

**ОМАРОВА МАДИНА АЛИЕВНА**

**ГЕНОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ  
ПАЦИЕНТОВ С РЕМИТТИРУЮЩИМ И ПЕРВИЧНО-  
ПРОГРЕССИРУЮЩИМ ВАРИАНТАМИ ТЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО  
СКЛЕРОЗА И ЛИЦ С РАДИОЛОГИЧЕСКИ ИЗОЛИРОВАННЫМ  
СИНДРОМОМ**

**3.1.24 Неврология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель**

доктор медицинских наук, профессор

**Бойко Алексей Николаевич**

**Официальные оппоненты**

доктор медицинских наук, профессор

**Сиверцева Стелла Анатольевна**

Акционерное общество «Медико-санитарная часть «Нефтяник», руководитель Тюменского областного центра рассеянного склероза

доктор медицинских наук

**Якушина Татьяна Игоревна**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», старший научный сотрудник неврологического отделения, профессор кафедры неврологии ФУВ, врач Центра рассеянного склероза.

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.05 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться на сайте <http://rsmu.ru> и в научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117503, г. Москва, ул. Островитянова, д.1

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
Доктор медицинских наук, профессор



**Боголепова Анна Николаевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования.

Рассеянный склероз (РС) считается одной из главных неврологических причин инвалидизации молодого населения. В 2016 г. в мире было зафиксировано свыше 2 млн случаев РС, это отвечает росту почти на 10% с 1990 г. [GBD, 2016]. При РС, особенно на ранних стадиях, остаются неясными этиология и патогенез нейровоспаления и нейродегенерации, что затрудняет проведение ранней диагностики, профилактики и максимально эффективной терапии на начальной стадии заболевания.

Микробиом (сообщество микроорганизмов, населяющих конкретную среду обитания) человека индивидуален и рассматривается как генетически обусловленный признак, различающийся как на видовом, так и на штаммовом уровне. Нет ни одной функции организма, на которую бы микробиом не влиял тем или иным способом. В связи с чем, его по праву можно рассматривать как особый орган или «суперорганизм», выполняющий жизненно важные функции, в том числе в развитии и функционировании нервной системы в норме и при патологии. Описаны изменения микробиома в разных тканях и биологических жидкостях человека, связанных с широким спектром аутоиммунно-воспалительных заболеваний. При РС описаны различные комбинации изменения микробиома кишечника, что позволяет говорить о патологическом функционировании оси «мозг-кишечник» при этом заболевании [Boziki M.K. и соавт., 2020]. Но полученные данные по микробиому кишечника противоречивы и зависят от методологических особенностей забора биологического материала и выбранных групп пациентов. Выявленные изменения пока трактуются как дисбаланс, патогенетическое значение которого на разных стадиях течения РС и в зависимости от получаемого лечения пока не изучено.

Микробиом у людей с рассеянным склерозом изучен, но данные о его составе в спинномозговой жидкости отсутствуют. Подобное исследование также не проводилось у людей с радиологически изолированным синдромом.

Цереброспинальная жидкость (ЦСЖ, ликвор), которая омывает всю ЦНС и часто находится в прямом контакте с пораженным участком, может служить ценным источником биомаркеров различных заболеваний нервной системы. В качестве таких маркеров могут выступать свободные внеклеточные (циркулирующие) мтДНК и яДНК, микроРНК. Изменение последних в ликворе было показано для болезни Альцгеймера [Zhao Y. и соавт., 2020], различных опухолей ЦНС [Коркова А. и соавт., 2019], у недоношенных детей после внутрижелудочкового кровоизлияния [Fejes Z. и соавт., 2020].

МикроРНК (miRNA), представляющие собой короткие одноцепочечные некодирующие РНК длиной примерно от восемнадцати до двадцати пяти нуклеотидов, принимают активное участие в регуляции экспрессии генов после транскрипции. Они могут либо замедлять, либо ускорять разложение мРНК, что в конечном итоге влияет на количество производимого клеткой белка. Обычно тканеспецифичные микроРНК участвуют в патогенезе многих заболеваний. Свободные циркулирующие микроРНК были обнаружены почти во всех жидкостях человеческого организма, таких как плазма и сыворотка крови, моча, слюна, слеза и ЦСЖ. На момент начала данного исследования было опубликовано несколько работ, посвященных исследованию изменений концентрации микроРНК в ЦСЖ больных РС. В одной из работ сравнивали экспрессию 380 микроРНК в составе miRNome microRNA Profilers QuantiMir Human PCR array между ЦСЖ больных РС и группой пациентов, страдающих от 19 различных неврологических заболеваний. Была показана дифференциальная экспрессия для miR-922, miR181c и miR-633 [Naghikia A. и соавт., 2012]. В другой работе при сравнении концентрации микроРНК между совокупной группой, включающей больных РС и клинически изолированный

синдром (КИС) и группой больных, включающей другие воспалительные и невоспалительные неврологические заболевания, было показано, что для больных РС и КИС характерна повышенная концентрация miR-150 в ЦСЖ [Bergman P. и соавт., 2016]. В еще одной работе было воспроизведено повышение экспрессии miR-150 в ЦСЖ больных РС. Наряду с miR-150 в этой работе выявлено увеличение экспрессии miR-328, miR-30a-5p и miR-645, а также снижение экспрессии miR-21, miR-199a-3p, miR-191, miR-365, miR-106a and miR-146a [Quintana E. и соавт., 2017]. Авторы другой работы предприняли попытку исследовать микроРНК в ЦСЖ больных РС в качестве маркера активности заболевания. При сравнении концентраций в ликворе 28-ми микроРНК между группами больных РС с контраст-позитивными (гадолиний) и контраст-негативными очагами показано, что для первых характерно стабильное повышение miR-21 и miR-146a/b [Muñoz-San Martín M. и соавт., 2019]. В другом исследовании проводили комплексный анализ, исследуя дифференциальную экспрессию микроРНК одновременно в ЦСЖ, плазме и мононуклеарных клетках периферической крови. Подтверждена ассоциация с РС повышения концентрации микроРНК miR-146a-5p, 150-5p, 155-5p в ЦСЖ. Дополнительно выявлено изменение концентраций miR-15a-3p, 124-5p, 149-3p, 29c-3p, 33a-3p, 34c-5p и 297 в ЦСЖ больных РС [Perdaens O. и соавт., 2020]. Необходимо отметить, что все эти исследования проводились путем анализа ограниченного набора микроРНК, либо методами количественной ПЦР, либо с использованием «чипов низкой плотности». Последние позволяют анализировать несколько сотен микроРНК, однако все равно не покрывают всего их разнообразия. На момент начала данного исследования для РС не было опубликовано ни одной работы, в которой весь пул микроРНК (мирном) в ЦСЖ исследовался единовременно с помощью высокопроизводительных методов, в частности методом секвенирования нового поколения (NGS). Профилирование микроРНК в ликворе лиц с РИС также ранее не проводилось.

#### **Степень разработанности темы исследования.**

Имеющиеся работы по изучению изменений микробиома в разных тканях и биологических жидкостях человека, связанных с широким спектром аутоиммунно-воспалительных заболеваний, в том числе с РС, ранее не касались ЦСЖ. Такого рода исследование проводится впервые.

В настоящее время опубликовано несколько работ, посвященных исследованию изменений концентрации микроРНК в ЦСЖ больных РС. Необходимо отметить, что все эти исследования проводились путем анализа ограниченного набора микроРНК, либо методами количественной ПЦР, либо с использованием «чипов низкой плотности». Последние позволяют анализировать несколько сотен микроРНК, однако все равно не покрывают всего их разнообразия. На момент начала данного исследования для РС не было опубликовано ни одной работы, в которой весь пул микроРНК (мирном) в ЦСЖ исследовался единовременно с помощью высокопроизводительных методов, в частности методом секвенирования нового поколения (NGS). Профилирование микроРНК в ЦСЖ лиц с РИС также ранее не проводилось.

#### **Цель исследования.**

Анализ генома (микробиома и мирнома) ЦСЖ при ремиттирующем и первично-прогрессирующем типах течения РС и РИС.

#### **Задачи исследования:**

1. Проведение скринингового исследования микробиотических показателей ЦСЖ и цельной крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) маркеров микробиоты у пациентов с ремиттирующим РС (РРС) в стадии обострения и ремиссии, ППРС, которые ранее не получали патогенетического лечения, а также лиц с РИС и контрольной группы.

2. Определение качественного состава микробиома в этих образцах.
3. Сравнение экспрессии микроРНК в ЦСЖ между пациентами с РС, ППРС, лиц с РИС и контрольной группой методом высокопроизводительного секвенирования (NGS).
4. Статистическая обработка полученных результатов.

#### **Научная новизна исследования.**

Описаны изменения микробиома в разных тканях и биологических жидкостях человека, связанных с широким спектром аутоиммунно-воспалительных заболеваний. Все исследования пока не касались «тканевой жидкости» – ликвора, что вызывает особый интерес при изучении РС и предрасполагающих состояний (РИС). Данное исследование позволило впервые должным образом оценить изменения состава и структуры микробиома ЦСЖ. С помощью метода ГХ-МС возможно обнаружить маркеры микробиоты в очень низких концентрациях, что и делает возможным анализ состава ликвора.

Свободные циркулирующие микроРНК были обнаружены почти во всех жидкостях человеческого организма, таких как плазма и сыворотка крови, моча, слюна, слеза и ЦСЖ. На момент начала данного исследования было опубликовано несколько работ, посвященных исследованию изменений концентрации микроРНК в ЦСЖ больных РС. Необходимо отметить, что все эти исследования проводились путем анализа ограниченного набора микроРНК, либо методами количественной ПЦР, либо с использованием «чипов низкой плотности». Последние позволяют анализировать несколько сотен микроРНК, однако все равно не покрывают всего их разнообразия. К моменту начала исследования для РС не было опубликовано ни одной работы, в которой весь пул микроРНК (мирном) в ЦСЖ исследовался одновременно с помощью высокопроизводительных методов, в частности методом секвенирования нового поколения (NGS). Профилирование микроРНК в ЦСЖ лиц с РИС также ранее не проводилось.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Выявленные изменения позволят качественно и количественно оценить изменения генома ЦСЖ (микробиотических показателей, микроРНК) на ранних стадиях различных типов течения РС и при РИС, что позволит выявить новые механизмы развития заболевания и предложить принципиально новые маркеры диагностики и, возможно, направления для терапии. Все это позволит внести вклад как в фундаментальную неврологию, так и практическую.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Содержание маркеров микробиоты в ЦСЖ пациентов с РС по сопоставлению с пациентами из группы контроля достоверно увеличено, что позволяет предположить участие полимикробной инфекции в этиологии и патогенезе РС.
2. Увеличение содержания микробных маркеров в ЦСЖ, при отсутствии аналогичных изменений в крови, позволяет говорить о наличии конкретного паттерна микробиотических и вирусных маркеров, который является характерным непосредственно для ЦСЖ пациентов с РС, но не для плазмы крови.
3. Повышен маркер *Pseudomonas aeruginosa* у пациентов с РС в ремиссии и РИС. С учетом данных, которые уже имеются в литературе, это говорит о вероятной молекулярной мимикрии между антигенами *Pseudomonas aeruginosa* и компонентами миелиновой оболочки.
4. При профилировании микроРНК ЦСЖ пациентов с РС, ППРС и лиц с РИС методом NGS малых РНК присутствуют и дифференциально экспрессируются (в отличие от контрольной группы) определенные микроРНК, что может указывать на участие данных микроРНК в патогенезе РС и предрасполагающих состояний (РИС) и возможно рассмотрение их в качестве

потенциальных дополнительных маркеров РС и РИС при дифференциальной диагностике с ДНЗ.

5. МикроРНК, общие для групп РРС ремиссия, ППРС и РИС, значимо отличающиеся от контрольной группы, можно рассмотреть в качестве потенциального дополнительного прогностического маркера трансформации в РС для лиц с РИС, а также прогноза типа течения при трансформации в РС при наличии микроРНК, дифференциально экспрессирующихся для РРС и ППРС. Особый интерес вызывают hsa-miR-656-3p, hsa-miR-3131, hsa-miR-6799-3p, hsa-miR-1283, hsa-miR-10396a-5p, hsa-miR-10396b-5p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-219b-5p, hsa-miR-1913, общие для РС и РИС.

#### **Степень достоверности результатов.**

За счет достаточного объема клинического и лабораторного материала и применения корректных статистических методов, соответствующих поставленным задачам, была обеспечена надежность результатов исследования. Благодаря системному анализу полученных данных в диссертации представлены обоснованные выводы, положения и рекомендации. Основные выводы работы были представлены на конференциях.

#### **Внедрение в практику.**

Результаты исследования внедрены в практическую и научную работу неврологического отделения ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России, неврологического отделения ГБУЗ «ГКБ № 24 ДЗМ», практическую работу неврологического отделения Московского центра рассеянного склероза, а также в учебную работу кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГАОУ ВО лечебного факультета «РНИМУ им. Н.И. Пирогова».

#### **Апробация работы.**

Материалы диссертации доложены на российских и международных конференциях: XXXII Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы неврологии и нейрохирургии: аутоиммунные и орфанные заболевания нервной системы: алгоритмы диагностики и лечения» 26-27 мая 2023г., г.Томск (1 место в конкурсе молодых ученых); XI Сибирская межрегиональная научно-практическая конференция «Аутоиммунные заболевания в неврологии: ранний старт – ключ к успеху» 16-18 февраля 2023г, г.Новосибирск; V юбилейный конгресс Российского Комитета Исследователей рассеянного склероза с международным участием «Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Вопросы патогенеза, диагностики и терапии» 28-30 сентября 2023г, г.Уфа (1 место в конкурсе молодых ученых); I Российский неврологический конгресс с международным участием 26-27 октября 2023г, г.Москва; Всероссийская научно-практическая конференция «Перспективные направления диагностики и терапии демиелинизирующих заболеваний» и Конференции молодых ученых по итогам Конгресса РОКИРС 2023, 15-16 декабря 2023г, г.Ярославль.

Диссертация, апробированная и одобренная 23 мая 2023 года кафедрой неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И.Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, рекомендована для защиты.

#### **Личный вклад автора.**

Автором проведен поиск и анализ научной литературы по теме диссертационной работы, составление дизайна исследования, отбор пациентов, неврологическое исследование с оценкой по шкале EDSS, анализ МРТ пациентов, люмбальная пункция с последующим забором

биоматериала, пробоподготовкой, анализ полученных результатов, статистический анализ полученных данных, подготовка докладов и научных статей.

### **Публикации по теме диссертации.**

Результаты исследования были отражены в четырех публикациях, опубликованных в научных изданиях, прошедших рецензирование ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. По теме диссертационной работы был одобрен и успешно выполнен грант РФФИ №22-15-00284.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация представлена на 131 странице, включающих перечень сокращений, вводную часть, основную часть, обзор литературы, описание материалов и методов, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации, список литературы и приложения. Приведены девятнадцать таблиц и девятнадцать рисунков. Список литературы включает 150 источников, в том числе 4 отечественных и 146 зарубежных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант №22-15-00284.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Общая характеристика объектов исследования и методы исследования.**

Протокол исследования маркеров микробиоты в крови и ликворе.

Участники и группы: исследование проведено на шестидесяти девяти неродственных пациентах с впервые диагностированным РС.

1. Формы РС в исследовании:

- Ремиттирующий (двадцать семь образцов) - в стадии ремиссии.
- Ремиттирующий (тридцать пять образцов) - в стадии обострения.
- Первично-прогрессирующий (семь образцов).

Также лица с радиологически изолированным синдромом (РИС) (10 образцов).

2. Контрольная группа: использовались образцы крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) от сорока семи пациентов с различными заболеваниями нервной системы, не связанными с аутоиммунными или воспалительными процессами. В эту группу вошли пациенты с нормотензивной гидроцефалией, болезнью двигательного нейрона, сосудистой энцефалопатией.

3. Сбор образцов: образцы крови и ЦСЖ были собраны непосредственно при кафедре неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики РНИМУ им. Н. И. Пирогова в ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА.

4. Этические аспекты:

- Получено информированное согласие на проведение люмбальной пункции от участников исследования и согласие на использование биоматериала (крови и ЦСЖ) в рамках исследования.
- Протокол исследования одобрен Этическим Комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол заседания №204 от 01.02.2021 г.).

Рассеянный склероз у пациентов был подтвержден на основании данных сбора жалоб, неврологического осмотра, нейровизуализационных данных в соответствии с действующими критериями МакДональда, 2017. Диагноз радиологический изолированный синдром устанавливался на основании нейровизуализационных данных и неврологического осмотра. Все участники исследования заполняли опросник, на основании которого заводилась анкета,

где были отражены особенности течения заболевания, а именно: возраст манифестации заболевания, какие симптомы были первыми (двигательные, чувствительные, координаторные, зрительные, тазовые нарушения), балл по EDSS и др.

Обострение РРС было достоверно подтверждено у пациентов. Для подтверждения обострения руководствовались следующими сведениями:

- Данными анкетирования пациента;
- Медицинским осмотром (неврологическим);
- Результатами МРТ с контрастным усилением.

Забор крови и ЦСЖ осуществлялся:

- a) Осуществлялся через два-три дня после появления симптомов обострения, когда обострение было подтверждено данными осмотра и МРТ.
- b) До забора биоматериалов не проводилась терапия обострения глюкокортикостероидами или плазмаферезом.

Пациенты в стадии ремиссии:

- c) Забор биоматериала производился в среднем через три месяца после последнего обострения.

Пациенты с ППРС:

- d) Забор биоматериала производился через 12 мес. с момента манифестации заболевания.

Иммунотерапия:

- Никто из пациентов ранее не получал иммуномодулирующей терапии препаратами, влияющими на течение рассеянного склероза;
- Также пациенты ранее не получали какой-либо другой терапии (иммуносупрессивной).

Контрольная группа:

Включено сорок семь пациентов:

- a. Двадцать два человека мужского пола;
- b. Двадцать пять человек женского пола.

Средний возраст:  $38.2 \pm 13.9$  лет.

Контрольная группа включала заболевания ЦНС:

- c. Не имеющие аутоиммунной или воспалительной природы;
- d. Не представляющие острых состояний (нормотензивная гидроцефалия, болезнь двигательного нейрона, сосудистая энцефалопатия).

Возрастная, гендерная и клиническая характеристика пациентов с РС и РИС, которым проводился анализ микробиотического состава крови и ликвора представлена в таблице 1.

Таблица 1. Основные характеристики пациентов с РС и лиц с РИС, которым проводился анализ микробиотического состава крови и ликвора.

Описание возрастных, гендерных, клинических характеристик	Пациенты с РРС, стадия обострения, n=35	Пациенты с РРС, стадия ремиссии, n=27	Больные ППРС n=7	РИС n=10
Пол, м/ж	14/21	10/17	4/3	5/5
Возраст (в годах)	$34.9 \pm 5.5$	$35.3 \pm 7.9$	$33.8 \pm 6.1$	$31.6 \pm 5.3$
Тяжесть состояния по шкале EDSS	$2.5 \pm 1.0$	$1.5 \pm 1.5$	$2.5 \pm 1.5$	-
Длительность заболевания (в годах)	$4.9 \pm 3.2$	$5.1 \pm 1.2$	$3.0 \pm 2.8$	$1.2 \pm 1.9$

Как можно увидеть из таблицы, все пациенты (РРС и ППРС) различались по сложности симптоматики, проявлений во время оценки по соответствующей шкале EDSS ( $p = 0.0009$  по тесту Манна-Уитни для балла по EDSS).

Протокол исследования уровней экспрессии микроРНК в ликворе.

Цель исследования: Выявить уровни экспрессии микроРНК в цереброспинальной жидкости у пациентов с различными формами РС, РИС и контрольной группы.

Объекты исследования:

Двадцать шесть неродственных пациентов с впервые диагностированным РС:

- a. Ремиттирующий РС (в ремиссии): одиннадцать образцов;
- b. Ремиттирующий РС (обострение): три образца;
- c. Первично-прогрессирующий РС: двенадцать образцов;

А также индивидуумы с радиологически изолированным синдромом (РИС): восемь образцов.

Контрольная группа: образцов для диагностики в количестве 14 (семь мужчин, семь женщин, средний возраст  $38.2 \pm 13.9$  лет; группа с заболеваниями нервной системы не аутоиммунного и не воспалительного характера (пациенты с нормотензивной гидроцефалией, болезнью двигательного нейрона, сосудистой энцефалопатией).

Характеристики образцов ЦСЖ: Образцы ЦСЖ собраны в РНИМУ им. Н. И. Пирогова, получено согласие на использование биоматериала, протокол исследования утвержден Этическим Комитетом РНИМУ (протокол №204 от 01.02.2021).

Исследование цереброспинальной жидкости: учитывались стадии заболевания и отсутствие предшествующей терапии у пациентов с рассеянным склерозом.

Обострение РРС было достоверно подтверждено у пациентов. Для подтверждения обострения руководствовались следующими сведениями:

- Данными анкетирования пациента;
- Медицинским осмотром (неврологическим);
- Результатами МРТ с контрастным усилением.

Забор ЦСЖ осуществлялся:

- a) Осуществлялся через два-три дня после появления симптомов обострения, когда обострение было подтверждено данными осмотра и МРТ;
- b) До забора биоматериалов не проводилась терапия обострения глюкокортикостероидами или плазмаферезом.

Пациенты в стадии ремиссии:

- c) Забор биоматериала производился в среднем через три месяца после последнего обострения.

Пациенты с ППРС:

- d) Забор биоматериала производился через 12 мес. с момента манифестации заболевания

Иммунотерапия:

- Никто из пациентов ранее не получал иммуномодулирующей терапии препаратами, влияющими на течение рассеянного склероза;
- Также пациенты ранее не получали какой-либо другой терапии (иммуносупрессивной).

Клиническая характеристика пациентов с РС и индивидуумов с РИС, которым проводился анализ уровней экспрессии микроРНК в ликворе представлена в таблице 2.

Таблица 2. Основные характеристики пациентов с РС и лиц с РИС, которым проводился анализ уровней экспрессии микроРНК в ликворе.

Характеристика	Пациенты с РРС, ремиссия, n=11	Пациенты с РРС, обострение, n=3	Пациенты с ППРС n=12	РИС n=8

Пол, жен./муж.	6/5	2/1	7/5	4/4
Возраст(года), средн. ± SD	35.3 ± 7.9	34.9 ± 5.5	33.8 ± 6.1	31.6 ± 5.3
EDSS, средн. ± SD	1.5 ± 1.5	2.5 ± 1.0	2.5 ± 1.5	-
Длит-ть. РС (лет), средн. ± SD	5.1 ± 1.2	4.9 ± 3.2	3.0 ± 2.8	1.2 ± 1.9

Как можно увидеть из таблицы, все пациенты (РРС и ППРС) по тяжести проявлений болезни существенно различались (что показывают результаты оценки по шкале инвалидизации EDSS ( $p = 0.0009$  по тесту Манна-Уитни для балла по EDSS)).

### **Общеклиническое исследование пациентов.**

В оценку исходного состояния пациентов вошли сбор анамнеза, общий физикальный осмотр, неврологический осмотр, с оценкой степени инвалидизации по Расширенной шкале оценки степени инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS), нейровизуализация ЦНС с помощью МРТ головного и спинного мозга (шейный и грудной отделы) с внутривенным контрастным усилением. Диагноз рассеянный склероз устанавливался на основании данных сбора жалоб, неврологического осмотра, нейровизуализационных данных в соответствии с действующими критериями МакДональда, 2017. Диагноз радиологический изолированный синдром устанавливался на основании нейровизуализационных данных и неврологического осмотра. Сопутствующие заболевания оценивались при поступлении в отделение до включения в исследование на основании жалоб пациентов, данных анамнеза, осмотра, имеющихся лабораторных данных и инструментальных методов обследования.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Всем участникам исследования проводилась люмбальная пункция для оценки микробиотического состава ЦСЖ и выделения свободной циркулирующей микроРНК из ликвора.

#### **Подготовка образцов крови.**

1. Образцы собраны в пробирки — они в качестве антикоагулянта включают ЭДТА.
2. Цельную кровь сразу замораживали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1-3 суток.
3. Далее образцы транспортировались для проведения анализа микробиотического состава с помощью хроматографии (газовой) с масс-селективным детектированием ионов (методика описана ниже).
4. Размораживали в количестве 40 мкл образцы крови (предварительно), далее, подсушивали в термостате при температуре  $+80^{\circ}\text{C}$  с добавлением металона в количестве 40 мкл с целью ускорения сушки.

#### **Подготовка образцов ЦСЖ.**

1. Предварительно после обработки пункционного поля брался смыв с кожи пациента для посева на стерильность.
2. Образцы ЦСЖ собирали в стерильные пробирки без наполнителя.
3. Образцы ЦСЖ для анализа микробиотического состава сразу же замораживались при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1-3 суток. Далее образцы транспортировались для проведения анализа микробиотического состава с помощью газовой хроматографии с масс-селективным детектированием ионов (методика описана ниже).
4. Образцы ЦСЖ для анализа микроРНК центрифугировали десять минут при 400 g (2000 об./мин.) при температура в  $+4^{\circ}\text{C}$ , отбирали супернатант с помощью стерильной пипетки в стерильные эппендорфы.
5. Далее супернатанты замораживали при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Газовая хроматография с масс-селективным детектированием ионов.

С целью оценки микробиотического состава венозной крови и ЦСЖ был применен метод ГХ-МС, — он позволяет проводить оценку микробных маркеров в биологических жидкостях [Osipov G.A. и соавт., 2011].

Методика включает:

1. Извлечение кислот(жирных), стероидов и альдегидов из плазмы (а также из ликвора).
2. Разделение компонентов методом хроматографии.
3. Обнаружение и идентификация компонентов с использованием масс-спектрометрии(МС) [Осипов Г.А. и соавт., 2010; Yang Y. и соавт., 2019].
4. Применение методики Осипова и соавторов для анализа [Osipov G.A. и соавт., 2009].
5. Предварительная подсушка образцов при плюс 80°C.
6. Добавление метанола для увеличения скорости сушки.

Ниже представлена таблица 10, иллюстрирующая этапы и описание.

Таблица 3. ГХ (газовая хроматография): этапы и описание методики

Этап	Описание
Метанолиз	Высвобод. жирных кислот в виде эфиров (метиловых) и диметилацеталей
Экстракция и дериватизация	Продукты извлекают и обрабатывают, чтобы их легче было разделить при анализе.
Пробоподготовка	Внесение в пробу стандарта — важно для того, чтобы точно измерить количество определенных веществ.
Анализ ГХ-МС	Внесение аналита в ГХ-МС для анализа с масс-селективным детектированием ([Osipov G.A. и соавт., 2009])

Ниже представлена таблица 4, иллюстрирующая характеристику работы МС.

Таблица 4 — Описание работы МС (масс-спектрометрия) [Баранов В.М. и соавт., 2009].

Характеристика работы МС	Описание
Режим сканирования ионов	Избирательное сканирование и регистрация 37 спектральных линий (масс-ионов)
Алгоритм определения масс-спектральных параметров	Позволяет обнаружить около 200 известных микробных маркеров, достаточно для идентификации и анализа более 170 таксонов микроорганизмов
Селективная регистрация минорных компонентов	Подбор интервалов времени и оптимизация набора детектируемых ионов для регистрации минорных компонентов на фоне сигналов биоматериала и химических соединений
Устранение эффектов хроматографического наложения пиков	Алгоритм помогает избежать наложения пиков хроматографии и обеспечивает точность идентификации

После проведенной хроматографии из анализа удалены маркеры тех микробов, для которых содержание близко или же = 0. Далее оценено присутствие микробиотических маркеров, которые остались, содержание которых значимо и которые являются характерными непосредственно для следующих микроорганизмов, которые представлены в таблице 5.

Таблица 5. Основные микроорганизмы, содержание маркеров которых было проанализировано с помощью ГХ-МС.

Streptococcus spp.	Actinomyces spp.	Candida spp.	Propionibacterium freudenreichii
Eggerthella lenta	Pseudonocardia spp.	Enterobacteriaceae spp. (E.coli и др.)	Streptococcus mutans (анаэробные)
Bacillus cereus	Streptomyces spp.	Clostridium spp (группа C. tetani)	Herpes spp.
Peptostreptococcus anaerobius 18623	Clostridium ramosum	Clostridium difficile	Микр грибы, кампестерол
Cl.hystolyticum/Str. Pneumonia	Fusobacterium spp./Haemophilus spp.	Aspergillus spp.	Nocardia asteroides
Nocardia spp.	Alcaligenes spp.	Prevotella spp.	Эпштейна-Барр вирус
Peptostreptococcus anaerobius 17642	Str. Farmamarensis	Eubacterium spp.	Микр грибы, ситостерол
Moraxella spp./Acinetobacter spp.	Flavobacterium spp.	Bacteroides fragilis	Propionibacterium acnes
Pseudomonas aeruginosa	Rhodococcus spp.	Staphylococcus aureus	Ruminococcus spp.
Propionibacterium spp.	Staphylococcus epidermidis	Bifidobacterium spp.	Mycobacterium spp.
Bacillus megaterium	Porphyromonas spp.	Helicobacter pylori	Blautia coccoides
Clostridium propionicum	Corynebacterium spp.	Clostridium perfringens	Kingella spp.
Stenotrophomonas maltophilia	Lactobacillus spp.	Enterococcus spp.	Actinomyces viscosus
Bacteroides hypermegas	Campylobacter mucosalis	Chlamydia trachomatis	Цитомегаловирус

#### Выделение РНК.

Для извлечения микроРНК из ликвора использовался соответствующий набор miRNeasy Serum/Plasma Kit от "Qiagen" (немецкое производство) в соответствии с инструкциями производителя. Этот набор включал в себя специальные колонки для выделения РНК, необходимые буферы (RWT и RPE) и дегазированную воду для элюции РНК из колонок. Протокол выделения включал следующие этапы (см.табл.6):

Таблица 6. Этапы протокола выделения

Этап	Шаг
Размораживание образцов ликвора	Образцы ликвора, замороженные при минус восемьдесят градусах Цельсия, размораживались.
Лизис образцов	К ста микролитрам образца ликвора добавляли пятьсот микролитров реагента для лизиса QIAzol, затем вортиксировали до полного смешивания.
Инкубация лизата	Полученный раствор лизата в тризоле инкубировался в течение пяти минут при температуре от пятнадцати до двадцати пяти градусов Цельсия.
Добавление хлороформа	К шестистам микролитрам образца добавляли сто микролитров хлороформа и интенсивно перемешивали в течение пятнадцати секунд.
Центрифугирование	Образцы центрифугировали при двенадцати тысячах оборотов в минуту и при температуре сорока градусов Цельсия в течение пятнадцати минут на центрифуге Eppendorf 5417R.

Отбор верхней водной фазы	После расслоения образца верхняя водная фаза отбиралась в новую пробирку.
Добавление этанола	В отобранную водную фазу добавляли один с половиной объема ста процентного этанола и тщательно перемешивали.
Центрифугирование	Семьсот микролитров образца переносили в колонку RNeasy MinElute, вставленную в чистую пробирку, и центрифугировали при девяти тысячах оборотов в минуту и при комнатной температуре в течение пятнадцати секунд на центрифуге Eppendorf Minispin Plus. В случае превышения суммарного объема, процедура повторялась с оставшимся раствором.
Первое промывание	В колонку RNeasy MinElute вносили семьсот микролитров буфера RWT и центрифугировали при девяти тысячах оборотов в минуту и при комнатной температуре в течение пятнадцати секунд на центрифуге Eppendorf Minispin Plus, после чего из пробирок удаляли фильтрат.
Второе промывание	В колонку RNeasy MinElute вносили пятьсот микролитров буфера RPE и центрифугировали при девяти тысячах оборотов в минуту и при комнатной температуре в течение пятнадцати секунд на центрифуге Eppendorf Minispin Plus, после чего из пробирок удаляли фильтрат. Затем повторно вносили пятьсот микролитров буфера RPE в RNeasy MinElute, центрифугировали пару минут при девяти тысячах оборотов в минуту и при температуре от восемнадцати до двадцати градусов Цельсия.
Высушивание мембраны	RNeasy MinElute помещали непосредственно в чистую пробирку и кроме того центрифугировали при девяти тысячах оборотов в минуту и при температуре от пятнадцати до двадцати пяти градусов Цельсия в течение одной минуты для высушивания мембраны колонки.
Элюция РНК	RNeasy MinElute (колонку) помещали непосредственно в чистую пробирку и кроме того вносили на мембрану колонки тридцать микролитров дегазированной воды, очищенной от нуклеаз. Центрифугировали одну минуту при девяти тысячах оборотов в минуту и при температуре от восемнадцати до двадцати градусов Цельсия для элюции РНК.

Для выполнения оценки таких показателей, как количество и качество РНК, которая была выделена, был применен соответствующий спектрофотометр NanoDrop™2000 (капельный). Концентрация РНК при волне 260 нм была измерена, взяты образцы с соответствующим соотношением плотности 260/280 (оптической) > 2 или = 2 для дальнейшей работы. Для оценки степени деградации РНК был применен соответствующий индекс РНК—RIN (целостности) посредством QIAxcel Advanced System (капиллярный гель-электрофорез).

Были выбраны образцы с RIN>8 для проведения дальнейшего исследования (см.рис 1).

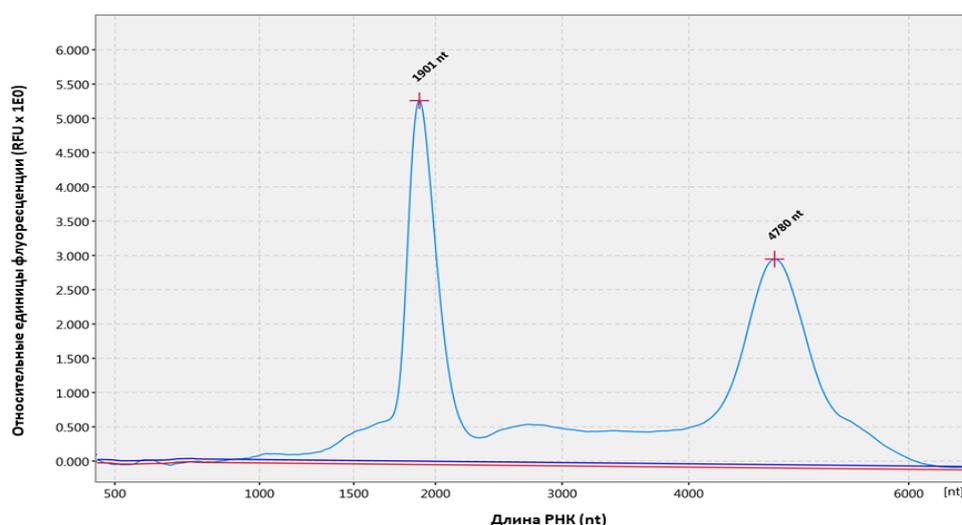


Рисунок 1. Электрофореграмма тотальной РНК, выделенной из ликвора. На электрофореграмме тотальной РНК из ликвора наблюдается два пика: один соответствует 28S рибосомной РНК (около 4тыс. 800 нуклеотидов), а другой - 18S рибосомной РНК (приблизительно 1тыс.900 нуклеотидов). Индекс целостности РНК (RIN) для образца составляет 9.2.

#### **Выделение и последующее секвенирование микроРНК ЦСЖ.**

Для создания библиотек, содержащих малые РНК, для дальнейшего секвенирования с использованием технологии сPAS на соответствующей платформе DNBSEQ-G400, применялись наборы MGIEasy Small RNA Library Prep Kit непосредственно от MGI (КНР) в соответствии с инструкциями. Этапы пробоподготовки включали в себя: фрагментацию РНК, обратную транскрипцию, лигирование адаптеров, амплификацию, циркуляризации ДНК и финальную очистку библиотеки перед секвенированием. Циркуляризованные продукты были денатурированы, амплифицированы с использованием phi29 для формирования клубков ДНК, содержащих не менее 300 копий каждой последовательности.

Далее проводился анализ качества полученных библиотек, включающий определение размеров методом микроэлектрофореза и концентраций методом флуориметрии.

Следующим этапом проводилось секвенирование полученных библиотек по принципу сPAS на платформе DNBSEQ-G400 в режиме одноконцевых чтений длиной 50 п.о с генерацией не менее 20 млн. чтений на каждый образец.

Результаты секвенирования были представлены в формате FASTQ.

#### **Анализ данных секвенирования микроРНК.**

Анализ данных секвенирования проводился с использованием последовательности инструментов обработки (пайплайна) - nf-core/smrnaseq (Small RNA-Seq Best Practice Analysis Pipeline) версии 2.1.0 проекта nf-core [Ewels P.A. и соавт., 2020]. Качество сырых прочтений (ридов), полученных в ходе секвенирования, определялось при помощи программного обеспечения (ПО) FastQC версии 0.11.9 [Kozomara A. и соавт., 2019; Ben Langmead и соавт., 2009]

#### **Статистический обработка результатов исследования.**

При проведении анализа содержания микробиотических маркеров с помощью хроматографии оценивалось содержание около 200 маркеров. После хроматографии были

удалены маркеры, значение которых было близко или равно 0. Далее проведен Т-тест (тест Стьюдента) для микробных маркеров и сформированы диаграммы в виде ящиков с усами, определены медиана, верхний и нижний квартиль. Значимым считалось содержание маркера, уровень которого отличался от контрольной группы не менее чем в 2 раза ( $p < 0.05$ ). Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ STATISTICA StatSoft (США) и Excel.

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования:

1. Пакет для проведения анализа: DESeq2 версии 1.36.0 [Robinson M.D. и соавт., 2010]
2. Поправка на сравнения (множествен-е): Метод Бенджамини-Хохберга (FDR) [Benjamini Y. и соавт., 1995]
3. Критерии дифференциальной экспрессии микроРНК:
  - а. МикроРНК считали экспрессирующейся (дифференциально) в том случае, если уровни ее экспрессии непосредственно между сопоставляемыми категориями отличались не менее чем вдвое.
  - б. Ном. значимость:  $p < 0.05$

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Содержание маркеров микробиоты в цельной крови и ЦСЖ пациентов с различными вариантами течения РС и лиц с РИС.

Метод анализа: Газовая хроматография - масс-спектрометрия (ГХ-МС).

Группы: Контрольная группа, пациенты с РС, лица с РИС.

Результаты: содержание микробиотических маркеров существенно отличалось между группами.

Примечание: результаты табл. 7 подробно описывают отличия в содержании маркеров между контрольной группой, пациентами с РС и лицами с РИС.

Таблица 7. Концентр-я микробных маркеров в ЦСЖ пациентов с РС (ППРС, РРС), лиц с РИС и контрольн. группы, нмоль/г

Маркер	Источник микробного маркера	РС обострение	РС ремиссия	РИС	ППРС	Контрольная группа
2h12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1 [0,06-0,23] p=0,58	0,19 [0,09-0,4] <b>*p=0,04</b>	0,23 [0,11-0,48] <b>*p=0,03</b>	0,07 [0,05-0,6] p=0,72	0,1 [0,04-0,2]
i14	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,18 [0,04-0,57] p=0,26	0,39 [0,16-0,61] p=0,92	0,4 [0,11-0,47] <b>*p=0,004</b>	0,1 [0,02-1,5] p=0,49	0,36 [0,06-0,68]
20:1d11	<i>Streptococcus (anaerobic)</i>	0,07 [0,04-0,15] p=0,55	0,15 [0,07-0,2] p=0,09	0,22 [0,09-0,43] p=0,06	0,08 [0,04-0,3] p=0,84	0,09 [0,03-0,18]
i12	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,23 [0,09-0,49] p=0,23	0,57 [0,29-1,17] <b>*p=0,02</b>	0,42 [0,3-0,9] p=0,17	0,42 [0,3-0,69] p=0,41	0,29 [0,15-0,56]

3h12	<i>p. Acinetobacter, Pseudomonas, Vibrio, Neisseria, Moraxella, Kingella, Ps.pertucinogena</i>	0,03 [0,01-0,05] p=0,25	0,04 [0,02-0,13] <b>*p=0,01</b>	0,04 [0,02- 0,07] <b>*p=0,03</b>	0,06 [0,04-0,08] <b>*p=0,02</b>	0,02 [0,01-0,03]
i14a	<i>Bifidobacterium, Butirivibrio</i>	0,33 [0,15-0,73] p=0,21	0,72 [0,29-1,41] <b>*p=0,002</b>	0,52 [0,5-0,55] p=0,19	0,71 [0,25-1,1] p=0,11	0,22 [0,12-0,46]
Coprostanol	<i>Eubacterium</i>	0,47 [0,2-0,84] p=0,21	0,57 [0,29-1,45] <b>*p=0,02</b>	0,37 [0,18-0,76] p=0,66	0,48 [0,4-3,1] p=0,05	0,26 [0,18-0,69]
Campesterol	<i>Кампестерол-продуцирующие микроорганизмы</i>	0,93 [0,55-2,54] p=0,87	2,01 [0,73-3,84] p=0,08	0,98 [0,46-4,16] p=0,66	1,0 [0,82-3,23] p=0,38	0,9 [0,61-1,77]
15:1d9	<i>Clostridium propionicum, Bacteroides hypermegas</i>	0,11 [0,08-0,17] p=0,46	0,16 [0,11-0,33] p=0,19	0,21 [0,14-0,32] p=0,14	0,07 [0,04-0,71] p=0,89	0,15 [0,06-0,24]
18:1d11a	<i>Eubacterium</i>	1,37 [0,79-3,46] p=0,55	1,3 [0,59-3,6] p=0,33	1,3 [0,66-3,87] p=0,66	5,36 [2,95-16,72] p=0,15	1,61 [0,67-4,6]
18:1d11	<i>Lactobacillus, Streptococcus, Pseudomonas, Cardiobacterium hominis</i>	0,94 [0,21-2,74] p=0,17	3,1 [1,34-6,57] p=0,12	1,54 [0,45-5,93] p=0,77	0,67 [0,29-2,68] p=0,61	1,76 [0,4-5,12]
a13	<i>Bacillus cereus, Brevibacterium</i>	0,02 [0,01-0,05] p=0,44	0,03 [0,02-0,06] p=0,13	0,05 [0,03-0,07] p=0,1	0,09 [0,02-0,25] p=0,13	0,023 [0,01-0,05]
i15a	<i>Butyrvibrio, Lactobacillus (rumen), Propionibacterium acnes</i>	0,18 [0,08-0,27] p=0,87	0,43 [0,17-0,94] <b>*p=0,003</b>	0,45 [0,27-1,1] <b>*p=0,02</b>	0,22 [0,12-1,37] p=0,33	0,17 [0,07-0,34]
a15a	<i>Butyrvibrio, Eubacterium, Frigoribacterium, Propionibacterium freudenreichii, Propionibacterium jensenii</i>	0,1 [0,07-0,18] p=0,74	0,29 [0,08-0,64] p=0,15	0,2 [0,11-0,28] p=0,09	0,11 [0,09-0,69] p=0,44	0,11 [0,06-0,19]
16:1d11	<i>Ruminococcus</i>	0,09 [0,05-0,29] p=0,94	0,12 [0,06-0,3] p=0,65	0,21 [0,12-0,29] p=0,13	0,14 [0,08-1,15] p=0,25	0,1 [0,04-0,24]
Epstein-Barr		0,26 [0,13-0,63] p=0,27	0,46 [0,2-0,8] <b>*p=0,013</b>	0,56 [0,33-0,74] <b>*p=0,03</b>	0,18 [0,17-1,28] p=0,42	0,23 [0,1-0,45]

2h26	Грибы <i>Aspergillus spp.</i>	0,55 [0,32-1,09] p=1,0	0,85 [0,47-1,32] p=0,11	0,53 [0,32-0,74] p=1,0	1,37 [0,38-2,6] p=0,23	0,53 [0,2-1,07]
20:1	<i>Actinomyces/Actinomyces viscosus, Propionibacterium jensenii, Streptococcus (анаэробные), Streptococcus thermophilus, St. salivarius, St. mutans</i>	0,23 [0,12-0,4] p=0,42	0,43 [0,28-0,69] <b>*p=0,01</b>	0,4 [0,18-0,72] p=0,2	0,29 [0,08-1,07] p=0,65	0,18 [0,11-0,51]
Cholestadiеноn	<i>Cytomegalovirus</i>	0,02 [0,01-0,05] p=0,73	0,02 [0,02-0,05] p=0,38	0,03 [0,02-0,07] p=0,36	0,03 [0,01-0,05] p=0,7	0,02 [0,01-0,05]
Эндотоксин (сумма)		1,01 [0,62-1,69] p=0,8	1,44 [1,09-2,71] <b>*p=0,02</b>	1,45 [1,06-2,69] p=0,05	0,96 [0,68-3,96] p=0,44	0,99 [0,61-1,71]
Плазмалоген (по 16а)		0,12 [0,06-0,37] p=0,6	0,53 [0,23-1,21] <b>*p=0,01</b>	0,25 [0,11-0,69] p=0,26	0,69 [0,13-0,94] p=0,13	0,11 [0,04-0,48]

Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля). 2h12 - 2-гидроксилауриновая; i14 - изомирамистиновая; 20:1d11 - 11-эйкозановая; i12 – изолауриновая; 3h12 - 3-гидроксилауриновая; i14a – изомиристиновый; 15:1d9 - 9,10-пентадеценная; 18:1d11a - цис-вакценовая; 18:1d11 - цис-вакценовая; a13 – антеизодекановая; a15a - антеизопентадекановая; 16:1d11 - 11,12-гексадеценная; 20:1 – арахидовая; 19сус - циклонадекановая; 14:1d7 - 7,8- тетрадеценная; 15:1d9 - 9,10-пентадеценная.

*Примечания:* \* - Статистически значимое различие между РС (РРС-обострение, РРС-ремиссия, ППРС), РИС и контрольной группой (p<0,05, двусторонний критерий Манна-Уитни).

Помимо микробных маркеров, специфичных для определенных микроорганизмов, в ЦСЖ было оценено содержание эндотоксина и плазмалогена. Источником могут являться любые виды микроорганизмов — увеличение уровня эндотоксина и плазмалогена свидетельствует об увеличении общей микробной нагруженности среды. Многие анаэробные и некоторые факультативно анаэробные бактерии производят бактериальный плазмалоген [Goldfine Н. и соавт., 2022]. Эндотоксин — липополисахарид (ЛПС), основная компонента внешней мембраны грамотрицательных бактерий [Brown G.C. и соавт., 2019]. Анализ показал статистически значимое увеличение уровня эндотоксина и плазмалогена у пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом (РРС) в стадии ремиссии. Уровень плазмалогена у них превышает показатели контрольной группы более чем в 4,5 раза.

Повышение микробной нагруженности ЦСЖ у пациентов с РС также подтверждается ростом содержания непосредственно в ЦСЖ различных маркеров, специфичных для определенных микроорганизмов. При сравнении групп пациентов обнаружено, что наиболее значимые отличия от контрольной группы наблюдались в содержании микробных маркеров в группе пациентов РРСремиссия. Например, у таких пациентов в два раза и более было увеличено содержание маркеров, специфичных для вируса Эпштейна-Барр, бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Eubacterium*, *Butirivibrio*, *Bifidobacterium* и *Propionibacterium acnes*. Также обнаружено повышение уровня кампестерола, источником которого являются кампестерол-продуцирующие микрогрибы.

На втором месте по микробной нагруженности после пациентов из группы РРС ремиссия находятся лица с РИС. У данной группы лиц обнаружено статистически значимое увеличение содержания маркеров бактерий *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Propionibacterium acnes*, *Acinetobacter*, а также маркеров вируса Эпштейна-Барр. Маркера 3h12, который специфичен для *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, обнаружен для всех сравниваемых групп, кроме группы пациентов с РРС в стадии обострения.

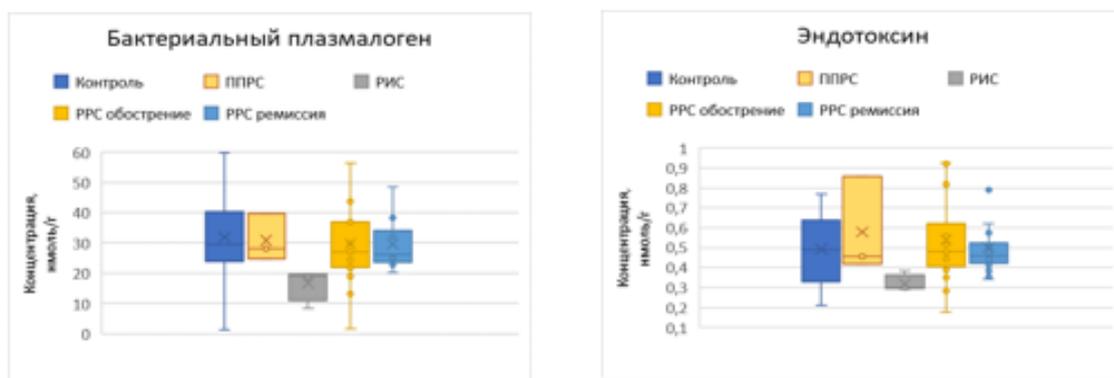
Исследование уровня микробных маркеров в цельной крови пациентов с рассеянным склерозом (РРС) в различных стадиях заболевания и контрольной группы не выявило статистически значимых различий между этими группами (см. таблицу 8).

Таблица 8. Уровень содержания микробных маркеров в цельной крови пациентов с РС в стадии обострения, ремиссии и контрольной группы, нмоль/г

Микробный маркер	РРС в стадии обострения	РРС в стадии ремиссии	Контрольная группа
Плазмалоген (по 16а)	27,11 [22,50 - 33,87] p = 0,56	26,07 [24,32 - 33,87] p = 0,86	29,52 [23,82 - 39,24]
Эндотоксин (сумма)	0,48 [0,43 - 0,69] p = 0,69	0,45 [0,43 - 0,52] p = 0,67	0,49 [0,36 - 0,63]

*Примечания:* в таблице приведены уровни содержания в цельной крови эндотоксина и плазмалогена. Не найдено статистически значимых различий. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (межквартильный размах от 25-го до 75-го перцентиля). Ниже приведены данные о содержании плазмалогена и эндотоксина в цельной крови в виде диаграмм (ящичков с усами) (рисунок 2).

Рисунок 2.



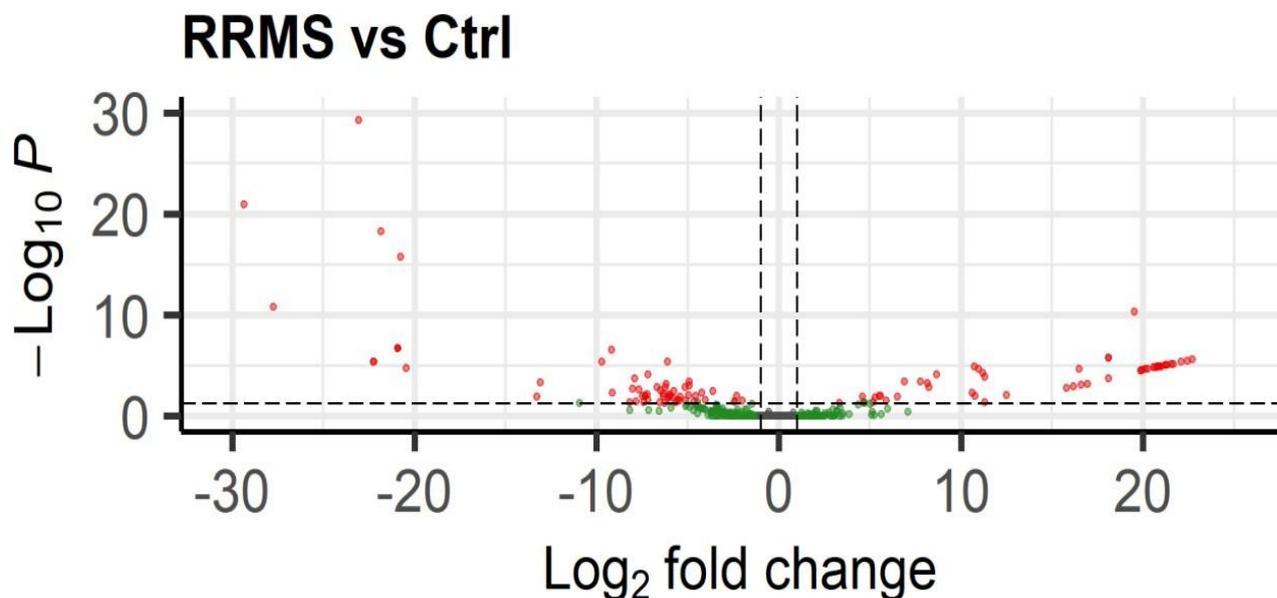
### Анализ содержания микроРНК в ЦСЖ больных РРС в стадии ремиссии, ППРС, лиц с РИС и пациентов контрольной группы.

#### Полнотранскриптомный поиск микроРНК, концентрация которых изменена у больных РРС в стадии ремиссии.

Посредством гипотеза-независимого подхода было выполнено секвенирование микроРНК в ликворе пациентов с РРС и контрольной группы для оценки возможных изменений. Профилирование микроРНК в ликворе пациентов с РРС обнаружило сто шестнадцать микроРНК, экспрессия которых отличалась более чем в два раза по сопоставлению с контрольной группой (Fold change, FC-1<Log2FC>1 и padj<0.05) (рисунок 3).

Рисунок 3.

Среди них экспрессия 54 микроРНК была повышена ( $\text{Log}_2\text{FC}>1$ ), а 62 – понижена ( $\text{Log}_2\text{FC}<-1$ ) при РРС.



**Полнотранскриптомный поиск микроРНК, концентрация которых изменена у больных ППРС.**

Анализ микроРНК в ликворе пациентов с ППРС показал двадцать восемь микроРНК, уровни которых отличались в два раза или более по сопоставлению с контрольной группой  $\text{Fold change, FC-1}<\text{Log}_2\text{FC}>1$  и  $\text{padj}<0.05$  (рисунок 4).

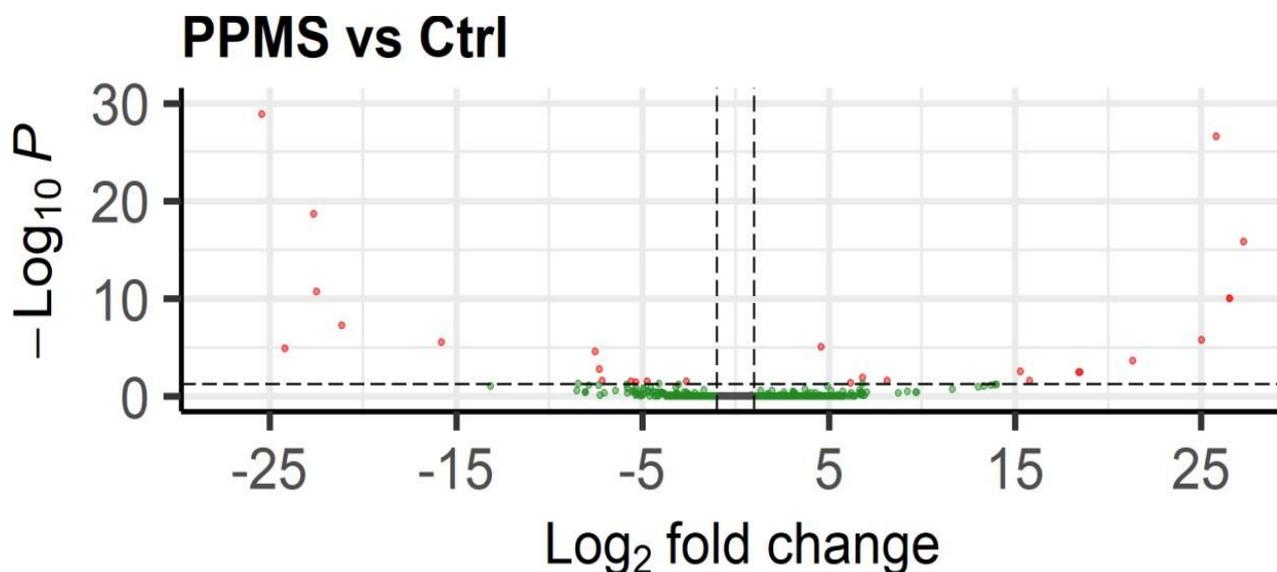


Рисунок 4.

Среди них экспрессия 15 микроРНК была повышена ( $\text{Log}_2\text{FC}>1$ ), а 13 – понижена при ППРС ( $\text{Log}_2\text{FC}<-1$ ).

**Полнотранскриптомный поиск микроРНК, концентрация которых изменена у лиц с РИС.**

Профилирование микроРНК в ликворе у лиц с РИС обнаружило сто тридцать пять микроРНК, уровни которых отличались в два и более раза по сравнению с контрольной группой. (Fold change,  $FC-1 < \text{Log}_2FC > 1$  и  $\text{padj} < 0.05$ ) (рисунок 5).

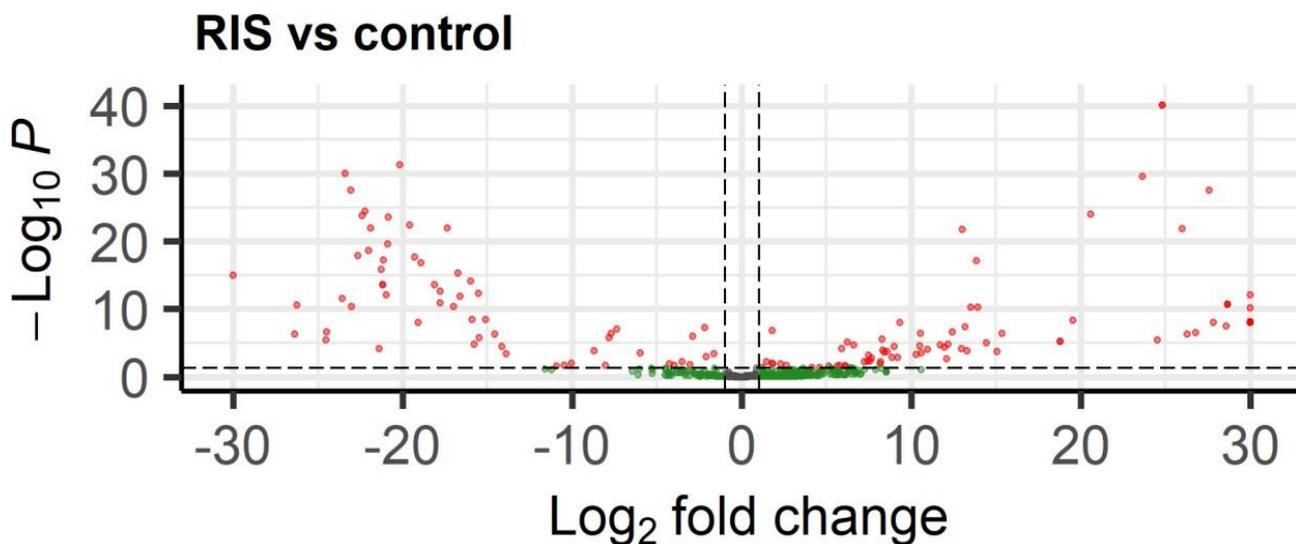


Рисунок 5.

Среди них экспрессия 75 микроРНК была повышена ( $\text{Log}_2FC > 1$ ), а 60 – понижена при РИС ( $\text{Log}_2FC < -1$ ).

#### Поиск общих микроРНК в группах РРС ремиссия, ППРС и РИС, отличающих их от контрольной группы.

Ниже представлена таблица 9, иллюстрирующая общие микроРНК, выявленные при сопоставлении отличий между группами пациентов с РРС в стадии ремиссии, ППРС, РИС и контрольной группой.

Таблица 9. Общие микроРНК, выявленные при сопоставлении отличий между группами пациентов с РРС в стадии ремиссии, ППРС, РИС и контрольной группой.

Сравнение групп	Количество общих микроРНК, отличающих от контрольной группы	Общие микроРНК (hsa-miR), отличающие данные группы от контрольной группы
РРС ремиссия vs. РИС	48	6799-3p, 3689a-5p, 3689b-5p, 487a-5p, 6765-3p, 3689e, 487b-3p, 631, и т.д.
ППРС vs. РИС	13	487b-3p, 187-3p, 6799-3p, 656-3p, 6823-3p, 10396b-5p, 12127, 1283, 3131, и т.д.
РРС ремиссия vs. ППРС	17	656-3p, -10396b-5p, -3614-5p, -518f-3p, -6515-5p, -1283, -6812-3p, -3131, -219b-5p, и т.д.
Все три группы vs. контроль	9	3131, -6799-3p, -10396b-5p, -656-3p, -10396a-5p, -1283, -487b-3p, -219b-5p, -1913.

Рис. 6 ниже иллюстрирует 9 общих микроРНК для групп РРСремиссия, ППРС и РИС при сравнении с контрольной группой.

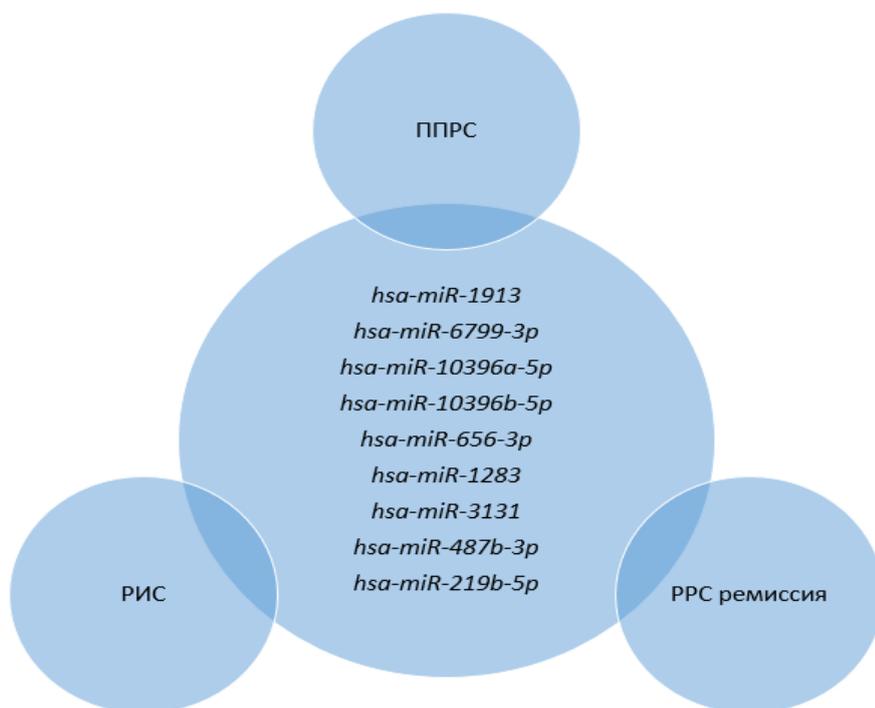


Рисунок 6. 9 общих микроРНК для групп РРСремиссия, ППРС и РИС при сравнении с контрольной группой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### **Значимость обнаруженных микробных маркеров цельной крови и ЦСЖ в этиологии и патогенезе РС.**

Проведенный анализ микробных маркеров показал наличие полимикробного инфицирования в ЦСЖ, что косвенно говорит о хроническом инфицировании в ЦНС при РС и РИС. С одной стороны, эти данные подтверждают гипотезу об участии хронического полимикробного инфицирования в развитии РС. Однако образцы содержат увеличенные уровни маркеров одних и тех же групп микроорганизмов в основном. Это может указывать непосредственно на наличие вероятного специфического инфекционного паттерна в ЦНС (при РС). Также стоит отметить, что сам механизм возникновения этого паттерна и его роль в патогенезе РС требуют дальнейшего изучения. Предполагается, что повышение уровня определенных групп микроорганизмов и их маркеров может иметь патогенетические последствия. Это будет обсуждаться далее.

Заметим, в содержании микробных маркеров в ЦСЖ пациентов с РРС в стадии ремиссии наблюдаются наибольшие различия от контрольной группы, в то время как в стадии обострения таких различий не обнаружено.

Особый интерес вызывают сравнительные данные по уровню содержания микробных маркеров в крови и ЦСЖ. Уровень содержания микробиотических маркеров в ликворе пациентов с РС увеличен по сравнению с контрольной группой, однако содержание тех же маркеров в цельной крови не изменено. Данный факт диссоциации в содержании микробных маркеров в цельной крови и ликворе, вероятно, говорит о специфических изменениях микробной нагрузки ЦНС, но не всего организма (учитывая отсутствие повышения микробиотических маркеров в крови).

В настоящем исследовании особенно обращает на себя внимание повышение уровня маркера *Pseudomonas aeruginosa* в ликворе у пациентов с РРС в стадии ремиссии и у лиц с РИС.

Интересен этот факт тем, что в литературе есть данные о возможной молекулярной мимикрии между компонентами миелиновой оболочки и антигенами *Pseudomonas aeruginosa*. В данном исследовании проводилось определение и сравнение АТ к мимикрирующим пептидам *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, основному белку миелина (ОБМ) и миелиновому олигодендрокитарному гликопротеину (МОГ) между группой пациентов с РС и контрольной группой. У пациентов с рассеянным склерозом (РС) отмечено значительное повышение уровня антител по сравнению с контрольной группой. Антисыворотки против белка миелина (ОБМ) реагировали одинаково на пептиды *Pseudomonas* и *Acinetobacter* [Hughes L.E. и соавт., 2003]. Следует отметить, что бактерии *Acinetobacter* присутствуют на коже и в носовых пазухах человека [Ebring A. и соавт., 2012].

Важное патогенетическое значение также имеет повышение уровня эндотоксина в ликворе пациентов с РС. В литературе выдвинута эндотоксиновая теория нейродегенерации [Brown G.C. и соавт., 2019], поскольку эндотоксин активирует микроглию, которая может так скажем запустить процесс нейровоспаления, продуцируя цитокины (провоспалительные), а также вызывая повреждение нейронов, продуцируя формы азота и кислорода (активные), путем фагоцитоза. Полученные результаты настоящей работы совпали непосредственно с литературными данными относительно отсутствия повышения уровня эндотоксина в цельной крови и плазме у пациентов с рассеянным склерозом (РС) по сравнению с группой контроля [Barro C. и соавт., 2021]. Однако, обнаружено соответствующее увеличение уровня эндотоксина в ликворе, что может указывать на его накопление в структурах, близких к нервной ткани.

Также в литературе проиллюстрировано следующее: грибковый компонент микробиома, так же, как и бактериальный, нарушен непосредственно у пациентов с РС [Mangalam A.K. и соавт., 2021]. Было показано наличие грибковой инфекции в тканях ЦНС пациентов с РС [Alonso R. и соавт., 2018]. С данными литературы также согласуются данные полученные в настоящей работе по увеличению уровня содержания маркеров микрогрибов в ликворе пациентов с РС. Некоторые ПИТРС, применяемые при лечении РС, проявляют противогрибковое и противомикробное действие. В литературе показана фунгицидная активность диметилфумарата [Ma N. и соавт., 2017; Wang H.H. и соавт., 2001].

Помимо бактериальных и грибковых компонентов, в настоящей работе обнаружено увеличение в ЦСЖ у пациентов с РС в стадии ремиссии маркеров, характерных для вирусов, в частности для вируса Эпштейна-Барр. Эти данные также совпадают с данными литературы. В литературе часто отмечается высокая связь между рассеянным склерозом (РС) и вирусом Эпштейна-Барр (ЭБВ). Одно из недавних исследований показало следующее: хроническое заражение ЭБВ может быть основной причиной развития РС; риск того, что может развиться РС, увеличивается в тридцать два раза непосредственно после инфицирования ЭБВ, но не увеличивается после заражения другими вирусами, такими как цитомегаловирус (ЦМВ), который передается тем же путем. [Vjornevik K. и соавт., 2022].

### **Значимость обнаруженных микроРНК в ЦСЖ у лиц с РИС.**

Анализ профилей экспрессии микроРНК показал наличие дифференциально экспрессирующихся микроРНК для разных типов течения РС и лиц с РИС в отличие от контрольной группы, что может указывать на непосредственную роль данных микроРНК в патогенезе РС и предрасполагающих состояний (РИС). Стоит отметить, что для выяснения непосредственной роли микроРНК в патогенезе РС и РИС необходимо определить мишени дифференциально экспрессирующихся для каждой группы микроРНК и, возможно, это позволит обнаружить общие мишени для РС и РИС, что позволит представить определенные микроРНК в качестве факторов риска трансформации РИС в РС.

Особый интерес вызывает наличие общих микроРНК для разных типов течения РС (РРС, ППРС) и РИС, экспрессия которых значимо отличается от контрольной группы (hsa-miR-1913, hsa-miR-6799-3p, hsa-miR-10396a-5p, hsa-miR-10396b-5p, hsa-miR-656-3p, hsa-miR-1283, hsa-miR-3131, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-219b-5p), что, вероятно, указывает на общий механизм развития данных состояний (РС и РИС).

Сравнение групп РРСремиссия, ППРС и РИС с контрольной группой выявило соответственно 116, 28 и 135 микроРНК, концентрация которых в ликворе значимо отличалась ( $p < 0.05$ , отношение концентраций более 2). При этом часть микроРНК демонстрировали уменьшение экспрессии, а часть увеличение. Так, при сравнении групп РРСремиссия, ППРС и РИС с контрольной группой выявлено соответственно 54, 15 и 75 микроРНК, активность коих была повышена, а сниженную экспрессию продемонстрировали 62, 13 и 60 микроРНК соответственно. Данный факт может указывать на то, что часть микроРНК оказывает негативное действие (те микроРНК, содержание которых повышено в ЦСЖ), оказывая влияние на мишени, а часть оказывают протективное действие (те микроРНК, содержание которых снижено в ЦСЖ).

Дифференциально экспрессирующиеся при РС и РИС микроРНК могут рассматриваться в качестве потенциальных маркеров заболевания и РИС при дифференциальной диагностике с другими неврологическими заболеваниями.

С учетом того, что не до конца выяснено происхождение микроРНК в ликворе, не стоит забывать, что данные микроРНК могут быть также продуктом гибели нервных клеток (что происходит при РС в результате процесса нейродегенерации) и это может указывать на гибель одних и тех же клеток при разных типах течения РС и РИС (учитывая наличие общих микроРНК для РС и РИС, экспрессия которых повышена и понижена по сравнению с контрольной группой).

После определения группы мишеней для общих микроРНК в группах РРС, ППРС и РИС, в случае обнаружения общих мишеней микроРНК для групп:

1. РС (при первом эпизоде неврологической симптоматики) и ППРС - возможно предположить, что данные микроРНК могут стать прогностическими маркерами типа течения РС, если речь идет о пациентах с первым эпизодом неврологической симптоматики и позволят предположить в какой тип течения трансформируется заболевание - в РРС или ППРС.
2. РИС, РРС и ППРС - также позволят спрогнозировать вероятность трансформации (в совокупности с наличием олигоклонального типа синтеза IgG в ликворе) РИС в РРС и ППРС.

Однозначно, для микроРНК, дифференциально экспрессирующихся в исследуемых группах, необходимо провести верификацию изменений их экспрессии на независимой выборке с использованием высокочувствительного метода ПЦР в реальном времени. В дальнейшем, в случае успешной верификации, определить функциональную роль дифференциально экспрессирующихся микроРНК, исходя из *in silico* анализа сетей взаимодействий их генов-мишеней.

## ВЫВОДЫ

1. Содержание маркеров микробиоты в ЦСЖ пациентов с РС по сопоставлению с пациентами из группы контроля достоверно увеличено, что позволяет предположить участие полимикробной инфекции в этиологии и патогенезе РС.
2. Увеличение содержания микробных маркеров в ЦСЖ, при отсутствии аналогичных изменений в крови, позволяет говорить о наличии конкретного паттерна микробиотических

- и вирусных маркеров, который является характерным непосредственно для ЦСЖ пациентов с РС, но не для плазмы крови.
3. У лиц с РИС в ЦСЖ увеличен уровень маркеров Эпштейна-Барр, бактерий *Propionibacterium acnes*, а также *Pseudomonas*, *Moraxella*, и *Acinetobacter*, что может свидетельствовать о высоком риске трансформации в РС, поскольку маркеры этих микроорганизмов также обнаружены в ЦСЖ пациентов с РС в стадии ремиссии.
  4. Повышен маркер *Pseudomonas aeruginosa* у пациентов с РС ремиссия и РИС. С учетом данных, которые уже имеются в литературе, это говорит о вероятной молекулярной мимикрии между антигенами *Pseudomonas aeruginosa* и компонентами миелиновой оболочки.
  5. Повышение уровня эндотоксина наблюдается в ЦСЖ пациентов с РС и не обнаружено в крови, что согласуется с данными литературы и говорит в пользу эндотоксиновой гипотезы нейродегенерации. Повышение уровня эндотоксина в ЦСЖ может свидетельствовать о его накоплении в структурах, более анатомически близких к нервной ткани.
  6. У пациентов с РС нарушается грибковый компонент микробиома, как и бактериальный, что имеет значение при выборе ПИТРС (в литературе показана фунгицидная активность диметилфумарата, которая может вносить вклад в его фармакологическую активность при РС).
  7. При профилировании микроРНК ЦСЖ пациентов с РРС, ППРС и лиц с РИС методом NGS малых РНК присутствуют и дифференциально экспрессируются (в отличие от контрольной группы) определенные микроРНК, что может указывать на участие данных микроРНК в патогенезе РС и предрасполагающих состояний (РИС) и возможно рассмотрение их в качестве потенциальных дополнительных маркеров РС и РИС при дифференциальной диагностике с ДНЗ.
  8. Содержание микроРНК при сравнении в группах РРС ремиссия - контроль, ППРС - контроль, РИС - контроль значительно отличались, экспрессия некоторых микроРНК понижена, других повышена, что может говорить о протективном и негативном действии этих микроРНК соответственно.
  9. Сравнение выявило общие микроРНК для групп РРС ремиссия, ППРС и РИС, экспрессия которых значительно отличается от контрольной группы (*hsa-miR-10396a-5p*, *hsa-miR-3131*, *hsa-miR-10396b-5p*, *hsa-miR-656-3p*, *hsa-miR-1283*, *hsa-miR-487b-3p*, *hsa-miR-6799-3p*, *hsa-miR-1913*, *hsa-miR-219b-5p*), что, вероятно, указывает на общий механизм развития данных состояний (РС и РИС).
  10. МикроРНК, общие для групп РРС ремиссия, ППРС и РИС, значительно отличающиеся от контрольной группы, можно рассмотреть в качестве потенциального дополнительного прогностического маркера трансформации в РС для лиц с РИС, а также прогноза типа течения при трансформации в РС при наличии микроРНК, дифференциально экспрессирующихся для РРС и ППРС. Особый интерес вызывают *hsa-miR-656-3p*, *hsa-miR-3131*, *hsa-miR-6799-3p*, *hsa-miR-1283*, *hsa-miR-10396a-5p*, *hsa-miR-10396b-5p*, *hsa-miR-487b-3p*, *hsa-miR-219b-5p*, *hsa-miR-1913*, общие для РС и РИС.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Учитывая тот факт, что данное исследование носит фундаментальный характер и является поисковым, часть рекомендаций носит характер направительный для дальнейшего исследования в данном направлении.

1. При диагностике РС и РИС, помимо анализа ликвора на олигоклональные IgG, рекомендовано также проводить анализ на наличие микробных маркеров в ликворе. В

случае с РС это может помочь при подборе ПИТРС (например, в случае преобладания грибковой нагрузки, препарат выбора – диметилфумарат). В случае с РИС это может выступать в качестве прогностического маркера трансформации в РС, в совокупности с другими маркерами (такими как олигоклональные полосы в ликворе, например).

2. Для более углубленного и точного изучения качественного состава микробиома ликвора рекомендованы дальнейшие исследования с проведением 16S секвенирования бактериальной РНК в ликворе.
3. Дифференциально экспрессирующиеся при РС и РИС микроРНК рассматривать в качестве потенциальных маркеров заболевания и РИС при дифференциальной диагностике с другими неврологическими заболеваниями.
4. Для микроРНК, дифференциально экспрессирующихся в исследованных группах, необходимо провести верификацию изменений их экспрессии на независимой выборке с использованием высокочувствительного метода ПЦР в реальном времени.
5. В дальнейшем, в случае успешной верификации с использованием высокочувствительного метода ПЦР в реальном времени, определить функциональную роль дифференциально экспрессирующихся микроРНК, исходя из *in silico* анализа сетей взаимодействий их генов-мишеней.

#### **Публикации по теме исследования:**

1. Омарова М.А., Бойко А.Н., Мельников М.В., Бойко О.В., Кабаева А.Р., Жиленкова О.Г., Затевалов А.М., Роговский В.С. Исследование содержания маркеров микробиоты в цереброспинальной жидкости пациентов с рассеянным склерозом и радиологически изолированным синдромом. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2021;13(прил. 1):27-30. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2021-1S-27-30>
2. Омарова М.А., Садеков Т.Ш., Бойко А.Н., Роговский В.С., Жиленкова О.Г., Затевалов А.М., Миронов А.Ю. Оценка структуры микробиома человека при рассеянном склерозе по концентрациям микробных маркеров в крови. *RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS*. 2022; 67(10) <https://doi.org/https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-10-600-606>
3. Омарова М.А., Козин М.С., Бойко А.Н. Свободная циркулирующая микроРНК как потенциальный диагностический маркер при рассеянном склерозе. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2022;14(Прил. 1):29–33. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2022-1S-29-33>
4. Омарова М.А., Роговский В.С., Садеков Т.Ш., Садекова Г.И., Жиленкова О.Г., Бойко А.Н. Исследование содержания маркеров микробиоты в цельной крови и цереброспинальной жидкости пациентов с различными типами течения рассеянного склероза и лиц с радиологически изолированным синдромом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2023;123(7-2):96-102. <https://doi.org/10.17116/jnevro202312307296>

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АИЗ - аутоиммунные заболевания
- АПК - антиген-презентирующие клетки
- ВПСР - вторично-прогрессирующий рассеянный склероз
- ГЭБ - гематоэнцефалический барьер
- ГХ-МС - газовая хромато-масс-спектрометрия
- ДНЗ - другие неврологические заболевания
- ЗСНОМ - заболевание спектра нейрооптикомиелита
- КИС - клинически изолированный синдром
- МНС (major histocompatibility complex) - главный комплекс гистосовместимости
- ППРС - первично-прогрессирующий рассеянный склероз
- ПИТРС – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза
- РС - рассеянный склероз
- РРС - ремиттирующий рассеянный склероз
- РИС - радиологически изолированный синдром
- ЦМВ - цитомегаловирус
- ЦНС - центральная нервная система
- ЭАЭ - экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит
- ЭБВ - вирус Эпштейна-Барр
- EDSS - Expanded Disability Status Scale
- NGS - высокопроизводительное секвенирование нового поколения