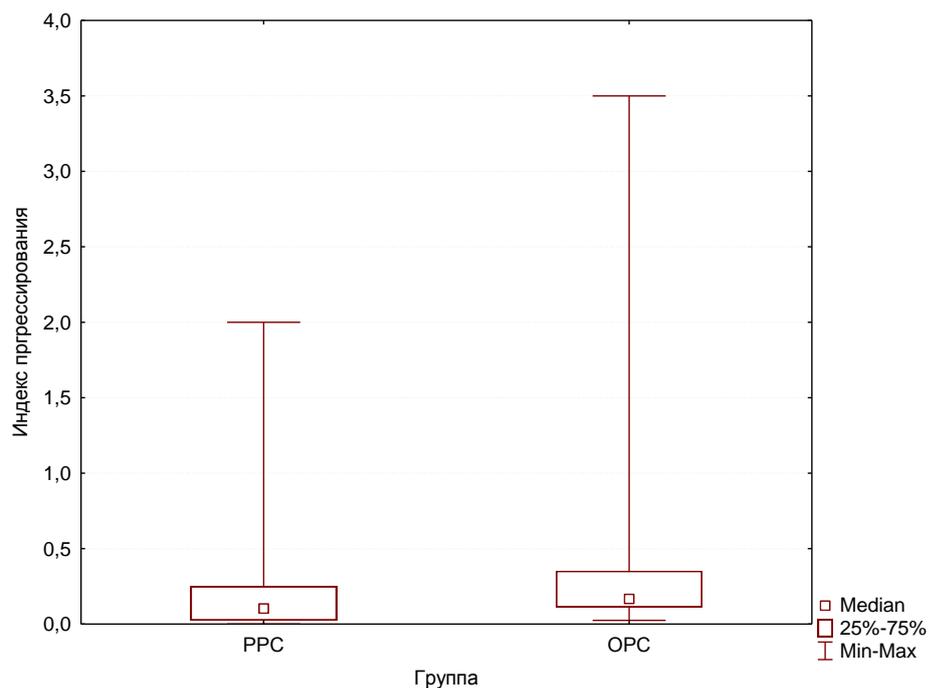
Более подробная характеристика групп пациентов с РС представлена в таблице 6.

Таблица 6. Характеристика пациентов с РС.

	ОРС, М [Q1, Q2]	Минимум/ максимум	РРС М [Q1, Q2]	Минимум/ максимум	
Длительность заболевания, месяцы	15 [6; 36]	1/108	24 [11; 60]	1/144	
Число обострений	2 [2; 3]	1/22	3 [2; 4]	1/6	
EDSS	3 [2; 4]	1,5/7	3 [2; 3,5]	0/7,5	
Функциональная система	Пирамидная система	1 [1; 2]	0/3	1 [1; 3]	0/5
	Мозжечковые функции	1 [0; 2]	0/3	2 [1; 2]	0/3
	Стволовые функции	1 [0; 2]	0/3	1 [0; 1]	0/1
	Чувствительность	1,5 [0; 2]	0/4	1 [0; 2]	0/3
	Функции тазовых органов	0 [0; 0]	0/2	0 [0; 0]	0/4
	Функции зрения	0 [0; 0]	0/0	0 [0; 0]	0/2
	Церебральные функции	0 [0; 0]	0/0	0 [0; 0]	0/0
	Ходьба	0 [0; 0]	0/6	0 [0; 0]	0/7
PASAT	50 [41; 57,5]	37/60	56 [45; 60]	45/60	
Индекс прогрессирования	0,17 [0,11; 0,35]	0,025/3,5	0,1 [0,025; 0,025]	0/2	

Пациенты групп ОРС и РРС значительно отличались по индексу прогрессирования: в группе ОРС оказались случаи более быстрого прогрессирования заболевания в сравнении с группой РРС (Рис. 1).

Рисунок 1. Сравнение групп PPC и OPC по индексу прогрессирования



При чем по длительности заболевания и степени выраженности неврологического дефицита по шкале EDSS указанные группы между собой значимо не отличались (Рис. 2 и 3).

Рисунок 2. Сравнение групп PPC и OPC по длительности заболевания

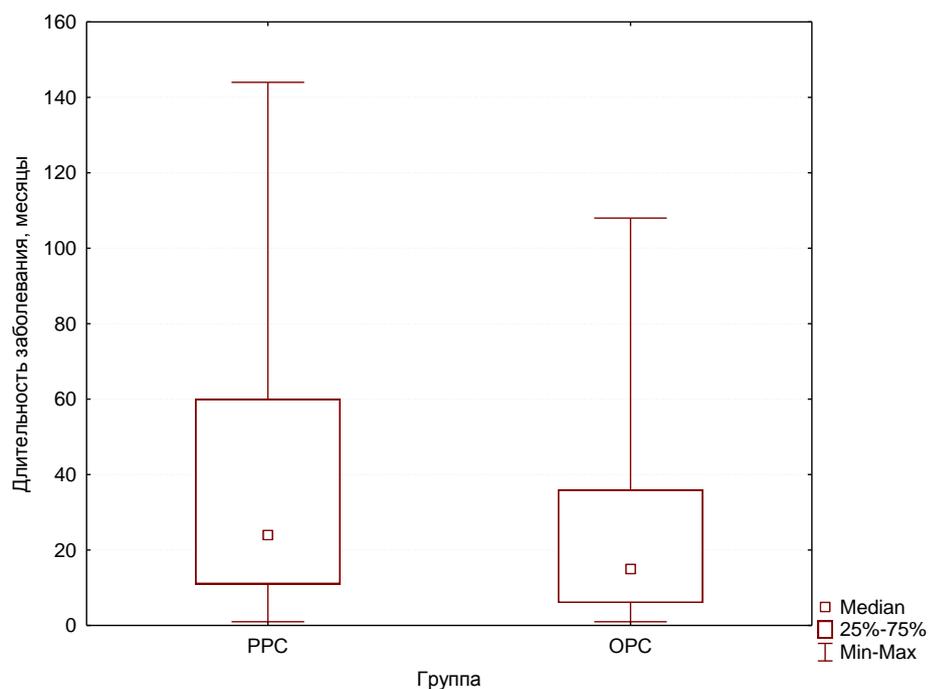
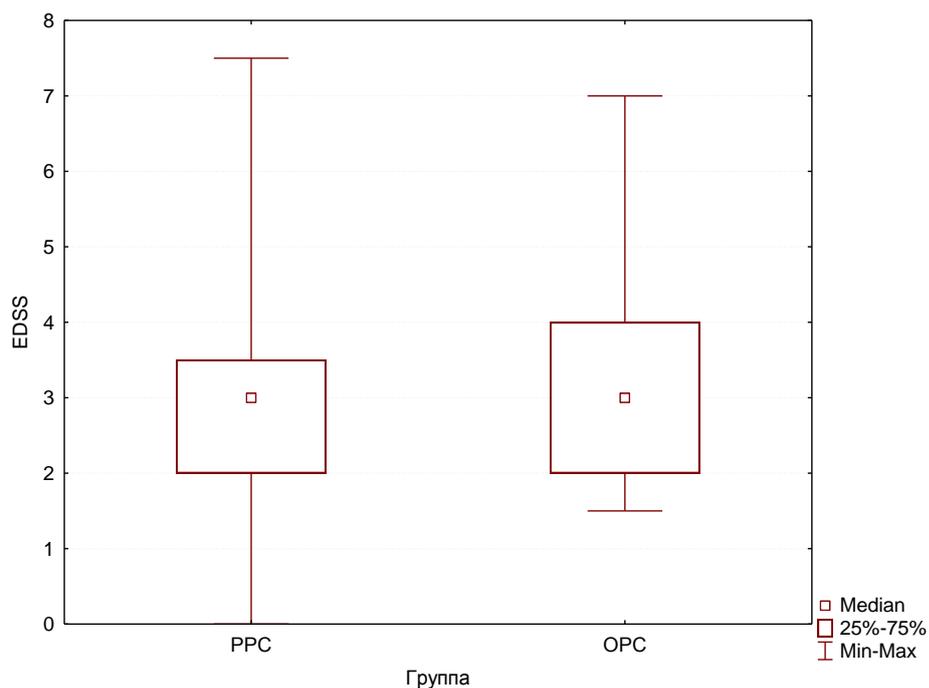
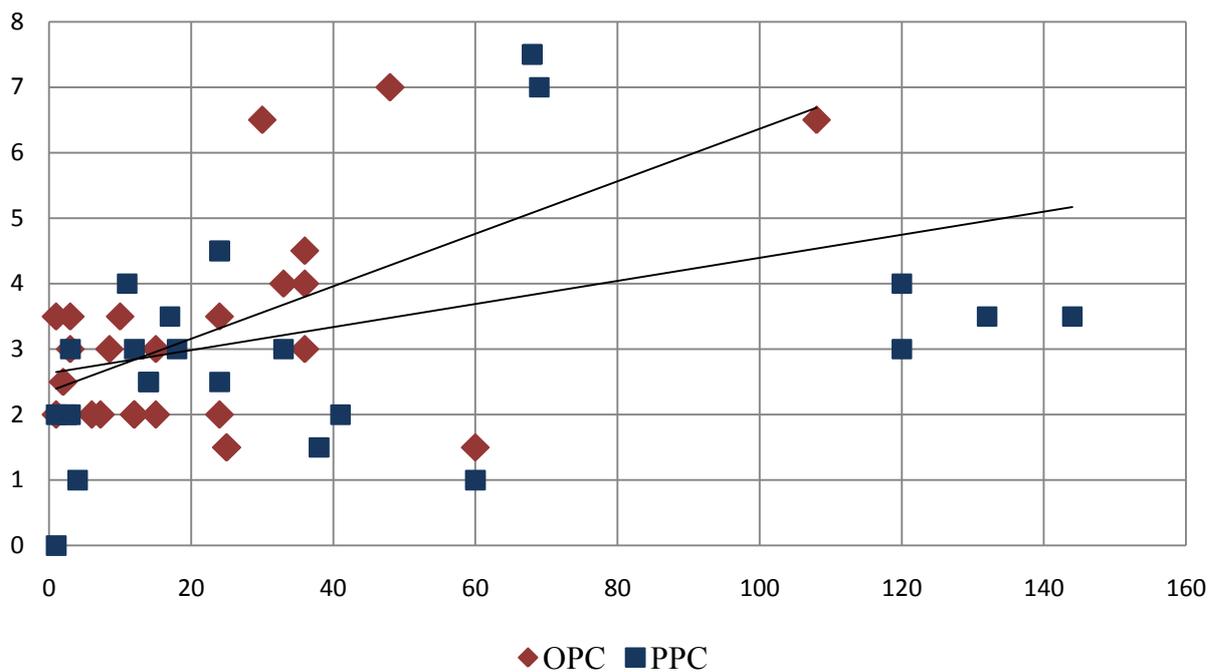


Рисунок 3. Сравнение групп PPC и OPC по баллу EDSS



Для более наглядного представления исследованных групп соотношение длительности заболевания и балла EDSS представлены на рисунке 4.

Рисунок 4. Соотношение длительности заболевания и балла EDSS в группах OPC и PPC



На графике линии тренда отражают более быстрое прогрессирование пациентов группы OPC за весь период заболевания, однако очевидно, что данное отличие достигается из-за присутствия в группе PPC 4-ех пациентов, болеющих более 100 месяцев, но при этом с EDSS 3-4. По клиническим характеристикам данные 4 пациента от остальных больных в группе PPC ничем не отличались.

30% Пациентов с РС (9 пациентов с OPC и 7 пациентов с PPC) к моменту проведения исследования получали иммуномодулирующую терапию препаратами первой линии (глатирамера ацетат или интерферон - бета). Средняя продолжительность терапии составила 6 месяцев в случае глатирамера ацетата и 4 месяца в случае препаратов интерферона-бета. По клиническим характеристикам пациенты, получавшие ПИТРС, не отличались от остальных.

Пациенты, получавшие терапию цитостатическими препаратами или иммуномодулирующими препаратами второй линии (финголимод, натализумаб) в исследование не включались. Также критериями исключения из исследования были сопутствующая соматическая патология в стадии декомпенсации, онкологические и другие аутоиммунные заболевания в анамнезе, значимые отклонения от референсных значений в результатах клинических анализов крови, мочи, биохимического анализа крови.

В исследование было включено 26 пациентов с БАС с тремя из описанных форм заболевания. Распределение пациентов согласно форме заболевания представлено на диаграмме 2.

На момент выполнения исследования на стадии генерализации (появление клинических или ЭНМГ признаков поражения мотонейронов на трех уровнях: бульбарном, шейном, поясничном) заболевание было у 18 пациентов. Из них у 12 был быстрый темп развития заболевания (генерализация заболевания по клиническим данным или данным ЭНМГ в течение первого года заболевания). Продолжительность заболевания пациентов с БАС составила 14,5 [10; 24]. Характеристика неврологического дефицита пациентов с БАС по шкале ALS-FRS-R представлена в таблице 7.

Диаграмма 2. Распределение пациентов с БАС согласно форме заболевания



Таблица 7. Характеристика неврологического дефицита пациентов с БАС по шкале ALS-FRS-R

Функция	Оценка по ALS-FRS-R, М [Q1, Q2]	Минимум/максимум
Общая оценка	44,5 [43; 45]	40/47
Речь	4 [3; 4]	3/4
Слюнотечение	4 [4; 4]	3/4
Глотание	4 [4; 4]	4/4
Письмо	4 [3; 4]	3/4
Способность резать пищу	4 [3; 4]	3/4
Одевание и гигиена	4 [4; 4]	2/4
Повороты в кровати	4 [4; 4]	4/4
Ходьба	3 [3; 4]	2/4
Подъем по лестнице	3 [3; 4]	2/4
Дыхание	4 [4; 4]	4/4
Ортопное	4 [4; 4]	4/4
Дыхательная поддержка	4 [4; 4]	4/4

*Биохимические методы исследования**Забор и подготовка биологического материала*

Образцы сыворотки крови и ликвора были получены во время стационарного лечения у пациентов ФГБУ НЦН РАМН. Забор крови осуществлялся из локтевой вены в утренние часы, натощак в пробирки с активатором свертывания (Vacutainer, BD). Сыворотку отделяли от клеток крови путем центрифугирования в течение 20 минут при 5000 оборотах/мин при 4 °С. Полученную надосадочную жидкость переносили в отдельные пробирки, образцы хранились при температуре – 70°С до момента выполнения исследования.

Люмбальная пункция была выполнена больным с РРС и БАС после получения информированного согласия. Пробы ЦСЖ были собраны в стерильные пробирки, центрифугированы в течение 10 минут при 1500 g при комнатной температуре, затем аликвотированы и заморожены при температуре –70°С. Во всех группах забор крови осуществлялся до начала терапии метилпреднизолоном по поводу настоящего обострения. Контрольные образцы ликвора были получены при выполнении спинальной анестезии больным с хирургической патологией.

*Биохимические методы исследования*

Для определения уровня биомаркеров в сыворотке и ЦСЖ в работе использовали следующие коммерческие наборы для выполнения сэндвич-ИФА:

- ФНФТ- EnCor Biotechnology, США; Neuromics, США
- НФЛ – UmanDiagnostics, Швеция
- бета-амилоид 1-42 – Invitrogen, США
- бета-амилоид 1-40 - Merck Millipore, США

Исследование было проведено согласно следующим протоколам:

**Определение ФНФТ**

1. Размораживание, перемешивание, разведение образцов ЦСЖ и стандартных разведений

2. Подготовка 96-луночной плашки, покрытой антителами курицы к ФНФТ.
3. Нанесение образцов и стандартных разведений по 50мкл в ячейки плашки
4. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 1 часа
5. Промывка плашки с помощью вошера Lisa-Wash по 300мкл 5 раз 0,05% раствором полисорбционного сурфактанта Твин 20 в натрий фосфатном буфере рН 7,4
6. Нанесение вторичных антител, антитела кролика к ФНФТ, 1мг/мл по 100мкл в ячейки плашки (разведение вторичных антител 1:200)
7. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 1 часа
8. Промывка плашки аналогично пункту 5.
9. Нанесение третичных антител, конъюгированные с пероксидазой антитела козы к антителам кролика, по 100мкл в ячейки плашки
10. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 1 часа
11. Промывка плашки аналогично пункту 5.
12. Нанесение раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина по по 100мкл в ячейки плашки
13. Инкубация 15-60 мин до появления голубой окраски в ячейках
14. Нанесение стоп-реактента 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по 50мкл в ячейки плашки
15. Помещение плашки в ридер, определения оптической плотности при длине волны 450нм

### Определение НФЛ

1. Размораживание, перемешивание, разведение образцов ЦСЖ и стандартных разведений
2. Подготовка 96-луночной плашки, покрытой антителами к НФЛ.
3. Нанесение образцов и стандартных разведений по 50мкл в ячейки плашки
4. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 1 часа
5. Промывка плашки с помощью вошера Lisa-Wash по 300мкл 3 раз 0,05% раствором полисорбционного сурфактанта Твин 20 в натрий фосфатном буфере рН 7,4

6. Нанесение вторичных моноклональных антител к НФЛ по 100мкл в ячейки плашки
7. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 45 минут
8. Промывка плашки аналогично пункту 5.
9. Нанесение третичных антител конъюгированные с пероксидазой антитела по 100мкл в ячейки плашки
10. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 30 минут
11. Промывка плашки аналогично пункту 5.
12. Нанесение раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина по 100мкл в ячейки плашки
13. Инкубация 15мин до появления голубой окраски в ячейках
14. Нанесение стоп-реактента 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по 50мкл в ячейки плашки
15. Помещение плашки в ридер, определения оптической плотности при длине волны 450нм

#### Определение бета-амилоида 1-42

1. Размораживание, перемешивание, разведение образцов ЦСЖ и стандартных разведений
2. Подготовка 96-луночной плашки, покрытой антителами к NH<sub>2</sub>-концу белка бета-амилоида 1-42
3. Нанесение образцов и стандартных разведений по 50мкл в ячейки плашки
4. Инкубация при температуре 4С на шейкере в течение 3 часов
5. Промывка плашки с помощью вошера Lisa-Wash по 300мкл 4 раза 0,05% раствором полисорбционного сурфактанта Твин 20 в натрий фосфатном буфере рН 7,4
6. Нанесение вторичных антител, антитела кролика к бета-амилоиду 1-42 человека, по 50мкл в ячейки плашки
7. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 3 часов
8. Промывка плашки аналогично пункту 5.

9. Нанесение третичных антител, конъюгированные с пероксидазой антитела к антителам кролика, по 100мкл в ячейки плашки
10. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 30 минут
11. Промывка плашки аналогично пункту 5.
12. Нанесение раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина по по 100мкл в ячейки плашки
13. Инкубация 15-60 мин до появления голубой окраски в ячейках
14. Нанесение стоп-реактента 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по 50мкл в ячейки плашки
15. Помещение плашки в ридер, определения оптической плотности при длине волны 450нм

#### Определение бета-амилоид 1-40

1. Размораживание, перемешивание, разведение образцов ЦСЖ и стандартных разведений
2. Подготовка 96-луночной плашки, покрытой антителами к NH<sub>2</sub>-концу белка бета-амилоид 1-40
3. Нанесение вторичных антител, антитела к бета-амилоиду 1-40 человека, по 50мкл в ячейки плашки
4. Нанесение образцов и стандартных разведений по 50мкл в ячейки плашки
5. Инкубация при температуре 4С на шейкере в течение 16-20 часов
6. Промывка плашки с помощью вошера Lisa-Wash по 300мкл 5 раз 0,05% раствором полисорбционного сурфактанта Твин 20 в натрий фосфатном буфере рН 7,4
7. Нанесение третичных антител, конъюгированные с пероксидазой антитела к антителам кролика, по 100мкл в ячейки плашки
8. Инкубация при комнатной температуре на шейкере в течение 30 минут
9. Промывка плашки аналогично пункту 6.
10. Нанесение раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина по по 100мкл в ячейки плашки
11. Инкубация 5-30 мин до появления голубой окраски в ячейках

12. Нанесение стоп-реактанта 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по 50 мкл в ячейки плашки

13. Помещение плашки в ридер, определения оптической плотности при длине волны 450 нм

Все измерения образцов проводили в двух параллельных пробах, калибровочную кривую строили по измерениям в трех параллельных пробах.

Антитела к нейрофиламентам и бета-амилоидам определялись непрямым неконкурентным ИФА ЦСЖ и сыворотки крови по следующему разработанному нами протоколу на основании результатов проведенных к настоящему моменту исследований на высокосорбентной пластиковой плашке [8, 39, 200]. Все измерения образцов проводились в двух параллельных пробах, для каждой пробы также были выполнены два отрицательных контроля (ячейки без исследуемого антигена, в остальном полностью идентичные пробам):

1. Инкубация антигена производителя BACHEM, Швейцария, в бикарбонатном буфере pH 5,0 в течение 16 часов при температуре 4°C
2. Промывка 0,05% раствором полисорбционного сурфактанта Твин 20 в натрий фосфатном буфере pH 7,4
3. Инкубация с блокирующим раствором, 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) в натрий фосфатном буфере pH 7,4
4. Промывка 0,05% раствором полисорбционного сурфактанта Твин 20 в натрий фосфатном буфере pH 7,4
5. Инкубация с ЦСЖ или сывороткой в разведении (нами были отработаны разведения от 1/100 до 1/10 для ЦСЖ и от 1/1000 до 1/100 для сыворотки)
6. Промывка 0,05% раствором полисорбционного сурфактанта Твин 20 в натрий фосфатном буфере pH 7,4
7. Инкубация с вторичными антивидовыми мечеными пероксидазой антителами, конъюгат к IgG человека козы с пероксидазой, производство Sigma, США. Разведение в 1% растворе БСА с добавлением Твин-20 (0,05 %) в разведении 1 к 10000 в течение 30 минут при 37° С (100 мкл на каждую ячейку)
8. Промывка 0,05% раствором полисорбционного сурфактанта Твин 20 в

натрий фосфатном буфере рН 7,4

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

Уровень альбумина в ЦСЖ и сыворотке крови пациентов определялся на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 30I praim методом колориметрии после добавления бромкрезола зеленого.

#### *Статистическая обработка результатов*

Количественные переменные описывали следующими параметрами: числом пациентов, медианой (М), 25-ым и 75-ым перцентилями (М [Q1;Q2] ). Для сравнения двух групп по количественному признаку применяли критерий Манна-Уитни при уровне значимости 0.05 с поправкой Бонферрони, для множественного сравнения — критерий Крускала-Уоллиса. Для выявления корреляции данных был использован тест ранговой корреляции Спирмена. Ввиду выполнения анализа в несколько этапов для более точного сравнения данных результаты были представлены в % от контроля – процентном соотношении концентраций в образцах больных и средней концентрацией маркера в контрольных образцах, детектированных на той же плашке. Такое относительное выражение уровня детектируемого методом ИФА вещества позволяет с большей точностью сравнивать результаты экспериментов, проведенных не одновременно [7, 36, 37, 199, 200]. Расчет выполнен на персональном компьютере с использованием приложения Microsoft Excel 2003 и пакета статистического анализа данных Statistica 8.0 for Windows (StatSoft Inc., USA). Для проведения ROC-анализа использовался он-лайн калькулятор «SimpleROCCurveAnalysis».

## ГЛАВА 3

## Результаты исследования

*Исследование белков бета-амилоидов и цепей нейрофиламентов*

В первую очередь нами было проведено исследование влияния иммуномодулирующей терапии на уровень биомаркеров в группах РРС и ОРС. Результаты исследования представлены на диаграммах 3 и 4 и в таблице 8.

Диаграмма 3. Сравнение уровней исследуемых маркеров в ЦСЖ пациентов с ОРС получавших и не получавших ПИТРС

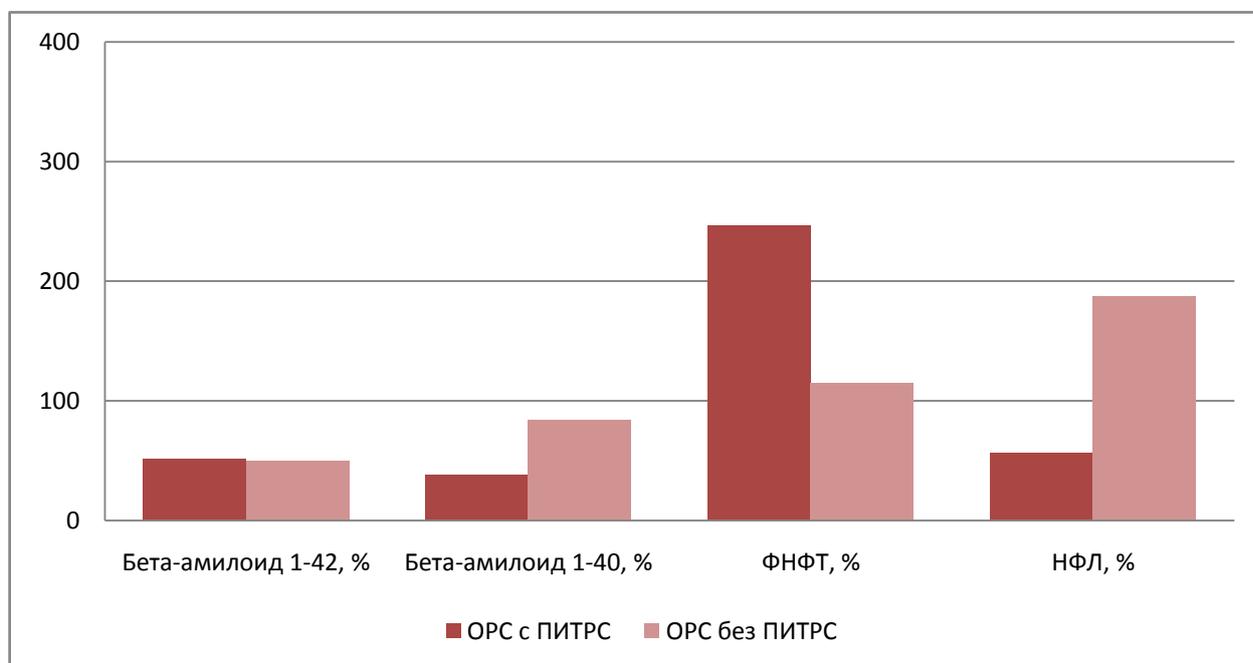
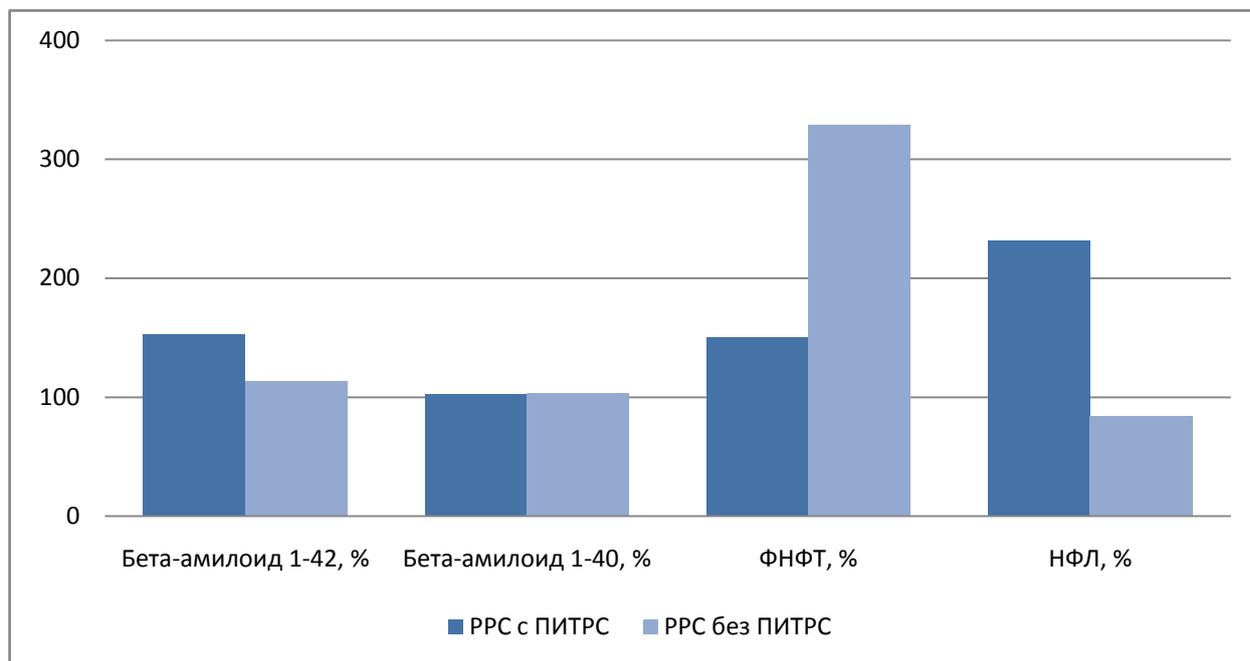


Диаграмма 4. Сравнение уровней исследуемых маркеров в ЦСЖ пациентов с РРС получавших и не получавших ПИТРС



Данные были также проанализированы на наличие корреляций между длительностью терапии и уровнем маркеров: достоверных корреляций не выявлено.

Таким образом, в нашем исследовании статистически значимой взаимосвязи между терапией ПИТРС первой линии и уровнем маркеров нейродегенерации выявлено не было. Учитывая полученные результаты, дальнейшее исследование проводилось без выделения подгруппы пациентов, получающих терапию ПИТРС.

Таблица 8. Уровень исследуемых маркеров в ЦСЖ пациентов с ОРС и РРС получавших и не получавших ПИТРС

Группа		Маркер	Результат		
			М	Q1	Q2
ОРС	с ПИТРС	Бета-амилоид 1-42, %	51,8	15,9	69,7
		Бета-амилоид 1-40, %	38,6	14,1	87,0
		ФНФТ, %	246,3	147,7	339,2
		НФЛ, %	56,2	37,9	212,3
	без ПИТРС	Бета-амилоид 1-42, %	49,5	19,6	66,3
		Бета-амилоид 1-40, %	84,0	52,2	88,7
		ФНФТ, %	114,8	68,4	235,2
		НФЛ, %	187,2	62,2	321,9
РРС	с ПИТРС	Бета-амилоид 1-42, %	153,3	79,0	203,2
		Бета-амилоид 1-40, %	102,9	92,5	144,7
		ФНФТ, %	150,2	83,0	345,0
		НФЛ, %	231,7	172,4	290,9
	без ПИТРС	Бета-амилоид 1-42, %	113,6	64,0	122,8
		Бета-амилоид 1-40, %	103,5	99,1	105,8
		ФНФТ, %	329,0	173,9	358,6
		НФЛ, %	84,6	31,6	349,5

Результаты исследования уровня ФНФТ в ЦСЖ представлены на рисунке 5 и в таблице 5а.

Рисунок 5. Уровень ФНФТ в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.

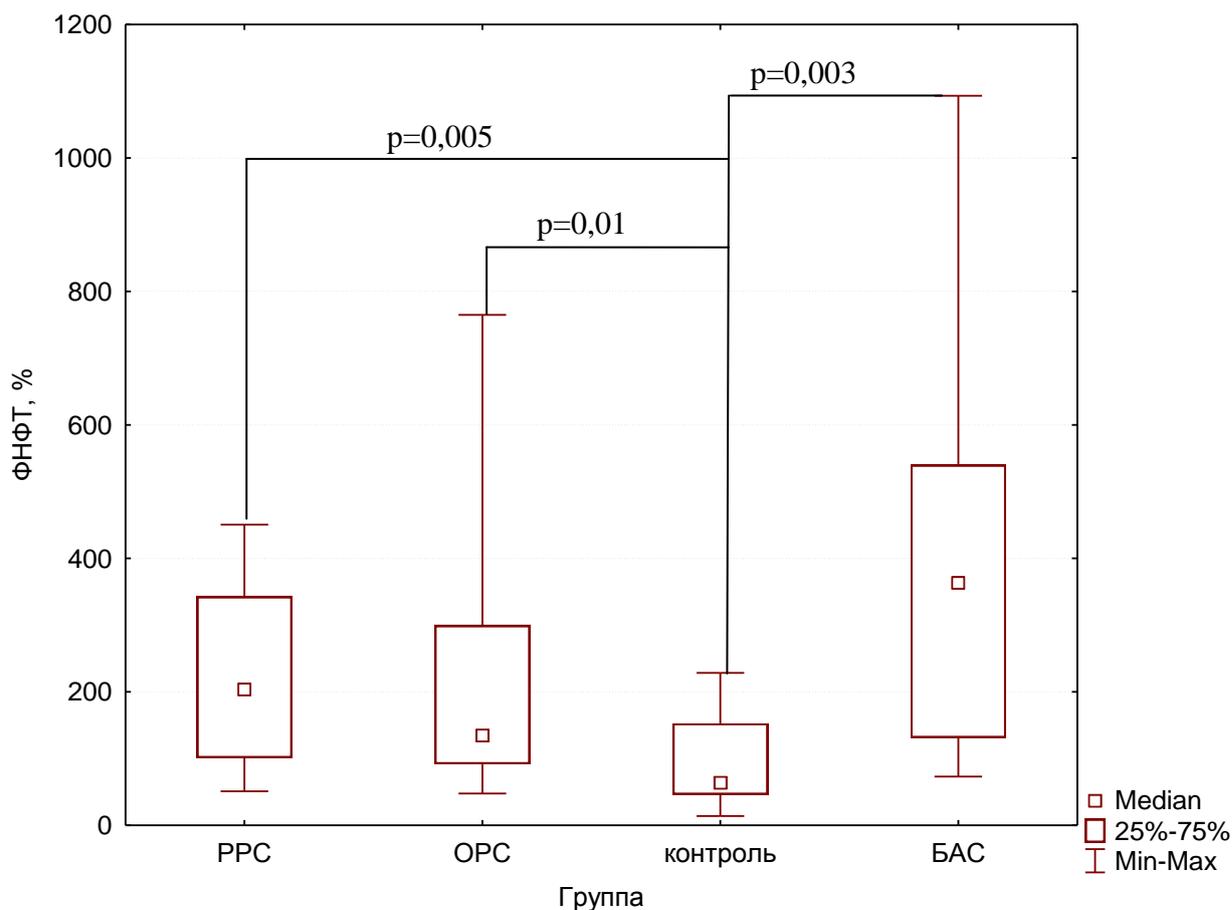


Таблица 5а. Уровень ФНФТ в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.

Группа	М	Q1	Q2
PPC	203,94	101,36	342,83
OPC	134,85	92,19	299,41
контроль	63,72	46,28	152,71
БАС	363,42	131,54	540,00

В группах PPC, 203,94 % [101,36; 342,83], и OPC 134,85 % [92,19; 299,41], уровень ФНФТ был значимо выше, чем в контрольной группе, 63,72 % [46,28; 152,71]. При этом между собой группы OPC и PPC значимо не отличались по данному параметру. Отличие выявлено между контрольной группой и БАС 363,42 % [131,54; 539,99]: уровень ФНФТ при БАС оказался более высоким, но с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений отличие оказалось незначимым. Группы OPC и PPC по уровню

ФНФТ между собой не отличались и не отличались значимо от группы БАС. При этом уровень ФНФТ в группе ОРС имеет тенденцию к более низкому значению в сравнении с группой БАС,  $p=0,07$

Результаты исследования уровня НФЛ в ЦСЖ представлены на рисунке ба и в таблице ба.

Рисунок 6. Уровень НФЛ в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.

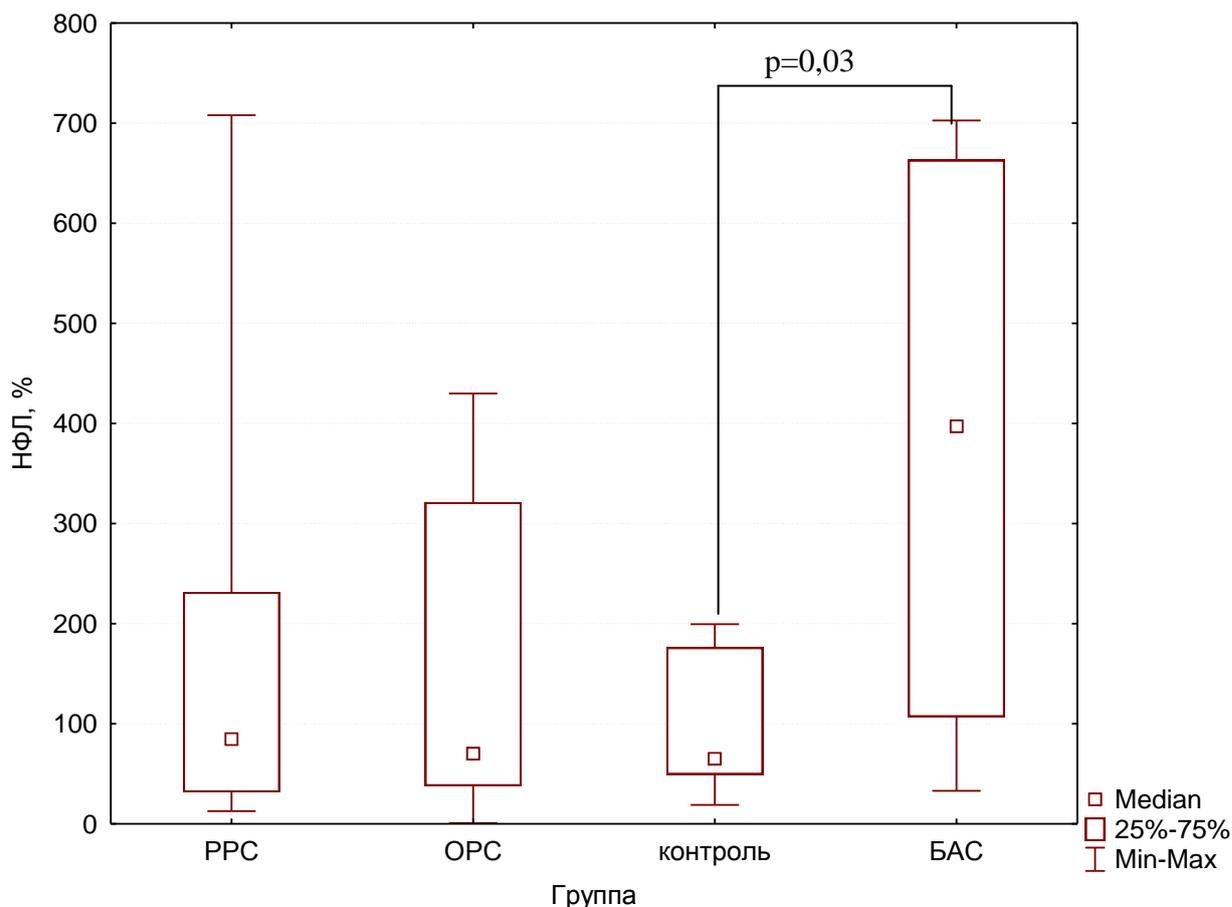


Таблица ба. Уровень НФЛ в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.

Группа	М	Q1	Q2
PPC	84,62	31,65	231,65
ОРС	70,14	37,85	321,32
контроль	65,02	49,31	176,37
БАС	397,10	106,80	663,25

По уровню ФНФЛ в исследованных группах значимых отличий выявлено не было. Однако были выявлены следующие тенденции: при PPC,

84,62% [31,65; 231,65] и ОРС 70,14% [37,85;321,32] уровень НФЛ ниже, чем в контрольной группе 65,02 % [49,31; 176,37],  $p=0,07$

Результаты исследования уровня бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ представлены на рисунке 7 и в таблице 7а.

Рисунок 7. Уровень бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.

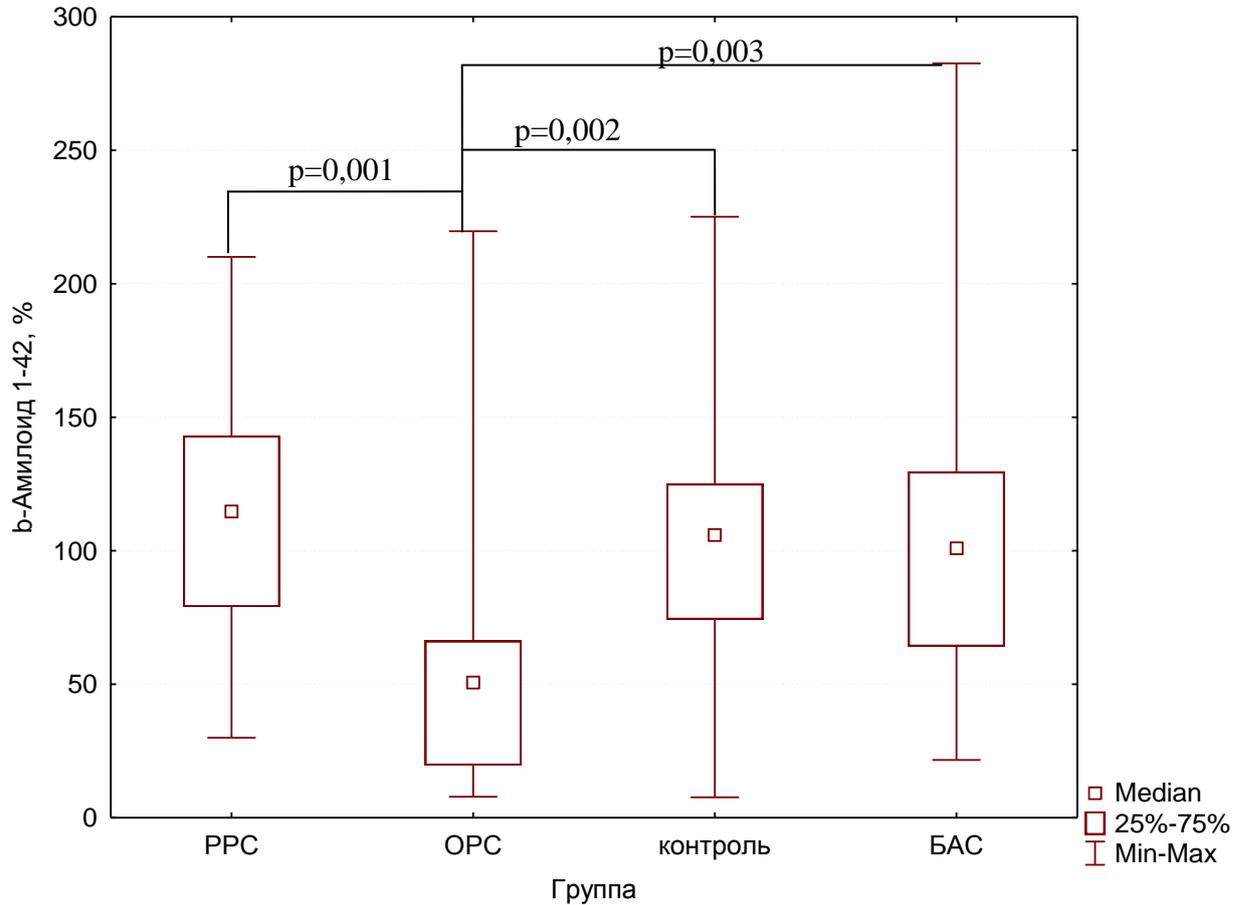


Таблица 7а. Уровень бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ пациентов исследуемых группах.

Группа	М	Q1	Q2
PPC	114,70	79,01	143,07
ОРС	50,70	19,60	66,28
контроль	105,87	74,21	125,10
БАС	100,95	64,15	129,63

Было выявлено, что уровень бета-амилоида 1-42 значительно ниже в группе ОРС 50,70 % [19,60; 66,28], в сравнении с группой PPC, 114,70 % [79,01; 143,07].

В группе ОРС уровень данного пептида ниже, чем в группах контроля, 105,87 % [74,21; 125,10], и группе БАС, 100,95 % [64,15; 129,63]. Группы РРС, БАС и контрольная группа между собой по уровню данного показателя не отличались.

Результаты исследования уровня бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ представлены на рисунке 8 и в таблице 8а.

Рисунок 8 Уровень бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.

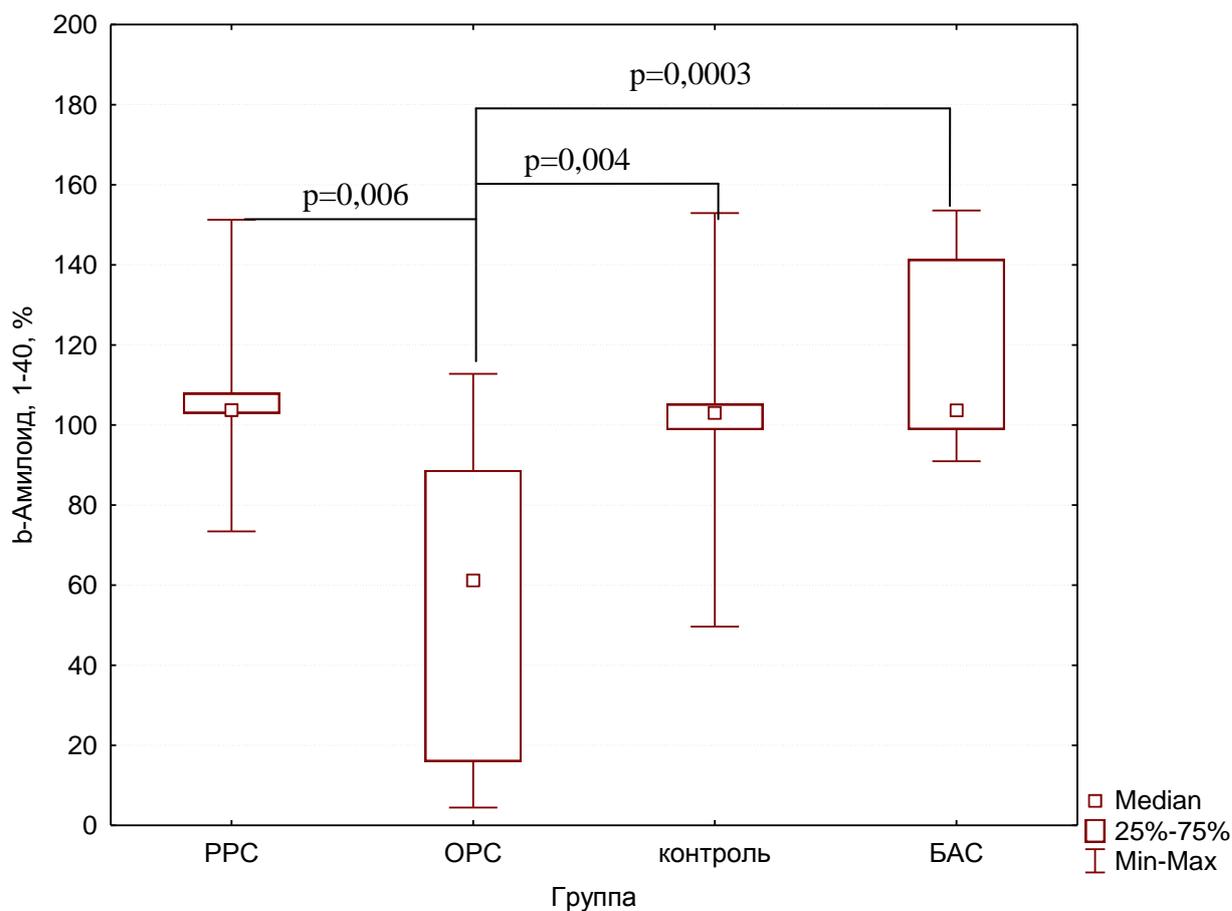


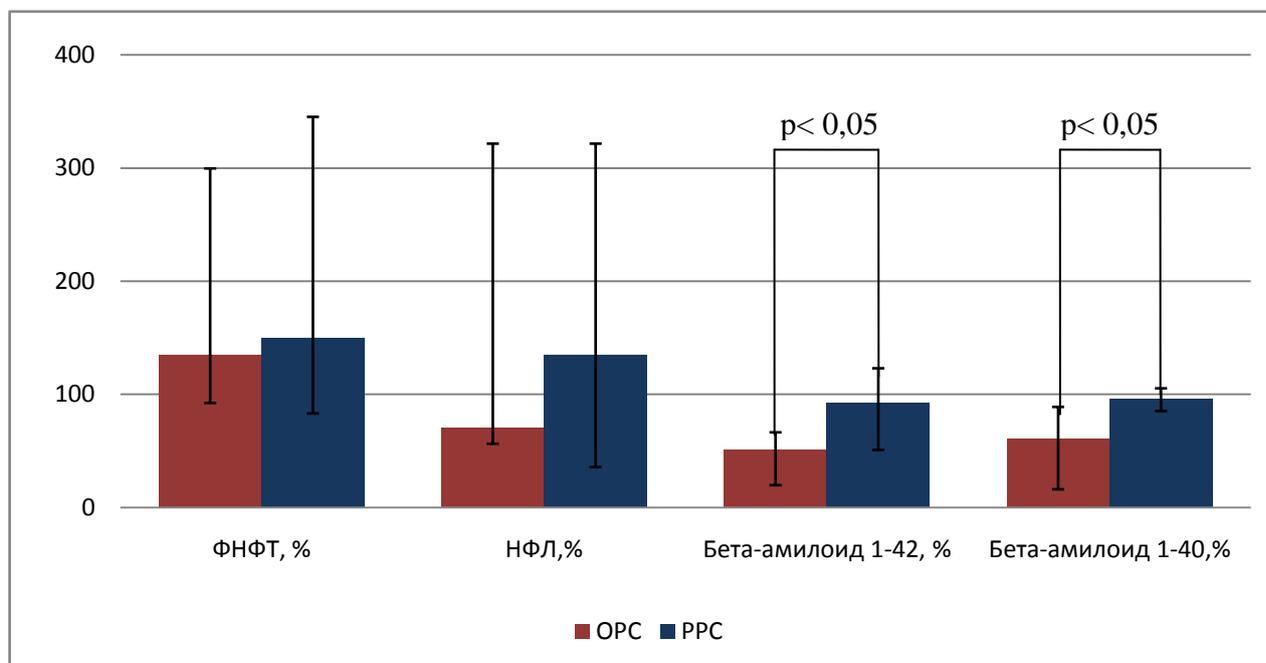
Таблица 8а. Уровень бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ пациентов исследуемых групп.

Группа	М	Q1	Q2
РРС	103,73	102,92	107,95
ОРС	61,15	15,97	88,75
контроль	103,05	98,83	105,24
БАС	103,68	98,88	141,36

Выявлено отличие групп ОРС и РРС: в обострении заболевания отмечается снижение концентрации бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ. В группе ОРС уровень бета-амилоида 1-40 составил 61,15 % [15,97; 88,75], в группе же РРС – 103,73 % [102,92; 107,95]. Уровень бета-амилоида 1-40 в группе ОРС был также значимо ниже, чем в контрольной группе 103,05 % [98,83; 88,75] и группе БАС 103,68 % [98,88; 141,36]. Группы РРС, БАС и контрольная группа по данному параметру между собой не отличались.

Нами был проведен сравнительный анализ содержания маркеров нейродегенерации в группах РРС и ОРС. Результаты измерений представлены для каждой фазы заболевания на диаграмме 5.

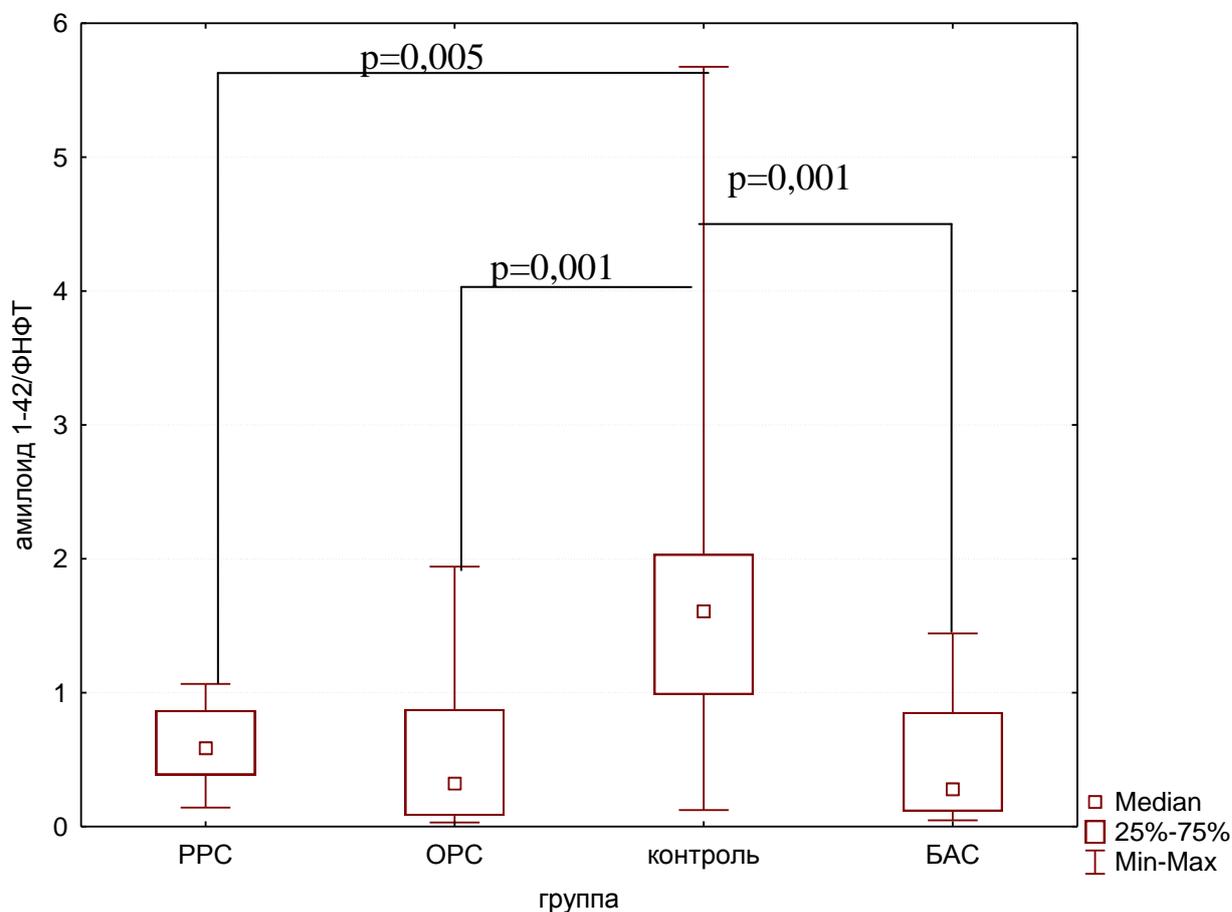
Рисунок 5 Уровень изучаемых маркеров в стадии обострения и ремиссии РРС



Было выявлено, что в стадию обострения в ЦСЖ происходит снижение уровней бета-амилоида 1-40 и 1-42. Уровень же ФНФТ и НФЛ в разные фазы заболевания значимо не отличался.

По соотношению уровней исследуемых маркеров значимые отличия были получены при исследовании соотношения бета-амилоида 1-42 и ФНФТ. Полученные результаты представлены на рисунке 9.

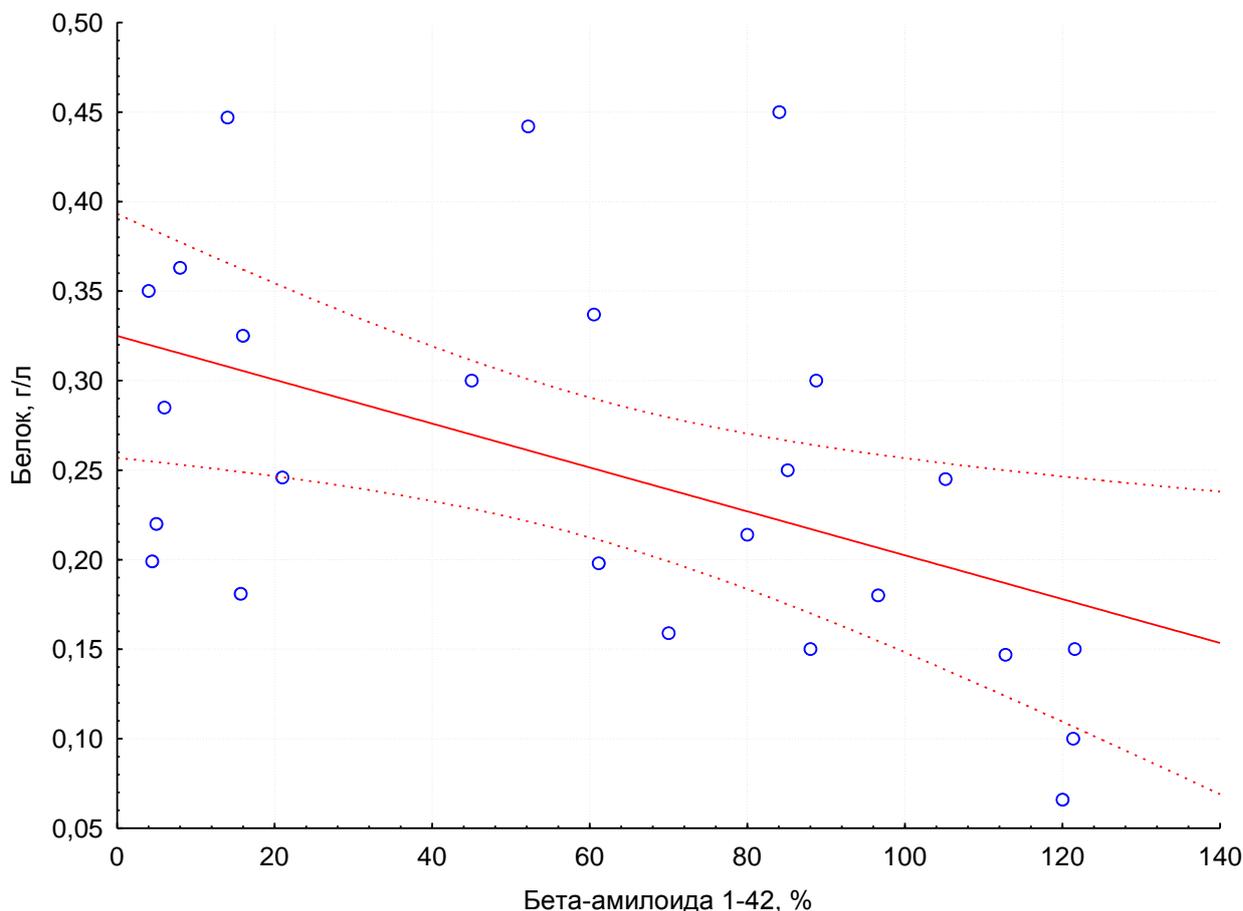
Рисунок 9. Соотношение бета-амилоида 1-42 / ФНФТ в ЦСЖ  
исследуемых групп



Контрольная группа статистически значимо отличалась от остальных групп, при чем можно детерминировать значение данного соотношения равное 1, позволяющее со специфичностью 83% разграничить группы контроля и пациентов с заболеваниями НС, чувствительность данного индекса, согласно нашему исследованию равна, 70%

Корреляция уровня белка и бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ в группе ОРС ( $p < 0,05$ ) представлена на рисунке 10.

Рисунок 10. Корреляция уровня белка и бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ в группе ОРС

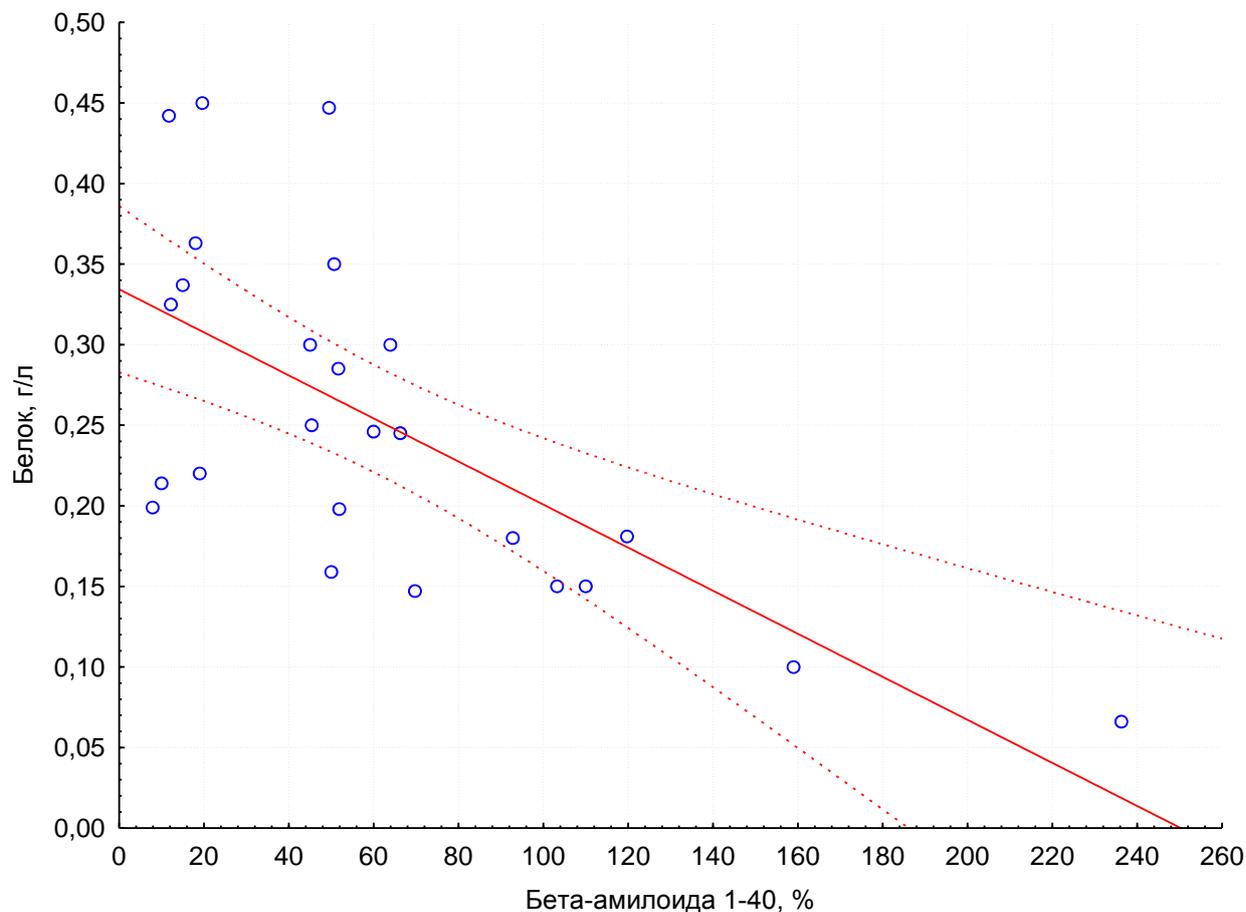


В группе ОРС выявлена достоверная отрицательная корреляция концентрации белка и уровня бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ. Число выполненных исследований – 25: у одного пациента данной группы уровень белка в ЦСЖ не был определен. Коэффициент Спирмена - 0,6,  $p < 0,05$ , что соответствует слабой корреляции.

В других исследованных группах данной корреляции выявлено не было

Корреляция уровня белка и бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ в группе ОРС, ( $p < 0,05$ ) представлена на рисунке 11.

Рисунок 11. Корреляция уровня белка и бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ в группе ОРС



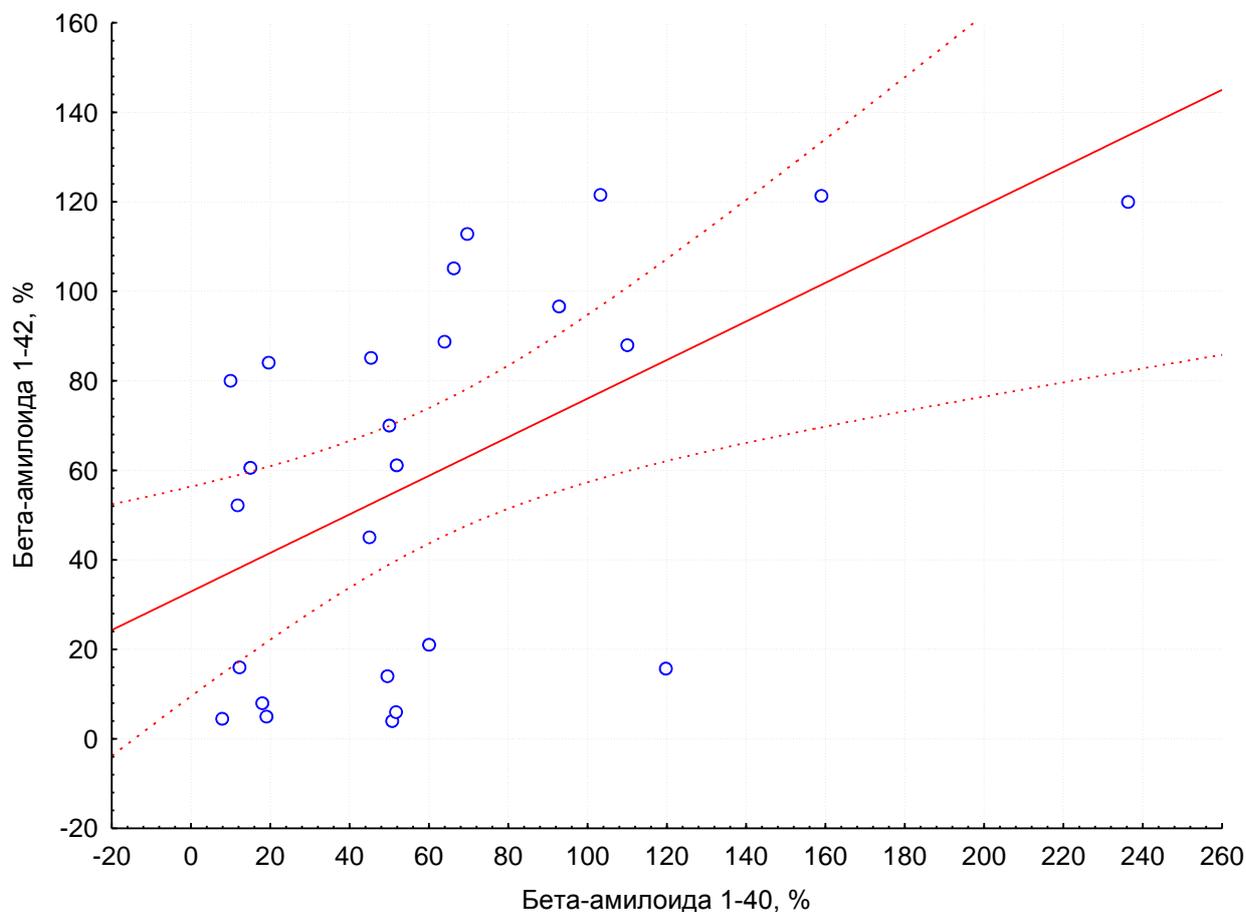
В группе ОРС также выявлена достоверная отрицательная корреляция концентрации белка в ЦСЖ и уровня бета-амилоида 1-40. Число выполненных исследований – 25: у одного пациента данной группы уровень белка в ЦСЖ не был определен. Коэффициент Спирмена - 0,7,  $p < 0,05$ , что соответствует умеренной корреляции.

В других исследованных группах данной корреляции выявлено не было.

Значимого различия между выявленными корреляциями концентрации белка в ЦСЖс уровнем бета-амилоида 1-40 и уровнем бета-амилоида 1-42 выявлено не было ( $p=0,2$ ).

Корреляция уровней бета-амилоида 1-40 и 1-42 в ЦСЖ в группе ОРС, ( $p < 0,05$ ) представлена на рисунке 12.

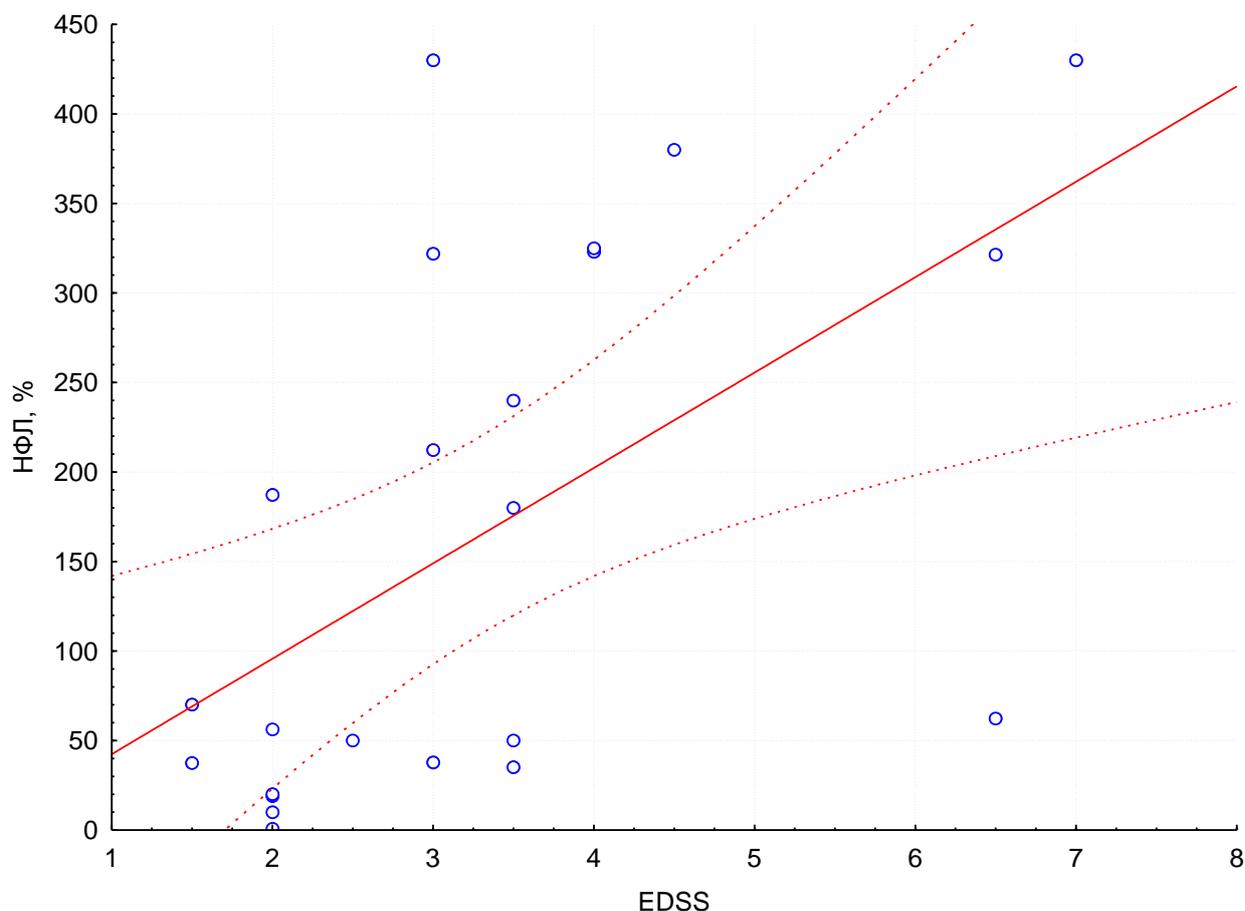
Рисунок 12. Корреляция уровней бета-амилоида 1-40 и 1-42 в ЦСЖ в группе ОРС.



В группе ОРС выявлена достоверная положительная корреляция между уровнем бета-амилоида 1-42 и уровнем бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ. Число выполненных исследований – 25: у одного пациента данной группы уровень белка в ЦСЖ не был определен. Коэффициент Спирмена 0,6 ,  $P < 0,05$ , что соответствует слабой корреляции.

В других исследованных группах данной корреляции выявлено не было. Корреляция EDSS и уровня НФЛ в ЦСЖ пациентов с ОРС, ( $p < 0,05$ ) представлена на рисунке 13.

Рисунок 13. Корреляция EDSS и уровня НФЛ в ЦСЖ пациентов с ОРС.



В группе ОРС выявлена положительная корреляция между степенью выраженности неврологического дефицита, оцененного по шкале EDSS, и уровнем НФЛ в ЦСЖ. Коэффициент Спирмена 0,6,  $p < 0,05$ , что соответствует слабой корреляции. В других исследованных группах данной корреляции выявлено не было.

Нами были исследованы образцы сыворотки больных указанных групп с целью определения в них концентраций ФНФТ, НФЛ, бета-амилоида 1-40 и 1-42 [197, 198].

По уровню ФНФТ отличий между группами получено не было.

При определении НФЛ, бета-амилоида 1-40 и 1-42 оптическая плотность, детектируемая в ячейках с образцами сыворотки была выше таковой в ячейках без добавления исследуемого антигена, но ниже плотности в ячейках с максимальным разведением соответствующего антигена, что

свидетельствовало о крайне низкой, ниже предела детекции метода, концентрации исследуемых антигенов.

*Исследование аутоантител к белкам бета-амилоидов и цепям нейрофиламентов*

При исследовании ЦСЖ и сыворотки крови на наличие антител к указанным антигенам нам не удалось достичь отличия оптической плотности проб от ячеек отрицательного контроля. Пример полученного результата приведен в таблице 9.

Таблица 9. Оптическая плотность при исследовании уровня антител к бета-амилоиду 1-40 в ЦСЖ исследуемых групп пациентов.\*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Среднее
a	0,231	0,247	0,262	0,272	0,285	0,268	0,230	0,258	0,226	0,090	0,368	0,365	0,259
b	0,223	0,237	0,257	0,252	0,292	0,259	0,229	0,246	0,229	0,077	0,365	0,356	0,252
c	0,379	0,363	0,358	0,382	0,414	0,349	0,310	0,352	0,326	0,512	0,587	0,583	0,410
d	0,292	0,325	0,328	0,331	0,348	0,347	0,304	0,338	0,315	0,505	0,602	0,588	0,385
e	0,209	0,205	0,224	0,223	0,248	0,236	0,207	0,238	0,204	0,315	0,331	0,337	0,248
f	0,207	0,210	0,222	0,220	0,225	0,229	0,195	0,225	0,162	0,225	0,260	0,264	0,220
g	0,292	0,296	0,327	0,327	0,311	0,314	0,276	0,310	0,238	0,474	0,525	0,506	0,350
h	0,325	0,303	0,350	0,344	0,333	0,331	0,292	0,331	0,270	0,516	0,580	0,593	0,381

\*-серым выделены ряды данных соответствующие ячейкам плашки с антигеном, бета-амилоидом 1-40

Как видно из средних значений оптической плотности, полученных в ячейках с и без антигена, связывание аутоантител происходит одинаково во всех ячейках. Такие данные свидетельствуют о неспецифическом связывании аутоантител.

## ГЛАВА 4.

### Обсуждение результатов

Работа была выполнена по модели поперечного (одномоментного) исследования в параллельных группах пациентов. В исследование были включены 56 пациентов с достоверным диагнозом РС. В зависимости от фазы заболевания (ремиссия или обострение) пациенты с РС были разделены на 2 подгруппы: 26 пациентов с ОРС и 30 с РРС. Также в исследование были включены группа сравнения, 26 пациентов с БАС, и контрольная группа, 26 человек без неврологических заболеваний. Была проанализирована сопоставимость групп по полу, возрасту и клиническим характеристикам

В ходе выполнения работы в образцах ЦСЖ и сыворотки крови пациентов методом твердофазного ИФА были количественно определены следующие протеины: ФНФТ, НФЛ, бета-амилоид 1-42 и бета-амилоид 1-42. Также была предпринята попытка определить наличие аутоантител в ЦСЖ и сыворотке крови к тем же протеинам.

30% Вошедших в исследование пациентов с РС получали терапию ПИТРС первой линии (глатирамера ацетатом или интерфероном-бета). Нами было выяснено, что по клиническим характеристикам и уровню исследуемых маркеров пациенты, получавшие терапию, не отличались от тех, кто ПИТРС на момент включения в исследование не применяли. В литературе освещено большое количество исследований, подтверждающих нейропротекторные свойства ПИТРС. Для бета-интерферона и глатирамера ацетата показано, что применение и в течение 1 года приводит к значимому снижению соотношения N-ацетиласпартата и креатинина по данным МР-спектроскопии [12, 33]. При многоцентровом исследовании финголимода, включившего 1033 пациентов, показано замедление изменения объема головного мозга по данным МРТ [95]. В биохимических же исследованиях ЦСЖ эффективными в отношении значимого изменения уровня маркеров нейродегенерации оказались натализумаб. Применение натализумаба приводит к стойкому

(сохраняющемуся даже в периоды обострения) снижению уровня НФЛ в ЦСЖ [85]. Позже было выявлено и снижение уровня ФНФТ при применении препарата в течение 1 года. Надо отметить, что в последнем исследовании речь идет о ФНФТ «нормальной» степени фосфорилирования [104]. Что касается эффективности в отношении уровня бета-амилоидов, то здесь при применении натализумаба удалось выявить тенденцию к восстановлению уровня растворимых изоформ бета-амилоидов [34]. В нашем исследовании отличие пациентов, получавших ПИТРС, по уровню маркеров нейродегенерации не было выявлено ввиду малого числа пациентов и короткого периода применения ПИТРС.

При исследовании сыворотки крови методом твердофазного ИФА исследуемые протеины определены не были. В публикациях неоднократно ранее упоминалось о низком уровне амилоидов и нейрофиламентов в сыворотке крови. Однако, учитывая крайнюю клиническую значимость разработки маркеров демиелинизирующих заболеваний содержащихся именно в легко доступных биологических жидкостях, необходимо усовершенствование методов с целью повышения их чувствительности.

В результате исследования были эффективно отработаны методики определения ФНФТ, НФЛ и бета-амилоидов 1-40 и 1-42 в ЦСЖ.

ФНФТ были выбраны к исследованию, как наиболее широко изученный маркер аксональной деструкции. НФЛ также являются структурным компонентом цитоскелета аксона, однако исследования по их количественному содержанию в биологических жидкостях пациентов крайне немногочисленны.

Белки, входящие в состав цитоскелета нейрона могут подвергаться воздействию ферментов. На С-конце НФС и НФТ в аксонах находятся повторы лизин-серин-пролин (высококонсервативные KSP – повторы), которые могут подвергаться фосфорилированию [31]. В норме фосфорилирование нейрофиламентов происходит в цитоплазме нейрона, в последующем фосфорилированные протеины транспортируются по аксону. Следствием такой компартиментализации фосфорилирования является следующее распределение

нейрофиламентов: нефосфорилированные цепи в норме определяются практически только в пределах аксона, фосфорилированные же цепи могут быть гистохимически выявлены в аксоне. Признаком нарушения аксонального транспорта, а то есть и неродегенеративного процесса, считается появление фосфорилированных нейрофиламентов в нейронах и их гиперфосфорилированных форм в цитоплазме клетки. Степень фосфорилирования нейрофиламентов меняет презентруемые в их составе антигены, в связи с чем были разработаны антитела специфически связывающие нефосфорилированные, фосфорилированные и гиперфосфорилированные нейрофиламенты [147]. ФНФТ наиболее устойчивы к действию протеаз и, соответственно, могут быть более точно детектированы [146]. НФЛ не подвергаются фосфорилированию, так как в их цепи отсутствует С-конец богатый фосфорилируемыми аминокислотными остатками. Нами были использованы наборы для детекции именно фосфорилированных в «нормальной» степени нейрофиламентов.

При сравнении уровня ФНФТ в ЦСЖ исследуемых групп группы ОРС, РС и БАС статистически значимо между собой не отличались. Контрольная же группа значимо отличалась от остальных групп: уровень ФНФТ в контрольной группе был ниже. На основании этих данных справедливо предполагать, что аксонопатия на момент исследования имела место во всех трех исследуемых группах пациентов с неврологическими патологиями. При чем, выраженность процесса нейродегенерации в этих трех группах была одинаковой. В предыдущих исследованиях уровня ФНФТ в группах пациентов с РС и БАС было показано, что уровень данного маркера при БАС оказывается выше, чем при РС [122, 164]. Отсутствие такого отличия между группами в нашем исследовании можно объяснить ранней стадией заболевания у большинства пациентов с БАС на момент выполнения люмбальной пункции. Надо отметить, что полученные нами результаты не противоречат ранее опубликованным: в нашем исследовании прослеживается тенденция к более высокому уровню ФНФТ в группе БАС 363,42 % [131,54; 539,99] в сравнении с

РС (PPC 203,94 % [101,36; 342,83] и OPC 134,85 % [92,19; 299,41]). Сравнимый же уровень ФНФТ в группах OPC и PPC подтверждает, что нейродегенеративные изменения имеют место не только в острый период воспаления, но и продолжаются в период ремиссии. Ранее этот факт был подтвержден при морфологическом, иммуногистохимическом исследованиях [55]. По уровню НФЛ в ЦСЖ группы PPC и OPC значимо не отличались. Статистически незначимо, но уровень НФЛ при PPC 84,62% [31,65; 231,65] и OPC 70,14% [37,85; 321,32] превышал данный показатель в контрольной группе 65,02 [49,31; 176,37]. Обращает также на себя внимание широкое распределение значений данного параметра в группе PPC. Было получено значимое отличие контрольной группы от группы БАС: при БАС уровень НФЛ в ЦСЖ в 5 раз превышает уровень в ЦСЖ контроля (БАС 397,10% [106,80; 663,25], контроль 65,02 % [49,31; 176,37]). Полученное малое количество достоверных результатов по уровню данного маркера вероятно связано с меньшей стабильностью НФЛ в биологических жидкостях, в отличие от ФНФТ. Интересно, что ранее было выявлено максимальное повышение уровня НФЛ в ЦСЖ пациентов с РС в течение 49 дней от начала обострения [116]. Исследование данного маркера требует других условий забора и обработки биологического материала, а именно сокращения периода экспозиции крови в пробирке с активатором свертываемости, работа с сывороткой (центрифугирование, аликвотирование) при 4С, добавление в аликвоты ингибиторов протеаз. Однако полученные в настоящем эксперименте тенденции отражают большую выраженность процесса нейродегенерации в группе БАС и меньшую ее выраженность в группах РС, что согласуется с результатами полученными при изучении ФНФТ и с ранее выполненными работами. При сравнении результатов исследования уровня ФНФТ и НФЛ, уровень ФНФТ можно назвать более чувствительным маркером аксонального повреждения, способным отразить нейродегенеративные изменения не только при БАС, но и на ранних стадиях РС. Однако, полученная корреляция уровня НФЛ и оценки неврологического дефицита по шкале EDSS, указывает на

верность предположения об информативности данного маркера и необходимости дальнейшего уточнения его значимости. Стоит отметить, что данная корреляция получена с EDSS, оцененным на момент обострения заболевания. Корреляции оценки неврологического дефицита по одной из функциональных систем с уровнем нейрофиламентов в ЦСЖ у больных с РС выявлено не было.

Проблема детекции аутоантител в ЦСЖ и сыворотке крови объясняется неспецифичностью связывания антител, которая ранее обсуждалась в публикациях [100, 101]. Также, вероятно, имеет место, напротив, высокая специфичность антител к бета-амилоидам 1-40, 1-42. Как было выявлено ранее, конформационные изменения данных протеинов могут быть причиной различий презентуемых антигенов<sup>1</sup>. Данная проблема, может быть решена путем детерминирования возможных иммуногенных антигенов амилоидов путем математического моделирования, исключением связывания антител с пластиком и применением технологии презентации антигена на трансфецированных клетках.

Белки бета-амилоидов являются продуктом ферментативного расщепления БПА, трансмембранного белка экспрессируемого всеми клетками организма, в пределах ЦНС содержащегося преимущественно в стенках сосудов, в олигодендроцитах и нейронах [76]. Фермент, осуществляющий лизис БПА, также является трансмембранным протеином. Учитывая, что деструкция аксона является не только структурным распадом, но и сложным биохимическим процессом, исследование количественного содержания продуктов биохимической реакции, все исходные компоненты которой локализованы в мембране, представляется перспективным и информативным.

До недавнего времени патология метаболизма белков бета-амилоидов считалась специфическим признаком болезни Альцгеймера и даже рассматривалась как основа патогенеза данного заболевания. Однако развитие возможностей иммунохимии позволило расширить представления о БПА и роли его ферментативного метаболизма. Основная роль данных протеинов в

нормальной физиологии нервной системы остается невыясненной, но накопленные факты позволяют полагать, что бета-амилоиды участвуют в регуляции метаболических каскадов, межклеточном взаимодействии, влияют на скорость образования синаптических связей между нейронами. Имеющиеся данные о физиологии и биохимии БПА и бета-амилоидов не дают полного права называть их маркерами нейродегенерации, но служат основанием продолжать изучать их в данном контексте.

При исследовании уровня бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ пациентов исследуемых групп было выявлено, что уровень данного пептида значительно снижается при ОРС в сравнении с РРС, контрольной группой и группой сравнения. Настоящие данные согласуются с ранее полученными результатами, которые также выявляли снижение бета-амилоидов в ЦСЖ при РС [159].

Основными симптомами болезни Альцгеймера являются нарушение памяти и когнитивные расстройства. Данная патология ассоциирована с отложением нерастворимых бляшек бета-амилоида в межклеточном пространстве. Основным компонентом бляшек является белок амилоид 1-42. Является ли отложение бета-амилоида причиной развития заболевания до настоящего времени остается невыясненным, однако данный протеин продолжает рассматриваться как возможная причина нарушения взаимодействия нейронов. Принимая во внимание снижение уровня бета-амилоида 1-42 в ЦСЖ при обострении РС (изменение аналогичное выявленному при болезни Альцгеймера) нами была исследована наиболее частое нарушение, встречающееся при РС (нарушение скорости выполнения операций), и проведен анализ корреляции результатов теста с уровнем бета-амилоида [28, 29]. Корреляции баллов PASAT и уровня бета-амилоида 1-42 нами выявлено ни в группе ОРС, ни в группе РРС не было. В ранее же проведенном исследовании была показана положительная корреляция балла по шкале PASAT и концентрации бета-амилоида 1-42 (Morietal., 2011). По приведенным характеристикам группа пациентов в исследовании Mori была сравнима с исследуемой нами по числу пациентов, их возрасту, но отличалась

более выраженным неврологическим дефицитом (EDSS до 5). Вероятно, что нами данной корреляции получено не было ввиду включения в исследование пациентов на ранней стадии заболевания с менее выраженным неврологическим дефицитом.

При исследовании уровня бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ были выявлены отличия близкие к полученным результатам по бета-амилоиду 1-42: в обострении заболевания отмечается снижение концентрации бета-амилоида 1-40 в ЦСЖ в сравнении с ОРС, контрольной группой и группой БАС. Группы РРС, БАС и контрольная группа по данному параметру между собой не отличались. Надо отметить, что кратность снижения концентраций бета-амилоида 1-40 и бета-амилоида 1-42 также примерно одинаковые: по нашим результатам снижение уровня бета-амилоидов происходит в 2-3 раза в сравнении с остальными исследуемыми группами.

Однако, данные маркеры нельзя считать абсолютно аналогичными.

Амилоид 1-42 менее растворим и в большей степени участвует в формировании бляшек при болезни Альцгеймера, в то время как амилоид 1-40 чаще обуславливает амилоидную ангиопатию и локализуется в стенке сосудов [41, 160]. Учитывая доказанность периваскулярной локализации бляшек РС и другие данные о вовлечении микроваскулярного русла в патогенез демиелинизирующих заболеваний (выявление антител к водным каналам астроцитов тесно ассоциированных с формирующими ГЭБ клетками сосудов, изменение характеристик венозного кровотока головного мозга у части пациентов с РС), нами и была отдельно изучена концентрация бета-амилоида 1-40. Из полученных результатов обращает внимание большой разброс значений концентрации данного маркера в контрольной группе, что возможно объясняется вариабельностью состояния микроваскулярного русла у пациентов разного возраста, однако подтверждения данного предположения положительной корреляцией с возрастом пациентов получено не было.

Бета-амилоиды 1-40 и 1-42 образуются из БПА путем воздействия различных секретаз. Альфа-секретаза расщепляет БПА таким образом, что

дальнейший метаболизм идет по не амилоидогенному пути. Трансмембранный фермент альфа-секретаза осуществляет расщепление БПА с формированием растворимого БПА 1-670, обладающего нейропротективной активностью, положительно влияющего на нейропластичность. БПА может быть также расщеплен трансмембранным ферментом BACE1. В результате воздействия данного фермента формируются растворимый бета-БПА и остающийся в цитоплазме 99-аминокислотный фрагмент. Из бета-БПА при воздействии гамма-секретазы формируются бета-амилоиды 1-40 и 1-42.

Таким образом, предполагаемыми причинами снижения уровня продуктов расщепления БПА могут быть: снижение количества самого БПА в мембранах клеток, снижение ферментативной активности BACE1 и/или гамма-секретазы, ускорение элиминации бета-амилоидов 1-40 и 1-42.

Предположение о снижении количества экспрессируемого БПА опровергается данными о напротив его накоплении в мембране аксона при повреждении волокон и нарушении антероградного транспорта белков. Однако, нельзя исключить, что изменение физико-химических свойств фосфолипидной мембраны в условиях острого воспаления нарушают стерические и конформационные взаимоотношения субстрата и фермента и несмотря на их избыточное присутствие в мембране происходит снижение скорости их взаимодействия.

Возможно, это один из защитных механизмов на повреждение нервной ткани, направленный на активацию предполагаемой нейротрофической функции БПА: повышение жизнеспособности клеток, миграционной активности и формированию большего количества синапсов. Компенсаторное же повышение экспрессии БПА и восстановление уровня бета-амилоидов может являться механизмом снижения активности Т-лимфоцитов и активированных микроглиальных клеток.

Вовлечение фермента BACE1 в патогенез демиелинизации подтверждается рядом ранее проведенных исследований. Было выявлено нарушение формирования миелиновой оболочки у мышей, нокаутированных по

гену BACE1. В исследовании Mattsson с соавторами, 2009, при сравнении уровня бета-амилоида 1-42 в группе РС и в контрольной группе было получено достоверное отличие: уровень бета-амилоида при РС был ниже, чем в контрольной группе. Следует обратить внимание, что из 66 пациентов с РС, включенных в исследование, у 41 в течение последнего месяца перед выполнением люмбальной пункции было обострение заболевания. В том же исследовании было выявлено снижение активности фермента BACE1 в ЦСЖ при РС в сравнении с контрольной группой.

Подтвержденное нами снижение концентрации бета-амилоида 1-42 в фазу обострения РС имеет большое значение в контексте данных о том, что фермент BACE1 играет роль в миелинизации и ремиелинизации аксонов. Данный фермент расщепляет нейрегулин-1 в мембране аксона, что приводит к запуску каскада активации и формированию миелиновой оболочки олигодендроцитом [91, 190]. Возможно, что именно снижение активности фермента обуславливает неполноценную ремиелинизацию аксонов при демиелинизирующих заболеваниях.

Нами была выявлена отрицательная корреляция концентрации белка в ЦСЖ и уровней бета-амилоида 1-42 и 1-40 в группе ОРС. При чем указанные корреляции с концентрацией белка статистически значимо друг от друга не отличались. С альбуминовым же индексом положительной корреляции ни для одного из амилоидов выявлено не было. Данный факт позволяет сделать вывод о том, что изменение концентрации бета-амилоида происходит не ввиду повышения проницаемости ГЭБ, а скорее по причине снижения активности отдельных протеолитических ферментов [20]. Необходимо отметить, что влияние протеолитической активности на процесс нейродегенерации было показано при БАС и других нейродегенеративных заболеваниях [6, 7].

Выявленная нами корреляция уровней бета-амилоида 1-40 и 1-42 в группе пациентов с ОРС свидетельствует в пользу того, что это снижение происходит еще на этапе метаболизма БПА и/или бета-БПА. . На данный момент известны два фермента, участвующие в метаболизме обоих белков, это

ВАСЕ1 и гамма-секретаза. Таким образом, исследование уровня обоих пептидов, бета- бета-амилоида 1-42 и бета-амилоида 1-40, позволяет предполагать, что причина изменения их концентраций в ЦСЖ при РС происходит именно путем уменьшения скорости их формирования ввиду снижения ферментативной активности данных секретаз.

Недавно было выявлено, что клетки-предшественники олигодендроцитов, специфическим мембранным маркером которых является хондроитина сульфат протеогликан, способны пролиферировать не только в клетки глии, но и в нейроны. Эти клетки-предшественники олигодендроцитов участвуют в элиминации белков-амилоидов, поглощая протеины путем пиноцитоза. Активированные клетки микроглии и астроглии также могут участвовать в пиноцитозе белков-амилоидов. Таким образом, также одной из предполагаемых причин снижения уровня амилоидов 1-40 и 1-42 может быть повышенная активность глиальных клеток и их предшественников, активация этих клеток происходит всегда при остром воспалении.

Таким образом, вероятно, изменение концентрация продуктов метаболизма БПА является звеном механизма с обратной отрицательной связью, поддерживающего стабильность аксонального волокна и нейроглиальных взаимодействий. Для более точного представления о его звеньях и разработки препаратов, влияющих на его этапы, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Нами была предпринята попытка выявить зависимость между изменениями уровня нейрофиламентов и бета-амилоидов. Значимых корреляций данных параметров ни в одной из групп нам выявить не удалось. При исследовании же соотношений исследованных маркеров было выявлено, что достаточно высокой специфичностью (73%) и чувствительностью (80%) обладает индекс равный соотношению уровня концентрации бета-амилоида 1-42 и тяжелых цепей нейрофиламентов. Снижение данного индекса до 1 и менее характерно для начальных стадий нейродегенеративного процесса при РС и БАС. Данный индекс может быть применен как с научной целью, так и в

клинической практике. С научной целью актуально было бы формирование групп больных с РС, характеризовавшихся четко отличными индексами и сравнение их по клиническим данным, данным дополнительных методов исследования (МРТ, ОКТ, вызванные потенциалы различных модальностей и др). В практической деятельности настоящий индекс может помочь прогнозировать у пациента стойкий неврологический дефицит, на более раннем этапе сосредоточить усилия на реабилитационных методах, возможно, избежать неоправданного применения цитостатической терапии.

Для примера практического применения данной зависимости могут быть рассмотрены следующие клинические случаи:

#### Клинический случай №1

Пациент А., 20 лет

Обратился в ФГБУ «НЦН» РАМН в августе 2012г.

Жалобы на момент поступления: снижение зрения на правый глаз

**Анамнез:** В апреле 2012 года в течение нескольких дней развилось онемение правой ноги и туловища до уровня 12-го ребра. В течение нескольких недель на фоне терапии (названия препаратов вспомнить затрудняется), онемение полностью регрессировало. При МРТ головного и спинного мозга выявлено поражение белого вещества грудного и шейного отделов спинного мозга, а также очаги в белом веществе головного мозга. В июле 2012 в течение 3 недель отмечал слабость в правой ноге, неустойчивость при ходьбе, за медицинской помощью не обращался. Настоящее ухудшение (пелена перед правым глазом) в течение последних 5 дней.

#### **Неврологический статус на момент обращения:**

Сознание ясное. Менингеальных знаков нет. Глазные щели, зрачки равные, движения глазных яблок в полном объеме. Чувствительность на лице сохранена. Мимические пробы выполняет удовлетворительно. Нистагма нет. Слух (при ориентировочном исследовании) сохранен. Глотание и фонация не нарушены. Язык по средней линии. Мышечная сила достаточная. Мышечный тонус не изменен. Сухожильные и периостальные рефлексы оживлены, на

руках симметричные, на ногах выше справа. Тонус не изменен. Расстройств чувствительности не выявлено. Пальце-носовая проба и пяточно-коленная проба выполняет удовлетворительно. Тазовых расстройств нет.

### **EDSS: 1,0**

Пирамидная система – 1

Мозжечковые функции – 0

Стволовые функции - 0

Чувствительность - 0

Функции тазовых органов - 0

Функции зрения - 0

Церебральные функции (функции мышления) - 0

Ходьба – 0

### **PASAT: 53**

### **Индекс прогрессирования: 0,25**

Общий анализ крови, общий анализ мочи, комплексное биохимическое исследование крови – без отклонений от реферативных значений

**Исследование ликвора :** Цвет – бесцветный, Прозрачность – полная, Цитоз – 12/3, Белок ликвора – 0,3, Глюкоза ликвора – 2,9 ммоль/л, Лимфоциты в ликворе – 25, Нейтрофилы в ликворе – 14, Плазмоциты в ликворе – 2

**Поставлен диагноз:** Рассеянный склероз, ремиттирующее течение, цереброспинальная форма, обострение.

**Проведено лечение:** Солу-медрол 5000 мг

На фоне терапии отмечена положительная динамика: улучшение зрения на правый глаз

Результаты исследования уровня маркеров нейродегенерации в ЦСЖ данного пациента представлены в таблице 10.

Таблица 10. Исследуемые маркеры в клиническом случае №1.

Маркер	Полученный результат
бета-амилоид 1-42	92,8 %
бета-амилоид 1-40	96,61 %
ФНФТ	47,78 %
НФЛ	187,18 %
Индекс бета-амилоид 1-42/ ФНФТ	1,94

Клинический случай №2

Пациент С., 29 лет

Обратился в ФГБУ «НЦН» РАМН в январе 2012г

Жалобы на момент поступления: неустойчивость при ходьбе, скованность в ногах, онемение правой половины языка

**Анамнез:**

Считает себя больным с сентября 2011 года, когда через неделю после получения тупой травмы лица возникло онемение правой половины языка, затем присоединилась шаткость при ходьбе, нечеткость речи, общая слабость. При МРТ головного мозга были выявлены множественные очаги в белом веществе головного мозга, накапливающие контрастное вещество. Состояние продолжало ухудшаться. В октябре 2011г был госпитализирован в городскую клиническую больницу, проведена пульс-терапия Солу-медрол 7000мг, состояние несколько улучшилось: уменьшилась неустойчивость, восстановилась речь. При повторном МРТ в январе 2012г выявлены новые очаги в белом веществе головного мозга, накапливающие контрастное вещество.

**Неврологический статус на момент обращения:**

Сознание ясное. Менингеальных знаков нет. Глазные щели, зрачки равные, движения глазных яблок в полном объеме. Чувствительность на лице сохранена, отмечает онемение языка. Мимические пробы выполняет удовлетворительно. Горизонтальный нистагм при взгляде вправо. Слух (при ориентировочном исследовании) сохранен. Глотание и фонация не нарушены. Язык по средней линии. Мышечная сила достаточная в руках и ногах.

Мышечный тонус не изменен. Сухожильные рефлексy живые, равные. Чётких расстройств поверхностной чувствительности не выявлено. Суставно-мышечное чувство не изменено. Пальце-носовую пробу и пяточно-коленную пробу выполняет с легкой интенцией с двух сторон. Легкое пошатывание в пробе Ромберга. Тазовых расстройств нет.

**EDSS январь 2012г: 1,5**

Пирамидная система – 0

Мозжечковые функции - 1

Стволовые функции - 1

Чувствительность - 1

Функции тазовых органов - 0

Функции зрения - 0

Церебральные функции (функции мышления) - 0

Ходьба – 0

**PASAT: 55**

**Индекс прогрессирования: 0,38**

Общий анализ крови, общий анализ мочи, комплексное биохимическое исследование крови – без отклонений от реферативных значений

**Проведено лечение:** Солу-медрол 5000 мг

Результаты исследования уровня маркеров нейродегенерации в ЦСЖ данного пациента представлены в таблице 11.

Таблица 11. Исследуемые маркеры в клиническом случае №2.

Маркер	Уровень
бета-амилоид 1-42	63,92 %
бета-амилоид 1-40	88,75 %
ФНФТ	68,37 %
НФЛ	37,18 %
Индекс бета-амилоид 1-42/ ФНФТ	0,94

Клинический случай №3

Пациент К., 32

**Жалобы** на момент поступления: Слабость в ногах, нарушение ходьбы, координации, снижение зрения, нарушение мочеиспускания

**Анамнез:** В возрасте 22 лет появились слабость в правой ноге и снижение зрения на правый глаз. При выполнении МРТ головного мозга были выявлены очаги демиелинизации. Поставлен диагноз рассеянный склероз. Получал терапию ПИТРС Интерферон -бета в течение 2 лет, затем препарат был заменен на глатирамера ацетат. В течение последующих 8 лет отмечал периодическое ухудшение состояния в виде нарастания слабости в правой ноге. Эпизоды обострения наблюдались приблизительно 2 - 4 раза в год, продолжались 3 - 4 недели. Около 4 лет назад отметил появление задержек при мочеиспускании, снижение потенции. В ноябре 2012 года резко выросла слабость в ногах, не мог пройти без посторонней помощи более 10 метров. Был госпитализирован в НЦН РАМН, проведено лечение Солу-медрол 1000мг в/в №7 с последующим приемом преднизолона per os, с положительной динамикой.

**Неврологический статус:**

Сознание ясное. Менингеальных знаков нет. Глазные щели, зрачки равные, движения глазных яблок в полном объеме. Зрение снижено на правый глаз до 0,2. Чувствительность на лице сохранена. Мимические пробы выполняет удовлетворительно. Нистагм горизонтальный при крайних отведениях в стороны, вертикальный при взгляде вверх и вниз. Слух (при ориентировочном исследовании) сохранен. Глотание и фонация не нарушены. Язык по средней линии. Мышечная сила достаточная в руках, в ногах снижена до 4 баллов. Мышечный тонус повышен в ногах по пирамидному типу. Сухожильные и периостальные рефлексы высокие с расширением зон, симметричные. Симптом Бабинского с двух сторон. Расстройств болевой и тактильной чувствительности не выявлено. Вибрационная чувствительность снижена в стопах до 5 УЕ. Пальце-носовую пробу и пяточно-коленную пробу выполняет

с легкой дисметрией. В пробе Ромберга неустойчив. Умеренное нарушение тазовых функций по типу сфинктерно-детрузорной диссинергии.

**EDSS июль 2013г: 6,5**

Пирамидная система – 3

Мозжечковые функции - 2

Стволовые функции - 2

Чувствительность - 0

Функции тазовых органов - 2

Функции зрения - 2

Церебральные функции (функции мышления) - 0

Ходьба – 6

**PASAT: 49**

**Индекс прогрессирования: 0, 054**

Общий анализ крови, общий анализ мочи, комплексное биохимическое исследование крови – без отклонений от реферативных значений

Результаты исследования уровня маркеров нейродегенерации в ЦСЖ данного пациента представлены в таблице 12.

Таблица 12. Исследуемые маркеры в клиническом случае №3.

Маркер	Уровень
бета-амилоид 1-42	66,28 %
бета-амилоид 1-40	105,15 %
ФНФТ	133,31 %
НФЛ	59,12 %
Индекс бета-амилоид 1-42/ ФНФТ	0,50

Начата терапия ПИТРС Тизабри. На фоне терапии обострений заболевания не было.

**EDSS январь 2013: 6,0**

Пирамидная система – 2

Мозжечковые функции - 2

Стволовые функции - 2

Чувствительность - 1

Функции тазовых органов - 1

Функции зрения - 1

Церебральные функции (функции мышления) - 0

Ходьба – 5

Основные характеристики клинических случаев приведены в Таблице 13.

Таблица 13. Основные характеристики клинических случаев.

	Случай 1	Случай 2	Случай 3
Длительность заболевания, месяцы	4	4	120
EDSS	1	1,5	6,5
Индекс прогрессирования	0,25	0,38	0,054
Обострение/ремиссия	Обострение	Обострение	Обострение
бета-амилоид 1-42/ ФНФТ	1,94	0,94	0,5
Замечание по случаю	Полный регресс симптомов без терапии в первые 3 обострения	Стойкий неврологический дефицит уже после терапии по поводу дебюта заболевания	Нарастание неврологического дефицита в течение всего периода заболевания, несмотря на терапию, в том числе ПИТРС

В рассмотренных клинических случаях заслуживают внимания следующие особенности. В 1-ом случае симптомы значительно регрессировали даже в отсутствие терапии, при этом соотношение бета-амилоид 1-42/ФНФТ. Оба эти факты указывают на малую выраженность дегенеративного процесса, то есть патогенетической причиной неврологического дефицита в данном случае является обратимое повреждение миелиновой оболочки.

Во 2-ом случае у пациента развился стойкий неврологический дефицит уже после дебюта заболевания, при этом пульс-терапия ГКС была проведена. Значение соотношения бета-амилоид 1-42/ФНФТ 0,94, то есть несколько менее 1. Необратимость неврологического дефицита указывает на значимую роль нейродегенерации в данном клиническом случае. С клиническими данными согласуется значение соотношения бета-амилоид 1-42/ФНФТ 0,94, близкое, но все-таки не достигающее 1.

В 3-ем случае индекс гораздо менее 1, 0,5, что, согласно результатам нашего исследования, отражает выраженность нейродегенерации у пациента. Клинические данные также указывают на необратимые изменения нервной ткани при каждом обострении: нарастание дефицита, несмотря на ГКС и иммуномодулирующую терапию.

## ВЫВОДЫ

1. Нейродегенерация является одним из ключевых звеньев патогенеза рассеянного склероза, что подтверждается выявленными уже на раннем этапе развития заболевания патохимическими изменениями.
2. У больных рассеянным склерозом с легким неврологическим дефицитом (преимущественно до 4 баллов по шкале EDSS) и отсутствием выраженных когнитивных нарушений (преимущественно более 40 баллов по шкале PASAT) не выявлены достоверные корреляции уровня маркеров нейродегенерации со степенью выраженности неврологических нарушений.
3. Наиболее чувствительным маркером нейродегенерации на ранних стадиях рассеянного склероза является уровень фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости. Повышение уровня фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости в периоды ремиссии и обострения отражает непрерывность нейродегенерации при ремиттирующем течении рассеянного склероза. Уровень легких цепей нейрофиламентов в цереброспинальной жидкости отражает нейродегенеративный процесс при боковом амиотрофическом склерозе, при рассеянном склерозе уровень данного маркера на ранних стадиях заболевания не меняется.
4. Снижение уровня бета-амилоидов 1-40 и 1-42, в цереброспинальной жидкости в стадию обострения при РС подтверждает специфичность мембрано-ассоциированных метаболических процессов для активной фазы заболевания.
5. Уровень исследованных маркеров не связан с проницаемостью гемато-энцефалического барьера, определенной по альбуминовому индексу.
6. При рассеянном склерозе снижение соотношения уровня бета-амилоида 1-42 к уровню фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов может

служить маркером начальной стадии нейродегенерации со специфичностью 83% и чувствительностью 70%.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты позволяют обосновать необходимость биохимического исследования цереброспинальной жидкости пациентов с рассеянным склерозом для выяснения выраженности нейродегенерации в конкретном клиническом случае.
2. При получении результатов анализа цереброспинальной жидкости, свидетельствующих о выраженной невоспалительной аксонопатии, следует иметь в виду высокую вероятность необратимости неврологического дефицита при планировании иммуносупрессивной терапии и реабилитационных мероприятий.
3. В последующем пациентам с выраженной невоспалительной аксонопатией кажется целесообразным назначение наиболее эффективных иммуномодуляторов (в том числе иммуномодуляторов второй линии), так как после каждого нового обострения регресс симптомов с высокой вероятностью будет неполным.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БАС - боковой амиотрофический склероз  
БПА - белок предшественник амилоида  
ВПРС - вторичнопрогредиентный РС  
ГЭБ - гематоэнцефалический барьер  
ИФА - иммуноферментный анализ  
МРТ - магнитно-резонансная томография  
НФЛ - легкие цепи нейрофиламентов  
ОКТ - оптическая когерентная томография  
ОРС - обострение РС  
ПИТРС - препараты, изменяющие течение РС  
ППРС - первичнопрогредиентный РС  
РРС - ремиссия РС  
РС - рассеянный склероз  
ФНФС - фосфорилированные средние цепи нейрофиламентов  
ФНФТ - фосфорилированные тяжелые цепи нейрофиламентов  
ЦНС - центральная нервная система  
ЦСЖ - церебро-спинальной жидкость  
ЭАЭ – экспериментальный аллергический энцефаломиелит  
ЭНМГ – электронейромиография  
ALS FRS-R - Revised ALS functional rating scale  
BACE1 -  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1  
BDNF - brain-derived neurotrophic factor  
Drp-I - dynamin-related protein-1  
EDSS - Expanded Disability Status Scale  
NF $\kappa$ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
PASAT - paced auditory serial addition test  
TOMMO40 - Translocase of the Outer Mitochondria Membrane Homolog

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1

Расширенная шкала инвалидизации (EDSS, Expanded DSS)

#### **Шкала оценки функциональных систем (FS):**

##### **Пирамидная система**

0 – норма

1 – признаки патологии без двигательных нарушений

2 – минимальные двигательные нарушения

3 – от легкого до умеренного парапареза или гемипареза (явная слабость, но большинство движений может выполняться непродолжительное время, слабость представляет для больного проблему); выраженный монопарез (движения практически полностью отсутствуют)

4 – выраженный парапарез или гемипарез (движения затруднены), умеренный тетрапарез (двигательные возможности ограничены, движения могут выполняться не продолжительное время); или моноплегия

5 – параплегия, гемиплегия или выраженный тетрапарез

6 – тетраплегия

##### **Мозжечковые функции**

0 – норма

1 – патологические симптомы без координаторных нарушений

2 – легкая атаксия (явный тремор и неловкость движений, легкие нарушения координации)

3 – умеренно выраженная туловищная атаксия или атаксия в конечностях (тремор или неловкость движений нарушают все виды движений)

4 – тяжелая атаксия во всех конечностях (большинство двигательных функций трудно выполнимо)

5 – невозможность выполнения координированных движений в связи с атаксией

Указать + в случае, если имеется слабость(3 степени или более выраженная в связи с поражением пирамидной системы)

### **Стволовые функции**

0 – норма

1 – только патологические симптомы

2 – умеренно выраженный нистагм или другие легкие нарушения

3 – грубый нистагм, выраженная слабость наружных глазодвигательных мышц, или умеренное нарушение функции черепно-мозговых нервов

4 – выраженная дизартрия или какое-либо другое нарушение функций

5 – невозможность глотать или говорить

### **Чувствительность**

0 – норма

1 – снижение вибрационной чувствительности или двумерно пространственного чувства в одной или двух конечностях

2 – легкое снижение тактильной или болевой или глубокой чувствительности и/или умеренное снижение вибрационной чувствительности в одной или двух конечностях; или снижение вибрационной чувствительности (двумерно пространственного чувства) в трёх или четырех конечностях

3 – умеренное снижение тактильной или болевой или глубокой чувствительности и/или существенное снижение вибрационной чувствительности в одной или двух конечностях; или легкое снижение тактильной или болевой и/или умеренное снижение во всех пробах на глубокую чувствительность в трёх или четырех конечностях

4 – выраженное снижение тактильной или болевой чувствительности или потеря проприоцептивной чувствительности, изолированные или в сочетании друг с другом в одной или двух конечностях; либо умеренное снижение тактильной или болевой чувствительности и/или грубое снижение проприоцептивной чувствительности в более, чем двух конечностях

5 – выпадение всех видов чувствительности в одной или двух конечностях; или умеренное снижение тактильной или болевой чувствительности и/или потеря проприоцептивной чувствительности почти на всей поверхности туловища

### **Функции тазовых органов**

(Брать за точку отсчета позывы на мочеиспускание или наиболее грубые нарушения, будь то мочеиспускание или дефекация)

0 – норма

1 – легкая задержка мочеиспускания или императивные позывы

2 – умеренно выраженная задержка или императивные позывы на мочеиспускание или дефекацию или редко возникающее недержание мочи (периодическая самокатетеризация, сдавление руками мочевого пузыря для его опорожнения или эвакуации кала при помощи пальцев)

3 – частое недержание мочи

4 – требуется практически постоянная катетеризация (и постоянные вспомогательные меры для эвакуации стула)

5 – утрата функции мочевого пузыря

6 – утрата тазовых функции

### **Функции зрения**

0 – норма

1 – скотома с остротой зрения (корректируемой) выше 0,6(20/30)

безизвестный корда

2 – скотома на стороне худшей остроты зрения с максимальной остротой зрения (корректируемой) от 0,6(20/30) до 0,35(20/59)

3 – большая скотома на стороне худшего зрения, либо ограничение полей зрения, с максимальной остротой зрения (корректируемой) от 0,35(20/59) до 0,15-0,2(20/99)

4 – на стороне хуже видящего глаза выраженное ограничение полей зрения с максимальной остротой зрения (корректируемой) от 0,2(20/100) до 0,1(20/200); 3 степени плюс максимальная острота зрения у лучше видящего глаза 0,35(20/60) и ниже

5 – максимальная острота зрения у хуже видящего глаза (корректируемой) менее 0,1(20/200); 4 степени плюс максимальная острота зрения у лучше видящего глаза 0,35(20/60) и ниже

6 – 5 степень плюс максимальная острота зрения у лучше видящего глаза 0,35(20/60) и менее

### **Церебральные функции (функции мышления)**

0 – норма

1 – только нарушения настроения (не влияющие на балл EDSS)

2 – легкое снижение мыслительных процессов

3 – умеренное снижение мыслительных процессов

4 – выраженное снижение мыслительных процессов

5 – деменция, либо некомпетентность больного

**Другие функции** (какие-либо другие неврологические симптомы, связанные с РС)

#### ***A) Спастичность***

0 – нет

1 – легкие (выявляемые только при специальных пробах)

2 – умеренные (легкое нарушение функции)

3 – выраженные (выраженные нарушения функции)

***б) Другие***

0 – нет

1 – указать какие-либо другие симптомы, связанные с РС

**Расширенная шкала инвалидизации (EDSS)**

0.0 – Норма в неврологическом статусе

1.0 – Признаков инвалидизации нет. Минимальные признаки нарушений (1 степени) в одной функциональной системе (ФС), исключая церебральную.

1.5 – Признаков инвалидизации нет. Минимальные признаки нарушений (1 степени) в более, чем одной ФС (за исключением церебральной).

2.0 – Легкие признаки инвалидизации(2 степени) в одной ФС.

2.5 – Легкие признаки инвалидизации(2 степени) в 2-х ФС.

3.0 – Умеренные признаки инвалидизации (3 степени). Либо легкие признаки инвалидизации(2 степени) в 3-х или 4-х ФС. Ходячий.

3.5 – Ходячий. Умеренные признаки инвалидизации (3 степени) в одной ФС и в 1-2 ФС-2 степени. Либо в 2-х ФС-3степени. Либо в 5ФС-2степени.

4.0 – Ходячий, посторонней помощи не требуется. Самообслуживание сохранено. Проводит в повседневной активности около 120часов. В день. Относительно выраженные признаки инвалидизации (4 степени) в 1 ФС, либо сочетание меньших степеней инвалидизации, но превышающие значения предыдущих баллов. Может пройти без посторонней помощи или остановки около500 м.

4.5 – Ходячий, посторонней помощи не требуется. Повседневная активность не нарушена. Может ходить в течение всего дня. Возможна необходимость в

небольшой помощи. Относительно выраженные признаки инвалидизации (4 степени) в 1 ФС, либо сочетание меньших степеней инвалидизации, но превышающие значения предыдущих баллов. Может пройти без посторонней помощи или остановки около 300 м.

5.0 – Может пройти без посторонней помощи или остановки около 200 м. Повседневная активность нарушена. В 1ФС-5 степень, либо сочетание меньших степеней инвалидизации, превышающее значения для 4.0 баллов.

5.5 – Может пройти без посторонней помощи или остановки около 100м. Повседневная активность ограничена. В одной ФС-5 степень, либо сочетание меньших степеней, но превышающих степени, оговоренные в пункте 4.0

6.0 – Ходьба с периодической/односторонней постоянной поддержкой около 100 м без отдыха. 3 степень в более чем 2-х ФС.

6.5 – Ходьба с постоянной поддержкой около 20 м без отдыха. 3 степень более чем в 2-х ФС.

7.0 – Не может пройти даже и 5 м без помощи. Прикован к инвалидной коляске, в которой передвигается самостоятельно. Посторонняя помощь не требуется. Повседневная активность в инвалидной коляске 12 часов в день. 4 степень более чем в 1ФС. Очень редко 5 степень только в пирамидной системе.

7.5 – Может пройти всего несколько шагов. Передвигается только в инвалидной коляске. Требуется помощь в передвижении. Не может находиться в инвалидной коляске в течение всего дня. 4 степень более чем в одной ФС.

8.0 – Прикован к кровати/стулу или передвигается в инвалидной коляске. Может находиться в ней большую часть дня. Основные функции самообслуживания сохранены. Активно пользуется руками. 4 степень в нескольких ФС.

8.5 – Прикован к постели большую часть дня. В некоторой степени может пользоваться руками. Самообслуживание частичное. 4 степень в нескольких ФС.

9.0 – Беспомощный, прикованный к постели больной. Может вступать в контакт и есть. 4 степень в большинстве ФС.

9.5 – Полностью беспомощный, прикованный к постели больной. Не может полноценно вступать в контакт или есть/глотать. 4 степень практически во всех ФС.

10 – Смерть из-за рассеянного склероза.

#### Алгоритм подсчёта EDSS

Ходьба (проходимое расстояние)		Функциональные системы (ФС)	Балл EDSS
Без поддержки	С поддержкой		
>500м		0*	0
>500м		1 ФС* = 1	1
>500м		>1 ФС* = 1	1,5
>500м		1 ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	2
>500м		2 ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	2,5
>500м		1 ФС = 3 + другие ФС от 1 до 0 или 3-4 ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	3
>500м		1 ФС = 3 + 1-2 другие ФС = 2 или 2 ФС = 3 + другие ФС от 1 до 0	3,5

		0 или 5 ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	
>500м		1 ФС = 4 + другие ФС от 1 до 0 или более 2-х ФС = 3 + другие ФС от 1 до 0 или более 5-ти ФС = 2 + другие ФС от 1 до 0	4
>300м		1 ФС = 4 + другие ФС от 1 до 0 или 5 ФС менее 4, но сочетание меньших баллов по ФС превышает пределы EDSS=4	4,5
>200м		1 ФС = 5 + другие ФС от 1 до 0 или сочетание меньших баллов по ФС превышает пределы EDSS=4,5	5
>100м		пациент может пройти без отдыха или поддержки более 100м	5,5
	100м с односторонней поддержкой	односторонняя поддержка – трость или костыль	6
	20-100м с двухсторонней поддержкой	двухсторонняя поддержка – трости или костыли, а также помощь другого человека	6,5
	менее 20м с двухсторонней поддержкой	почти полностью привязан к креслу-коляске, вращает колёса и перемещается самостоятельно; активен в кресле-коляске около	7

		12 часов в день	
	может пройти несколько шагов с двухсторонней поддержкой	поностью привязан к креслу-коляске, иногда нуждается в помощи в передвижении и вращении колёс	7,5
		почти полностью привязан к постели или креслу, или перемещается в кресле-коляске, но проводит вне постели большую часть дня; сохранены многие функции самообслуживания, в основном эффективно пользуется руками	8
		почти полностью привязан к постели на протяжении большей части дня; может пользоваться рукой/руками; сохранены некоторые функции самообслуживания	8,5
		беспомощный лежачий больной; может общаться и принимать пищу	9
		совершенно беспомощный лежачий больной; не способный в достаточной мере общаться, принимать и проглатывать пищу	9,5

		смерть от РС	10
--	--	--------------	----

*\* Стадия 1 нарушений церебральных функций (функций мышления) не принимается во внимание при определении балла EDSS.*

## Приложение 2

## Пошаговый аудиотест на серийное сложение чисел (Paced Auditory Serial Addition Test - PAS AT)

Тест является мерой когнитивной функции, создан специально для оценки быстроты и гибкости обработки воспринимаемой на слух информации, а также способности к проведению вычислений. Каждые 3 секунды (в случае PASAT-3) произносятся однозначные числа, и больной должен прибавить каждое новое число к непосредственно предшествующему числу. Результат определяется как число правильно подсчитанных сумм (из 60 возможных) в каждой пробе.

Перед каждым реальным тестом проводилась аналогичная тесту одна тренировочная проба. Если больной давал два или более правильных ответа (не обязательно последовательно), приступали к PASAT-3”.

Результаты каждого пациента заносились в следующую таблицу и в последующем обрабатывались.

1 +4	8	1	5	1	3	7	2	6
5	12	9	6	6	4	10	9	8
4	7	3	5	3	6	8	2	5
13	11	10	8	8	9	14	10	7
5	4	6	3	8	1	7	4	9
6	9	10	9	11	9	8	11	13
7	2	6	9	5	2	4	8	3
10	9	8	15	14	7	6	12	11
8	5	7	1	8	2	4	9	7
9	13	12	8	9	10	6	13	16
3	1	5	7	4	8	1	3	8
12	4	6	12	11	12	9	4	11

## Приложение 3

### Шкала ALS RFRS

#### I. РЕЧЬ:

4

Норма

3 Выявляемые речевые нарушения

2 Разборчивая речь с повторами

1 Речь, сочетающая в себе неясные, неразборчивые фразы

0 Анартрия

#### II. САЛИВАЦИЯ:

4 Норма

3 Легкий, но достоверный избыток слюны во рту, иногда – ночное слюнотечение.

2 Умеренный избыток слюны, минимальное слюнотечение.

1 Выраженный избыток слюны с постоянным слюнотечением.

0 Значительное слюнотечение, необходимость использования носового платка.

#### III. ГЛОТАНИЕ.

4 Норма.

3 Периодическое поперхивание.

2 Постоянное ограничение в диете.

1 Протертая пища.

0 Зондовое кормление.

#### IV. ПИСЬМО.

4 Норма.

3 Замедленное, растянутое, но все слова разборчивы.

2 Не все слова разборчивы.

1 Возможность держать ручку, не невозможность письма.

0 Невозможность держать ручку.

#### V. ПРИЕМ ПИЩИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОСУДЫ.

- 4 Норма.
- 3 Замедленно и неуверенно, но не требуется посторонняя помощь.
- 2 Может нарезать основные продукты, однако замедленно и неловко, нуждается в некоторой помощи.
- 1 Пища должна быть нарезана кем-то, но может сам медленно есть.
- 0 Нуждается в том, чтобы его кормили.

#### VI. ОДЕВАНИЕ И ГИГИЕНА.

- 4 Норма.
- 3 Полное независимое самообслуживание, требующее дополнительных усилий или снижена эффективность.
- 2 Периодическая помощь или использование вспомогательных методов.
- 1 Нуждается в посторонней помощи.
- 0 Полная зависимость.

#### VII. Повороты в кровати и манипулирование с постельными принадлежностями.

- 4 Норма.
- 3 Замедленно и неловко, но без посторонней помощи.
- 2 Может повернуться сам или поправить простынь, но с большим трудом.
- 1 Пытается, но не может повернуться или поправить простынь сам.
- 0 Беспомощность.

#### VIII. ХОДЬБА.

- 4 Норма.
- 3 Легкие затруднения.
- 2 Ходьба с поддержкой или помощью.
- 1 Возможны отдельные движения в ногах.
- 0 Нет произвольных движений в ногах.

#### IX. ПОДЪЕМ ПО ЛЕСТНИЦЕ.

- 4 Норма.
- 3 Замедленность.
- 2 Некоторая неуверенность или утомляемость.

1 Нуждается в поддержке, включая клюшку.

0 Невозможен.

#### X. ДИСПНОЭ

4 Нет

3 Появляется при ходьбе

2 Появляется при следующих манипуляциях (еде, питье, одевании).

1 Появляется в покое, затруднение дыхания сидя или лёжа

0 Значительное затруднение; использование ИВЛ

#### XI. ОРТОПНОЭ

4 Нет

3 Небольшие нарушения сна ночью в связи с прерывистым дыханием, не требует больше 2-х подушек

2 Требуется возвышенное положение (больше 2-х подушек)

1 Может спать только сидя

0 Не может спать

#### XII. РЕСПИРАТОРНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ

4 Нет

3 Периодическое использование ViPAP

2 Постоянное использование ViPAP ночью

1 Постоянное использование ViPAP днём и ночью

0 Инвазивная ИВЛ или трахеостомия

Общий балл:

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аскарлова Л.Ш. (1997) Нейромедиаторные аминокислоты и катехоламины при рассеянном склерозе (клинико-биохимическое исследование). Дисс. ... канд. мед. наук; Москва
2. Безпрозванный И.Б.(2010) «Система кальциевой сигнализации при нейродегенерации.» Acta Naturae 2 (1): 80-88.
3. Бобровник С.А. (2014). «Специфические и неспецифические взаимодействия антител и иммуноглобулинов с антигенами и способы анализа этих взаимодействий.» Украинский биохимический журнал 76(5): 132-139.
4. Бойко А. Н., Батышева Т. Т., Мельников М. В., Бойко О. В., Мугутдинова Б. Т., Горина Т. П., Овчаров В. В., Быкова О. В., Попова Н. Ф., Гусев Е. И. (2014) «Изучение размеров таламуса как метод оценки активности нейродегенеративного процесса у молодых пациентов с рассеянным склерозом после курса церебролизина.» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 113(2):104-110.
5. Бойко А.Н., Кукель Т.М., Лысенко М.А., Вдовиченко Т.В., Гусев Е.И. (2013) «Клиническая эпидемиология рассеянного склероза в Москве. Описательная эпидемиология на примере популяции одного из округов города» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 10: 8-14.
6. Брылев Л.В. (2009) Роль белков клеточного цикла и протеолитических ферментов в патогенезе бокового амиотрофического склероза. Дисс. ... канд. мед. наук; Москва
7. Брылев Л.В., Захарова М.Н., Завалишин И.А., Гуляева Н.В. (2012) «Нарушение гемато-энцефалического барьера при боковом амиотрофическом склерозе: современные аспекты.» Нейрохимия (1) :75-82.
8. Васильев А.В. (2008) Клинико-биохимические особенности бокового амиотрофического склероза у лиц молодого возраста. Дисс. ... канд. мед. наук; Москва
9. Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н. (2011). Рассеянный склероз. Клиническое руководство. Москва, Реал Тайм.
10. Гусев Е.И., Коновалова А.Н., Гехт А.Б. (2014) Неврология. Национальное руководство. Москва, «ГЭОТАР-Медиа»

11. Давыдовская М.В. (2012) Нейродегенеративный процесс при рассеянном склерозе: возможности оценки и коррекции Дисс. доктора. мед. наук; Москва
12. Давыдовская М.В., А.Н. Бойко, А.Е. Подопригора И.Н., Пронин В.Н., Корниенко Е.И., Гусев Е.И. (2012) «Нейродегенеративный процесс при рассеянном склерозе и возможный нейропротективный эффект терапии В-интерфероном 1a (авонекс).» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 112(7):36-41.165
13. Завалишин И.А., Головкин В.И. (2000) Рассеянный склероз. Избранные вопросы теории и практики. Москва, Минздрав России
14. Завалишин И.А., Захарова М.Н. (1999) «Гибель нейрона – кардинальная проблема неврологии и психиатрии» Вестник Российской Академии медицинских наук, (1): 28-33.
15. Завалишин И.А., Захарова М.Н. (2006) «Опыт разработки протокола ведения больных с рассеянным склерозом» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 3: 92-95
16. Завалишин И.А., Захарова М.Н., Аскарлова Л.Ш. (1997) «Современные направления в изучении патогенеза демиелинизирующих заболеваний» Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова, 97 (5): 64-67.
17. Завалишин И.А., Пирадов М.А., Бойко А.Н., Никитин С.С., Спиринов Н.Н., Переседова А.В. (2014) Аутоиммунные заболевания в неврологии. Клиническое руководство. Москва, РООИ «Здоровье человека»
18. Захарова М.Н. (1987) Клиническое значение определения лейцитинаминопептидазы при рассеянном склерозе и ретробульбарном неврите. Дисс. ... канд. мед. наук; Москва
19. Захарова М.Н. (2001) Боковой амиотрофический склероз и окислительный стресс. Дисс. ... доктора мед. наук; Москва
20. Карпенко М.Н., Абдурасулова И.Н., Клименко В.М. (2009) «Активность кальпаинов в клетках спинного мозга крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом различной тяжести.» Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова 95(12): 1407-1414.
21. Кротенко Н.В., Алифирова В.М., Иванова С.А. (2009) «Параметры антиоксидантной протекции при рассеянном склерозе.» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 109 (7): 53-56.

22. Переседова А.В. (2006) Патологические механизмы формирования неврологических нарушений при рассеянном склерозе. Дисс. ... доктора мед. наук; Москва
23. Переседова А.В. Свободнорадикальные реакции и аутоантитела к фактору роста нервов при рассеянном склерозе. Дисс. ... канд. мед. наук; Москва, 1999
24. Попова Н.Ф., Камчатнов П.Р., Рябухина О.В., Батышева Т.Т., Зайцев К.А., Бойко А.Н. (2010) «Результаты применения препарата омарон в комплексном лечении больных рассеянным склерозом» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 110(11): 17-20.
25. Попова Н.Ф., Орлова Е.В., Пашченков М.А., Бойко А.Н. (2011) «Клинико-иммунологические аспекты лечения рассеянного склероза этилметилгидроксипиридина сукцинатом» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 111(8): 53-56.
26. Прахова Л.Н., Ильвес А.Г., Петров А.М. (2009) «Атрофия головного мозга и неврологическая симптоматика у пациентов с рассеянным склерозом» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 109 (7): 32-37.
27. Пухов Р.В., Бисага Г.Н., Труфанов А.Г., Ефимцев А.Ю., Фокин В.А. (2013) «Влияние нейротрофической терапии на метаболизм головного мозга при рассеянном склерозе» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 113 (10): 97-104.
28. Трифонова Н.Н. Когнитивные изменения у больных рассеянным склерозом (клиническое, нейропсихологическое и электрофизиологическое исследование). Дисс. ... канд. мед. наук; Москва, 2006
29. Шмидт Т.Е. (2005) «Когнитивные нарушения и попытки их коррекции при рассеянном склерозе» Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 105 (9): 54-56.
30. Успенская О.В., Яхно Н.Н., Белушкина Н.Н. (2010) Нейрохимические маркеры нейродегенерации в ранней диагностике болезни Альцгеймера, сосудистой и смешанной деменции Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 110 (8): 36 - 40.
31. Ackerley S., Thornhill P., Grierson A.J., et al. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments // J Cell Biol. - 2003. - 161. №3. - P. 489-495.

32. Al-Izki S., Pryce G., Hankey DJ R., et al. Lesional-targeting of neuroprotection to the inflammatory penumbra in experimental multiple sclerosis // *Brain*. - 2014. – 137 (Pt 1). - P. 92-108.
33. Arnold D.L., Narayanan S., Antel S., Neuroprotection with glatiramer acetate: evidence from the PreCISE trial // *J Neurol*. - 2013. – 260. №7. P. - 1901-1906.
34. Augutis K., Axelsson M., Portelius E., et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of  $\beta$ -amyloid metabolism in multiple sclerosis // *Mult Scler*. - 2013. - №19(5). - P. 543-552.
35. Avsar T., Korkmaz D., Tütüncü M., et al. Protein biomarkers for multiple sclerosis: semi-quantitative analysis of cerebrospinal fluid candidate protein biomarkers in different forms of multiple sclerosis // *Mult Scler*. - 2012. - №18(8).- P. 1081-1091.
36. Axelsson M., Malmeström C., Gunnarsson M., et al. Immunosuppressive therapy reduces axonal damage in progressive multiple sclerosis // *Mult Scler*. – 2014. - № 20(1). –P. 43-50.
37. Bandaru S.S., Lin K., Roming S.L., Vellipuram R., Harney J.P. Effects of PI3K inhibition and low docosahexaenoic acid on cognition and behavior // *Physiol Behav*. – 2010. - № 100(3) – P 239-244.
38. Barnes Josephine, Bartlett Jonathan W., Fox Nick C., Schott Jonathan M. Targeted Recruitment Using Cerebrospinal Fluid Biomarkers: Implications for Alzheimer's Disease Therapeutic Trials // *Journal of Alzheimer's Disease* - 2013. - № 34 (2).
39. Bartos A., Fialová L., Soukupová J., Kukul J., Malbohan I., Pit'ha J. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis // *J Neurol*. – 2007.- № 254(1). – P. 20-25.
40. Bechtold D.A., Miller S.J., Dawson A.C., et al. Axonal protection achieved in a model of multiple sclerosis using lamotrigine // *J Neurol*. – 2006.- № 253(12).- P. 1542-1551.
41. Biffi A., Greenberg S.M. Cerebral amyloid angiopathy: a systematic review // *J Clin Neurol*. – 2011. - №7(1). – P. 1-9.
42. Bittner S., Meuth S.G., Göbel K., et al. TASK1 modulates inflammation and neurodegeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system // *Brain*. – 2009. - № 132(Pt 9). – P. 2501-2516.
43. Bjartmar C., Kidd G., Mörk S., Rudick R., Trapp B.D. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in

- chronic multiple sclerosis patients // *Ann Neurol.* – 2000. - № 48(6).- P. 893-901.
44. Bjartmar C., Kinkel R.P., Kidd G., Rudick R.A., Trapp B.D. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS // *Neurology.* – 2001.- № 57(7).- P. 1248-1252.
45. Bouafia A., Golmard J-L., Thuries V., et al. Axonal expression of sodium channels and neuropathology of the plaques in multiple sclerosis // *Neuropathol Appl Neurobiol.* - 2013.
46. Brettschneider J., Petzold A., Junker A., Tumani H. Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis // *Mult Scler* – 2006. - № 12. – P. 143-148.
47. Brettschneider S., Morgenthaler N.G., Teipel S.J., et al. Decreased serum amyloid beta(1-42) autoantibody levels in Alzheimer's disease, determined by a newly developed immuno-precipitation assay with radiolabeled amyloid beta(1-42) peptide // *Biol Psychiatry.* – 2005. - № 57(7). – P. 813-816.
48. Brex P.A., Leary S.M., O'Riordan J.I., et al. Measurement of spinal cord area in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2001. - №70(4). P. 544-547.
49. Brooks B.R., Miller R.G., Swash M., Munsat T.L. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis // *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* – 2000. - № 1(5).- P. 293-299.
50. Brunholz S., Sisodia S., Lorenzo A., Deyts C., Kins S., Morfini G. Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells // *Exp brain Res.* - 2012. - № 217(3-4). – P. 353-364.
51. Bryson J.B., Hobbs C., Parsons M.J., et al. Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // *Hum Mol Genet.* – 2012.- № 21(17). – P. 3871-3882.
52. Burman J., Zetterberg H., Fransson M., Loskog A.S., Raininko R., Fagius J. Assessing tissue damage in multiple sclerosis: a biomarker approach // *Acta Neurol Scand.* - 2014.
53. Carvalho M. De, Swash M. Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis // *Amyotroph Lateral Scler.* – 2009. - № 10(1). – P. 53-57.

54. Craner M.J., Damarjian T.G., Liu S., et al. Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS // *Glia*. – 2005. - № 49(2). - P. 220-229.
55. Craner M.J., Newcombe J., Black J.A., Hartle C., Cuzner M.L., Waxman S.G. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. - № 101(21). – P. 8168-8173.
56. De Stefano N., Giorgio A., Battaglini M., et al. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes // *Neurology*. – 2010. - № 74(23). – P. 1868-1876.
57. De Stefano N., Matthews P.M., Fu L., et al. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study // *Brain*. – 1998. – P. 121.
58. De Stefano N., Narayanan S., Francis G.S., et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability // *Arch Neurol*. – 2001. - № 58(1). – P. 65-70.
59. Deane R., Bell R.D., Sagare A., Zlokovic B.V. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease // *CNS Neurol Disord Drug Targets*. – 2009. - № 8(1). – P. 16-30.
60. Derfuss T., Meinl E. Identifying autoantigens in demyelinating diseases: valuable clues to diagnosis and treatment? // *Curr Opin Neurol*. – 2012. - № 25(3). – P. 231-238.
61. Deshmukh V.A., Tardif V., Lyssiotis C.A., et al. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis // *Nature*. – 2013. - № 502(7471). – P. 327-332.
62. Dumont M., Lin M.T., Beal M.F. Mitochondria and antioxidant targeted therapeutic strategies for Alzheimer's disease // *J Alzheimers Dis*. – 2010. - № 20 Suppl 2. – P. 633-643.
63. Ehling R., Lutterotti A., Wanschitz J, et al. Increased frequencies of serum antibodies to neurofilament light in patients with primary chronic progressive multiple sclerosis // *Mult Scler*. – 2004. - № 10(6). – P. 601-606.
64. Eikelenboom M.J., Petzold A., Lazeron R.H.C., et al. Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy // *Neurology*. – 2003. - № 60(2). – P. 219-223.

65. Erickson M.A., Banks W.A. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2013. - № 33(10). P. 1500-1513.
66. Esfahani M.R., Harandi Z.A., Movasat M., et al. Memantine for axonal loss of optic neuritis // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2012. № 250(6). – P. 863-869.
67. Fath K.R., Lasek R.J. Two Classes of Actin Microfilaments Are Associated with the Inner Cytoskeleton of Axons Table L Predicted Cytoskeletal Polymer Lengths Measurement of Axoplasmic MF Lengths Ultrastructure of Axoplasm Isolation of Axoplasmic Actin MF. 1988. - № 107. P. 613-621.
68. Ferguson B., Matyszak M.K., Esiri M.M., Perry V.H. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions // *Brain.* – 1997. - № 120. – P. 393-399.
69. Fialová L., Bartos A., Svarcová J., Zimova D., Kotoucova J., Malbohan I. Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis // *J Neuroimmunol.* – 2013. - № 262. – P. 113-120.
70. Fialova L., Bartos A., Svarcova J., Zimova D., Kotoucova J. Serum and cerebrospinal fluid heavy neurofilaments and antibodies against them in early multiple sclerosis. // *J Neuroimmunol.* – 2013.- № 259(1-2).- P. 81-87.
71. Filippi M. MRI measures of neurodegeneration in multiple sclerosis: implications for disability, disease monitoring and treatment. // *J Neurol.* - 2014
72. Fowler N.O., McCall D., Chou T.C., Holmes J.C., Hanenson I.B. Electrocardiographic changes and cardiac arrhythmias in patients receiving psychotropic drugs. // *Am J Cardiol.* – 1976. - № 37(2). – P. 223-230.
73. Friese M.A., Craner M.J., Etzensperger R., et al. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. // *Nat Med.* – 2007. - № 13(12). – P. 1483-1489.
74. Friese M.A., Schattling B., Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. // *Nat Rev Neurol.* – 2014. - № 10(4). – P. 225-38.
75. Ganesalingam J., An J., Shaw C.E., Shaw G., Lacomis D., Bowser R. Combination of neurofilament heavy chain and complement C3 as CSF biomarkers for ALS. // *J Neurochem.* – 2011. - № 117(3).- P. 528-537.

76. Gehrman J., Banati R.B., Cuzner M.L., Kreutzberg G.W., Newcombe J. Amyloid precursor protein (APP) expression in multiple sclerosis lesions. // *Glia*. – 1995. - № 15(2). P. 141-151.
77. Geurts J.J.G., Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. // *Lancet Neurol*. – 2008.- № 7(9). – P. 841-851.
78. Gold B.T., Zhu Z., Brown C.A., et al. White matter integrity is associated with cerebrospinal fluid markers of Alzheimer's disease in normal adults. // *Neurobiol Aging*. - 2014.
79. Gonzalez-Velasquez F.J., Kotarek J.A., Moss M.A. Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers. // *J Neurochem*. – 2008. - № 107(2). – P. 466-477.
80. Grant J.L., Ghosn E.E.B., Axtell R.C., et al. Reversal of paralysis and reduced inflammation from peripheral administration of  $\beta$ -amyloid in TH1 and TH17 versions of experimental autoimmune encephalomyelitis. // *Sci Transl Med*. – 2012. - № 4(145).
81. Greenfield E.A., Reddy J., Lees A., et al. Monoclonal antibodies to distinct regions of human myelin proteolipid protein simultaneously recognize central nervous system myelin and neurons of many vertebrate species. // *J Neurosci Res*. – 2006. - № 83(3). – P. 415-431.
82. Gresle M.M., Liu Y., Dagley L.F., et al. Serum phosphorylated neurofilament-heavy chain levels in multiple sclerosis patients. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. - 2014.
83. Gronwall D.M. Paced auditory serial-addition task: a measure of recovery from concussion. // *Percept Mot Skills*. – 1977.- № 44(2).- P. 367-373.
84. Gruden M.A., Davudova T.B., Malisauskas M., et al. Autoimmune responses to amyloid structures of A $\beta$ (25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. // *Dement Geriatr Cogn Disord*. – 2004. - № 18(2). –P. 165-171.
85. Gunnarsson M., Malmstrom C., Axelsson M., et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. // *Ann Neurol*. – 2011. - № 69(1). – P. 83-89.
86. Haghighi S., Andersen O., Oden A., Rosengren L. Cerebrospinal fluid markers in MS patients and their healthy siblings. // *Acta Neurol Scand*. – 2004. - № 109(2). – P. 97-99.

87. Hampel H., Wilcock G., Andrieu S., et al. Biomarkers for Alzheimer's disease therapeutic trials. // *Prog Neurobiol.* – 2011. № 95(4). – P. 579-593.
88. Hauser D.N., Hastings T.G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. // *Neurobiol Dis.* – 2013. - № 51. – P. 35-42.
89. Hein Nee Maier K., Köhler A., Diem R., et al. Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis. // *Neurosci Lett.* – 2008. - № 436(1). – P. 72-76.
90. Howland D.S., Trusko S.P., Savage M.J., et al. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. // *J Biol Chem.* – 1998 - № 273(26). – P. 16576-16582.
91. Hu X., Hicks C.W., He W., et al. Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. // *Nat Neurosci.* – 2006. - № 9(12). – P. 1520-1525.
92. Huber G., Martin J.R., Löffler J., Moreau .JL. Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: an indirect antibody approach. // *Brain Res.* – 1993. - № 603(2). – P. 348-52.
93. Jaeger L.B., Dohgu S., Hwang M.C., et al. Testing the neurovascular hypothesis of Alzheimer's disease: LRP-1 antisense reduces blood-brain barrier clearance, increases brain levels of amyloid-beta protein, and impairs cognition. // *J Alzheimers Dis.* – 2009. - № 17(3). – P. 553-570.
94. Jin Y.N., Johnson G.V.W. The interrelationship between mitochondrial dysfunction and transcriptional dysregulation in Huntington disease. // *J Bioenerg Biomembr.* – 2010. - № 42(3). – P. 199-205.
95. Kappos L., Radue E-W., O'Connor P., et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. // *N Engl J Med.* – 2010. - № 362(5). – P. 387-401.
96. Kester M.I., Goos J.D.C., Teunissen .CE., et al. Associations Between Cerebral Small-Vessel Disease and Alzheimer Disease Pathology as Measured by Cerebrospinal Fluid Biomarkers. // *JAMA Neurol.* - 2014.
97. Khalil M., Enzinger C., Langkammer C., et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. // *Mult Scler.* – 2013. - № 19(4). P. 436-442.
98. Kim H-S., Kim E-M., Lee J-P., et al. C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. // *FASEB J.* – 2003. - № 17(13). – P. 1951-1953.

99. Kita Y., Baba H., Maeshima H., Nakano Y., Suzuki T., Arai H. Serum amyloid beta protein in young and elderly depression: a pilot study. // *Psychogeriatrics*. – 2009. - № 9(4). – P. 180-185.
100. Klaver A.C., Coffey M.P., Smith L.M., et al. ELISA measurement of specific non-antigen-bound antibodies to A $\beta$ 1-42 monomer and soluble oligomers in sera from Alzheimer's disease, mild cognitively impaired, and noncognitively impaired subjects. // *J Neuroinflammation*. – 2011. - № 8. – P. 93.
101. Klaver A.C., Patrias L.M., Coffey M.P., Finke J.M., Loeffler D.A. Measurement of anti-A $\beta$ 1-42 antibodies in intravenous immunoglobulin with indirect ELISA: the problem of nonspecific binding. // *J Neurosci Methods*. – 2010. - № 187(2). – P. 263-269.
102. Koo E.H., Park L., Selkoe D.J. Amyloid beta-protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1993. - № 90(10). – P. 4748-4752.
103. Kornek B., Storch M.K., Weissert R., et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. // *Am J Pathol*. – 2000. - № 157(1). – P. 267-276.
104. Kuhle J., Malmeström C., Axelsson M., et al. Neurofilament light and heavy subunits compared as therapeutic biomarkers in multiple sclerosis. // *Acta Neurol Scand*. 2013. - № 128(6). – P. e33-36.
105. Kuhle J., Regeniter A., Leppert D., et al. A highly sensitive electrochemiluminescence immunoassay for the neurofilament heavy chain protein. // *J Neuroimmunol*. – 2010. – № 220(1-2). – P. 114-119.
106. Kuhlmann T., Lingfeld G., Bitsch A., Schuchardt J., Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. // *Brain*. – 2002. - № 125(Pt 10). – P. 2202-2212.
107. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). // *Neurology*. – 1983. № 33(11). – P. 1444-1452.
108. Lamers K.J., van Engelen B.G., Gabreëls F.J., Hommes O.R., Borm G.F., Wevers R.A. Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders. // *Acta Neurol Scand*. – 1995. - № 92(3). – P. 247-251.

109. Lee K.J., Moussa C.E.H., Lee Y., et al. Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. // *Neuroscience*. – 2010. - № 169(1). – P. 344-356.
110. Lee P.H., Bang O.Y., Hwang E.M., et al. Circulating beta amyloid protein is elevated in patients with acute ischemic stroke. - *J Neural Transm.* – 2005. № 112(10). – P. 1371-1379.
111. Leyssen M., Ayaz D., Hébert S.S., Reeve S., De Strooper B., Hassan B.A. Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the *Drosophila* brain. // *EMBO J.* – 2005. - № 24(16). – P. 2944-2955.
112. Liu Y., Peterson D.A., Schubert D. Amyloid beta peptide alters intracellular vesicle trafficking and cholesterol homeostasis. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. - № 95(22). – P. 13266-13271.
113. Lucchinetti C., Brück W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M., Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* – 2000. - № 47(6). – P. 707-717.
114. Lucchinetti C.F., Popescu B.F.G., Bunyan R.F., et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. // *N Engl J Med.* – 2011. – № 365(23). – P. 2188-2197.
115. Luo Y., Sunderland T., Wolozin B. Physiologic levels of beta-amyloid activate phosphatidylinositol 3-kinase with the involvement of tyrosine phosphorylation. // *J Neurochem.* – 1996. - № 67(3). – P. 978-987.
116. Lycke J.N., Karlsson J.E., Andersen O., Rosengren L.E. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 1998. - № 64(3). – P. 402-404.
117. Mai W., Hu X., Lu Z., Peng F., Wang Y. Cerebrospinal fluid levels of soluble amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid 42 in patients with multiple sclerosis, neuromyelitis optica and clinically isolated syndrome. // *J Int Med Res.* – 2011. - № 39(6). – P. 2402-2413.
118. Malmeström C., Haghighi S., Rosengren L., Andersen O., Lycke J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. // *Neurology.* – 2003. - № 61(12). – P. 1720-1725.
119. Mancardi G., Hart B., Roccatagliata L., et al. Demyelination and axonal damage in a non-human primate model of multiple sclerosis. // *J Neurol Sci.* – 2001. - № 184(1). – P. 41-49.

120. Matsushige T., Ichiyama T., Kajimoto M., Okuda M., Fukunaga S., Furukawa S. Serial cerebrospinal fluid neurofilament concentrations in bacterial meningitis. // *J Neurol Sci.* 2009. - № 280(1-2). - P. 59-61.
121. Mattson M.P. Calcium and neurodegeneration. // *Aging Cell.* – 2007. - № 6(3). – P. 337-350.
122. Mattsson N., Axelsson M., Haghighi S., et al. Reduced cerebrospinal fluid BACE1 activity in multiple sclerosis. // *Mult Scler.* – 2009. - № 15(4). – P. 448-454.
123. Matute C. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. // *Trends Neurosci.* – 2001. - №. 24(4). – P. 224-230.
124. Mellgren A., Price R.W., Hagberg L., Rosengren L., Brew B.J., Gisslén M. Antiretroviral treatment reduces increased CSF neurofilament protein (NFL) in HIV-1 infection. // *Neurology.* – 2007. - № 69(15). P. 1536-1541.
125. Meuth S.G., Bittner S., Meuth P., Simon O.J., Budde T., Wiendl H. TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1 (TASK1) and TASK3 critically influence T lymphocyte effector functions. // *J Biol Chem.* – 2008. - № 283(21). – P. 14559-14570.
126. Meziane H., Dodart J.C., Mathis C., et al. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. - № 95(21). – P. 12683-12688.
127. Mileusnic R., Lancashire C.L., Johnston A.N., Rose S.P. APP is required during an early phase of memory formation. // *Eur J Neurosci.* – 2000. - № 12(12). – P. 4487-4495.
128. Mitosek-Szewczyk K., Gordon-Krajcer W., Flis D., Stelmasiak Z. Some markers of neuronal damage in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients in relapse. // *Folia Neuropathol.* – 2011. - № 49(3). – P. 191-196.
129. Miyazawa I., Nakashima I., Petzold A., Fujihara K., Sato S., Itoyama Y. High CSF neurofilament heavy chain levels in neuromyelitis optica. // *Neurology.* – 2007. - № 68(11). – P. 865-867.
130. Mori F., Rossi S., Sancesario G., et al. Cognitive and cortical plasticity deficits correlate with altered amyloid- $\beta$  CSF levels in multiple sclerosis. // *Neuropsychopharmacology.* – 2011. - № 36(3). – P. 559-568.
131. Morley J.E., Farr S.A. Hormesis and amyloid- $\beta$  protein: physiology or pathology? // *J Alzheimers Dis.* – 2012. - № 29(3). – P. 487-492.

132. Morsali D., Bechtold D., Lee W., et al. Safinamide and flecainide protect axons and reduce microglial activation in models of multiple sclerosis. // *Brain*. – 2013. № 136(Pt 4). – P. 1067-1082.
133. Nave K-A., Trapp B.D. Axon-glia signaling and the glial support of axon function. // *Annu Rev Neurosci*. – 2008. - № 31. – P. 535-561.
134. Newcombe J., Uddin A., Dove R., et al. Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. // *Brain Pathol*. – 2008. - № 18(1). – P. 52-61.
135. Niebroj-Dobosz I., Dziewulska D., Janik P. Auto-antibodies against proteins of spinal cord cells in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). // *Folia Neuropathol*. – 2006. - № 44(3). – P. 191-196.
136. Nikolaev A., McLaughlin T., O’Leary D.D.M., Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. // *Nature*. – 2009. - № 457(7232). – P. 981-989.
137. Nitsch R., Pohl E.E., Smorodchenko A., Infante-Duarte C., Aktas O., Zipp F. Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. // *J Neurosci*. – 2004. - № 24(10). – P. 2458-2464.
138. Norgren N., Rosengren L., Stigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. // *Brain Res*. – 2003. - № 987(1). – P. 25-31.
139. Ooms S., Overeem S., Besse K., Rikkert M.O., Verbeek M., Claassen JAHR. Effect of 1 Night of Total Sleep Deprivation on Cerebrospinal Fluid  $\beta$ -Amyloid 42 in Healthy Middle-Aged Men: A Randomized Clinical Trial. // *JAMA Neurol*. - 2014.
140. Orton S-M., Herrera B.M., Yee I.M., et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. // *Lancet Neurol*. – 2006. - № 5(11). – P. 932-936.
141. Pasol J., Feuer W., Yang C., Shaw G., Kardon R., Guy J. Phosphorylated neurofilament heavy chain correlations to visual function, optical coherence tomography, and treatment. // *Mult Scler Int*. – 2010. – P. 1-10.
142. Pellegrino N.M., Caccavo D. Variability in anticardiolipin antibody detection: role of nonspecific IgG binding and different microtiter plates. // *Clin Appl Thromb Hemost*. – 2007. - № 13(4). – P. 404-409.
143. Pettit D.L., Shao Z., Yakel J.L. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. // *J Neurosci*. – 2001. - № 21(1). – P. 120.

144. Petzold A., Altintas A., Andreoni L., et al. Neurofilament ELISA validation. // *J Immunol Methods*. – 2010. - № 352(1-2). – P. 23-31.
145. Petzold A., Plant G.T. The diagnostic and prognostic value of neurofilament heavy chain levels in immune-mediated optic neuropathies. // *Mult Scler Int*. – 2012. – P. 25-27.
146. Petzold A., Shaw G. Comparison of two ELISA methods for measuring levels of the phosphorylated neurofilament heavy chain. // *J Immunol Methods*. – 2007. - № 319(1-2). – P. 34-40.
147. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. // *J Neurol Sci*. – 2005. - № 233(1-2). – P. 183-198.
148. Pitt D., Werner P., Raine C.S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. // *Nat Med*. – 2000. - № 6(1). – P. 67-70.
149. Popescu B.F.G., Lucchinetti C.F. Pathology of demyelinating diseases. // *Annu Rev Pathol*. – 2012. - № 7. – P. 185-217.
150. Puentes F., Topping J., Kuhle J., et al. Immune reactivity to neurofilament proteins in the clinical staging of amyotrophic lateral sclerosis. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014. - № 85(3). – P. 274-278.
151. Puzzo D., Privitera L., Fa' M., et al. Endogenous amyloid- $\beta$  is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. // *Ann Neurol*. – 2011. - № 69(5). – P. 819-830.
152. Quintana F.J., Farez M.F., Izquierdo G., Lucas M., Cohen I.R., Weiner H.L. Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS. // *Neurology*. – 2012. - № 78(8). – P. 532-539.
153. Quintanilla R.A., Orellana J.A., von Bernhardi R. Understanding risk factors for Alzheimer's disease: interplay of neuroinflammation, connexin-based communication and oxidative stress. // *Arch Med Res*. – 2012. - № 43(8). – P. 632-644.
154. Rao S.M., Leo G.J., Bernardin L., Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. // *Neurology*. – 1991. - № 41(5). – P. 685-691.
155. Reddy P.H. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. // *Brain Res*. – 2011. - № 1415. – P. 136-148.

156. Reindl M., Linington C., Brehm U., et al. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. // *Brain*. – 1999. - № 122. – P. 2047-2056.
157. Reinhard C., Hébert S.S., De Strooper B. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. // *EMBO J*. – 2005. - № 24(23). – P. 3996-4006.
158. Roch J.M., Masliah E., Roch-Levecq A.C., et al. Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1994. - № 91(16). – P. 7450-7454.
159. Rossi S., Mancino R., Bergami A., et al. Potential role of IL-13 in neuroprotection and cortical excitability regulation in multiple sclerosis. // *Mult Scler*. – 2011. - № 17(11). – P. 1301-1312.
160. Rutgers K.S., van Remoortere A., van Buchem M.A., et al. Differential recognition of vascular and parenchymal beta amyloid deposition. // *Neurobiol Aging*. – 2011. - № 32(10).- P. 1774-1783.
161. Sadaba M.C., Tzartos J., Paíno C., et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. // *J Neuroimmunol*. – 2012/ - № 247(1-2). – P. 86-94.
162. Salzer J., Svenningsson A., Sundström P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. // *Mult Scler*. – 2010. - № 16(3). – P. 287-92.
163. Schattling B., Steinbach K., Thies E., et al. TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. // *Nat Med*. – 2012. - № 18(12). – P. 1805-1811.
164. Schirmer L., Antel J.P., Brück W., Stadelmann C. Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. // *Brain Pathol*. – 2011. - № 21(4). – P. 428-440.
165. Semra Y.K., Seidi O.A., Sharief M.K. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. // *J Neuroimmunol*. – 2002. - № 122(1-2). – P. 132-139.

166. Siffrin V., Radbruch H., Glumm R., et al. In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. // *Immunity*. – 2010. - № 33(3). – P. 424-436.
167. Silber E., Semra Y.K., Gregson N.A., Sharief M.K. Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. // *Neurology*. – 2002. - № 58(9). – P. 1372-1381.
168. Sjögren M., Davidsson P., Wallin A., et al. Decreased CSF-beta-amyloid 42 in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mistreatment of beta-amyloid induced by disparate mechanisms. // *Dement Geriatr Cogn Disord*. – 2002. - № 13(2). – P. 112-118.
169. Sladkova V., Mareš J., Lubenova B., et al. Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome. // *Neurol Res*. – 2011. - № 33(4). – P. 415-420.
170. Soellner I.A., Rabe J., Mauri V., Kaufmann J., Addicks K., Kuerten S. Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis. // *Clin Immunol*. – 2013. - № 149(3). – P. 519-529.
171. Song M.S., Mook-Jung I., Lee H.J., Min J.Y., Park M.H. Serum anti-amyloid-beta antibodies and Alzheimer's disease in elderly Korean patients. // *J Int Med Res*. - № 35(3). – P. 301-306.
172. Spindler M., Beal M.F., Henchcliffe C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. // *Neuropsychiatr Dis Treat*. – 2009. - № 5. – P. 597-610.
173. Srinivasan R., Sailasuta N., Hurd R., Nelson S., Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. // *Brain*. – 2005. - № 128(Pt 5). – P. 1016-1025.
174. Steinacker P., Hendrich C., Sperfeld A-D., et al. Concentrations of beta-amyloid precursor protein processing products in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. // *J Neural Transm*. – 2009. - № 116(9). – P. 1169-1178.
175. Swerdlow R.H., Burns J.M., Khan S.M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. // *Biochim Biophys Acta*. - 2013.
176. Szalardy L., Zadori D., Simu M., Bencsik K., Vecsei L., Klivenyi P. Evaluating biomarkers of neuronal degeneration and neuroinflammation in

- CSF of patients with multiple sclerosis-osteopontin as a potential marker of clinical severity. // *J Neurol Sci.* – 2013. - № 331(1-2). – P. 38-42.
177. Takano R., Misu T., Takahashi T., Sato S., Fujihara K., Itoyama Y. Astrocytic damage is far more severe than demyelination in NMO: a clinical CSF biomarker study. // *Neurology.* – 2010. -№ 75(3). – P. 208-216.
178. Talja I., Reimand T., Uibo O., et al. Antibodies to neurofilaments. // *Ann N Y Acad Sci.* 2009. - № 1173. – P 130-136.
179. Teunissen C.E., Dijkstra C., Polman C. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. - *Lancet Neurol.* – 2005. - № 4(1). – P. 32-41.
180. Thinakaran G., Koo E.H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. // *J Biol Chem.* – 2008. - № 283(44). – P. 29615-29619.
181. Tummala H., Li X., Homayouni R. Interaction of a novel mitochondrial protein, 4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1 (NIPSNAP1), with the amyloid precursor protein family. // *Eur J Neurosci.* – 2010. - № 31(11). – P. 1926-1934.
182. Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P., Abraham W.C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. // *Prog Neurobiol.* – 2003. - № 70(1). – P. 1-32.
183. Valis M., Talab R., Stourac P., Andrys C., Masopust J. Tau protein, phosphorylated tau protein and beta-amyloid42 in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. // *Neuro Endocrinol Lett.* – 2008. - № 29(6). – P. 971-976.
184. Vergo S., Craner M.J., Etzensperger R., et al. Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. // *Brain.* – 2011. - № 134(Pt 2). – P. 571-584.
185. Vickers J.C., King A.E., Woodhouse A., et al. Axonopathy and cytoskeletal disruption in degenerative diseases of the central nervous system. // *Brain Res Bull.* – 2009. - № 80(4-5). – P. 217-223.
186. Villoslada P., Arrondo G., Sepulcre J., Alegre M., Artieda J. Memantine induces reversible neurologic impairment in patients with MS. // *Neurology.* – 2009. - № 72(19). – P. 1630-1633.
187. Weksler M.E., Relkin N., Turkenich R., LaRusse S., Zhou L., Szabo P. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid

- peptide antibodies than healthy elderly individuals. // *Exp Gerontol.* – 2002. - № 37(7). – P. 943-948.
188. Wemmie J.A., Chen J., Askwith C.C., et al. The Acid-Activated Ion Channel ASIC Contributes to Synaptic Plasticity, Learning, and Memory. // *Neuron.* – 2002. - № 34(3). – P. 463-477.
189. Westermann B. Nitric oxide links mitochondrial fission to Alzheimer's disease. // *Sci Signal.* – 2009. - № 2(69). – P. 29.
190. Willem M., Garratt A.N., Novak B., et al. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. // *Science.* – 2006. - № 314(5799). – P 664-666.
191. Xiong Z-G., Pignataro G., Li M., Chang S., Simon R.P. Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases. // *Curr Opin Pharmacol.* – 2008. - № 8(1). – P. 25-32.
192. Zarate C Jr., Machado-Vieira R., Henter I., Ibrahim .L, Diazgranados N., Salvadore G. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? // *Harv Rev Psychiatry.* – 2010. - № 18(5). – P. 293-303.
193. Zhang Y., Li X., Qiao J. [Neurofilament protein light in multiple sclerosis].// *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2007/ - № 87(39). – P. 2745-2749.

*Работы, опубликованные автором*

194. Воробьева А.А., Иванова М.Н., Фоминых В.В., Захарова М.Н., Зигангирова Н.А., Гуляева Н.В. Биомаркеры при рассеянном склерозе (Обзор литературы и собственные данные) // *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова.*– 2013. №113.- С. 23-31.
195. А.А. Воробьева, В.В. Фоминых, М.В. Онуфриев, М.Н. Захарова, Н.В. Гуляева Использование тяжелых цепей фосфорилированных нейрофиламентов в качестве маркера нейродегенерации при демиелизирующих заболеваниях ЦНС // *Нейрохимия.* – 2014. - №3. - С. 254–259.
196. Симанив Т.О., Второва Н.В., Воробьева А.А., Зигангирова Н.А., Захарова М.Н. Диагностическое значение антител к аквапорину – 4 при заболеваниях центральной нервной системы // *Нейрохимия.* – 2014. - №3. - С. 246–253.
197. Воробьева А.А., Фоминых В.В., Второва Н.В., Гуляева Н.В., Зигангирова Н.А., Захарова М.Н. Биохимические маркеры

демиелинизирующих заболеваний. // Медицинский академический журнал. – 2012. - № 4.-С.26-28.

198. Воробьева А.А., Фоминых В.В., Второва Н.В., Гуляева Н.В., Зигангирова Н.А., Захарова М.Н. Биохимические маркеры демиелинизирующих заболеваний ЦНС // Материалы VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции, Новосибирск. – 2013. - С.36-41.
199. Vorobyeva A., Fominykh V., Vtorova N., Gulyaeva N., Zigangirova N., Zakharova M. Biochemical markers of CNS demyelinating diseases // Journal of the Neurological Sciences.2013. Vol. 333, No. 1.
200. Vorobyeva A., Fominykh V., Zakharova M., Gulyaeva N. Biochemical markers of neurodegeneration in multiple sclerosis // Session Multiple Sclerosis Journal. 2013.Vol. 19, No 11