

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Омарова Мадина Алиевна

**Геномное исследование цереброспинальной жидкости пациентов с
ремиттирующим и первично-прогрессирующим вариантами течения
рассеянного склероза и лиц с радиологически изолированным
синдромом.**

Шифр специальности: 3.1.24 Неврология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Бойко Алексей Николаевич

Доктор медицинских наук, профессор

Москва

2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Этиология и механизм развития РС.....	14
1.1.1. Эпидемиологические характеристики РС.....	14
1.1.2. Патогенез РС.....	15
1.1.3. Факторы, влияющие на развитие РС.....	19
1.1.3.1. Факторы окружающей среды и образ жизни.....	19
1.1.3.2. Генетические факторы.....	20
1.2 Роль микробиоты в этиологии и патогенезе рассеянного склероза.....	21
1.3. Классификация и функции некодирующих РНК.....	26
1.4. Биогенез и механизм действия микроРНК.....	28
1.5. МикроРНК, участвующие в развитии РС.....	41
1.6 Свободная циркулирующая микроРНК в ЦСЖ как потенциальный диагностический маркер при РС.....	48
1.7. Происхождение свободной циркулирующей микроРНК в ЦСЖ.....	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	57
2.1. Объект исследования.....	57
2.2 Общеклиническое исследование пациентов.....	62
2.3. Подготовка образцов крови.....	63
2.4. Подготовка образцов ЦСЖ.....	63
2.5. Газовая хроматография с масс-селективным детектированием ионов.....	64
2.6. Выделение РНК.....	67
2.7. Выделение и последующее секвенирование микроРНК ЦСЖ.....	70
2.8. Анализ данных секвенирования микроРНК.....	70
2.9. Статистический анализ.....	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	72
3.1. Содержание маркеров микробиоты в цельной крови и ЦСЖ пациентов с различными вариантами течения РС и лиц с РИС.....	72
3.2. Анализ содержания микроРНК в ЦСЖ больных РРС в стадии ремиссии, ППРС, лиц с РИС и пациентов контрольной группы.....	80
3.2.1. Полнотранскриптомный поиск микроРНК, концентрация которых изменена у больных РРС в стадии ремиссии.....	80
3.2.2. Полнотранскриптомный поиск микроРНК, концентрация которых изменена у больных ППРС.....	86

3.2.3. Полнотранскриптомный поиск микроРНК, концентрация которых изменена у лиц с РИС	88
3.2.4. Поиск общих микроРНК в группах РРС ремиссия, ППРС и РИС, отличающих их от контрольной группы.....	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	96
4.1. Значимость обнаруженных микробных маркеров цельной крови и ЦСЖ в этиологии и патогенезе РС	96
4.2. Значимость обнаруженных микроРНК в ЦСЖ у лиц с РИС	98
ВЫВОДЫ.....	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	103
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	104
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	120

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АИЗ - аутоиммунные заболевания

АПК - антиген-презентирующие клетки

ВПРС - 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

NGS - высокопроизводительное секвенирование нового поколения

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

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. [1]. 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 [2]. 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. По данным литературы изменения состава микробиома при РС имеются на различных уровнях. В частности, при сравнении со здоровыми донорами показано уменьшение антител к $\alpha 1,3$ -галактозе (Gal) при РС. Gal является результатом продукции микробиоты. В

контексте РС наблюдается снижение уровня бактерий, производящих галактозидазу (Gal). Учитывая, что антитела к галактозидазе формируются уже в раннем возрасте, можно предположить о генетической предрасположенности к изменениям микробиоты, характерным для РС, что свидетельствует об уменьшении биоразнообразия микробиоты при РС. [2]. Некоторые препараты для лечения РС (ПИТРС) оказывают влияние на состав микробиоты, в частности, на рост *Clostridium perfringens*. По данным литературы показано, что диметилфумарат, терифлуномид и финголимод подавляют рост *Clostridium perfringens*. Данный микроорганизм обладает определенным тропизмом к гематоэнцефалическому барьеру (ГЭБ) и миелину центральной нервной системы (ЦНС), вызывая селективную гибель зрелых олигодендроцитов и демиелинизацию. Диметилфумарат имеет свойство уничтожать грибы — это может влиять на эффективность лечения РС [3, 4]. Исследователи обнаружили грибковую инфекцию в нервной системе у пациентов с РС [5].

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

ЦСЖ, 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 [6], различных опухолей ЦНС [7], у недоношенных детей после внутрижелудочкового кровоизлияния [8].

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 [9]. 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 [10]. 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 [11]. 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 [12]. В другом исследовании проводили комплексный анализ, исследуя дифференциальную экспрессию микроРНК одновременно в ЦСЖ, плазме и моноклеарных 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 [13]. 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 одновременно 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 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.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Исследование микробиотических показателей ЦСЖ и крови методом ГХ-МС у пациентов с РС в различных стадиях, ППРС, РИС и контрольной группы без предыдущего лечения.
2. Для улучшения понимания механизма действия, дополнительное изучение качественного состава микробиома в тех же образцах.
3. Проведение сравнения профилей экспрессии микроРНК в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) между пациентами с рецидивирующим рассеянным склерозом (РРС), прогрессирующим рассеянным склерозом (ППРС), лицами с радиологически изолированным синдромом (РИС) и контрольной группой с использованием метода 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. Используя метод ГХ-МС, с высокой чувствительностью, можно даже в случае очень низких концентраций количественно определить маркеры микробиоты. Это позволяет проанализировать состав цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), который прямо связан с изменениями в центральной нервной системе (ЦНС).

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 (миром) 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.

Методология исследования

Исследование было выполнено в дизайне клинического проспективного нерандомизированного исследования с проведением люмбальной пункции, лабораторного анализа цельной крови и ЦСЖ (скринингового исследования микробиотических показателей крови и ЦСЖ методом газовой хромато-масс-спектрометрии микробиотических маркеров, анализ микроРНК ЦСЖ с помощью секвенирования нового поколения (NGS)), с применением информации обследования (неврологического) и методов обработки статистического типа. Распределение на группы проводилось по варианту течения заболевания: основная группа состояла из трех подгрупп (пациенты с РРС, ППРС и лица с РИС), контрольную группу составили лица с невоспалительными заболеваниями нервной системы.

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 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.

4. 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 рассмотрением 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 и апробация 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.

Апробация результатов 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.

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».

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 РНФ №22-15-00284.

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.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиология и механизм развития РС

РС - тяжелое инвалидизирующее заболевание, при котором развиваются процессы хронического нейровоспаления и нейродегенерации в ЦНС, с последовательно развивающимся каскадом иммуноопосредованных реакций, которые приводят к разрушению миелина и, как следствие, к очаговому неврологическому дефициту.

При РС выделяют разнообразные варианты течения заболевания. Наиболее распространен (85% случаев) ремиттирующий вариант течения РС (РРС), который характеризуется чередованием периодов обострений и ремиссий [14]. Другой вариант течения – первично-прогрессирующий (ППРС), когда с дебюта заболевания неврологический дефицит неуклонно нарастает. Такой вариант течения РС наблюдается у 10-15% пациентов [15]. Следующий вариант течения вторично-прогрессирующий (ВПРС), при котором происходит непрерывное нарастание неврологического дефицита независимо от обострений [16]. Данный вариант течения является исходом РРС в среднем через 10-20 лет от манифестации заболевания. По данным анализа литературы при несвоевременном начале терапии ПИТРС почти у половины пациентов с РРС за десять лет с начала заболевания и у 30-40% пациентов за двадцать лет начинает развиваться ВПРС. Также существуют состояния так называемой «предболезни», к которым относится клинически изолированный синдром (КИС) и радиологически изолированный синдром (РИС), зачастую они предшествуют РС, но не сразу трансформируются в него.

1.1.1. Эпидемиологические характеристики РС

В первую очередь РС является социальной проблемой, так как поражает лиц дееспособного возраста (от восемнадцати до пятидесяти лет). Заболеваемость РС с каждым годом неуклонно растет. Так на сегодняшний день в мире было зарегистрировано свыше двух с половиной миллионов больных РС. Число больных из России в этой статистике примерно двести тысяч человек. Наблюдаемое в последние годы увеличение

распространенности РС связывают не только с ростом заболеваемости, но и с увеличением средней продолжительности жизни благодаря проводимой ранней эффективной терапии РС и усовершенствованием методов диагностики, в том числе периодический пересмотр критериев постановки диагноза. Статистика иллюстрирует, что у лиц женского пола РС встречается чаще вдвое, чем у лиц мужского пола. У лиц мужского пола, ППРС, согласно статистике, встречается чаще.

Распространённость РС в зависимости от этнической принадлежности:

1. Европейцы: РС чаще
2. Азиаты и коренные американцы: РС реже
3. В Азии: примерно 2 случая на 100 000 человек
4. В западных странах: примерно 1 случай на 1000 человек
5. В России: более 30 случаев на 100 тысяч населения [17].

1.1.2. Патогенез РС

Этиология и патогенез определены не до конца. В основе механизма развития РС лежит аутоиммунное воспаление, как и при других аутоиммунных заболеваниях (АИЗ). При аутоиммунном воспалении иммунная система атакует свои собственные ткани, что вызывает образование антител и выделение воспалительных веществ. Это может привести к разрушению клеток олигодендроцитов и утрате миелина в ЦНС. Считается, что при АИЗ фактором постоянного поддержания аутореакций является хроническое воспаление, при котором все время вырабатываются провоспалительные медиаторы, что по соответствующему принципу обратной связи препятствует непосредственно окончанию ответа иммунной системы организма [18].

Патогенез рассеянного склероза (РС) включает в себя три ключевые стадии:

1. Активация периферических иммунных клеток.
2. Проникновение этих клеток через гематоэнцефалический барьер.
3. Развитие аутоиммунного воспаления в ЦНС.

Вышеперечисленные процессы приводят к тому, что повреждаются олигодендроциты (клетки, образующие миелин), а также приводят к демиелинизации (потере миелина), гибели аксонов (нервных волокон) и нейродегенерации, что становится причиной неврологических нарушений.

(Рис 1).

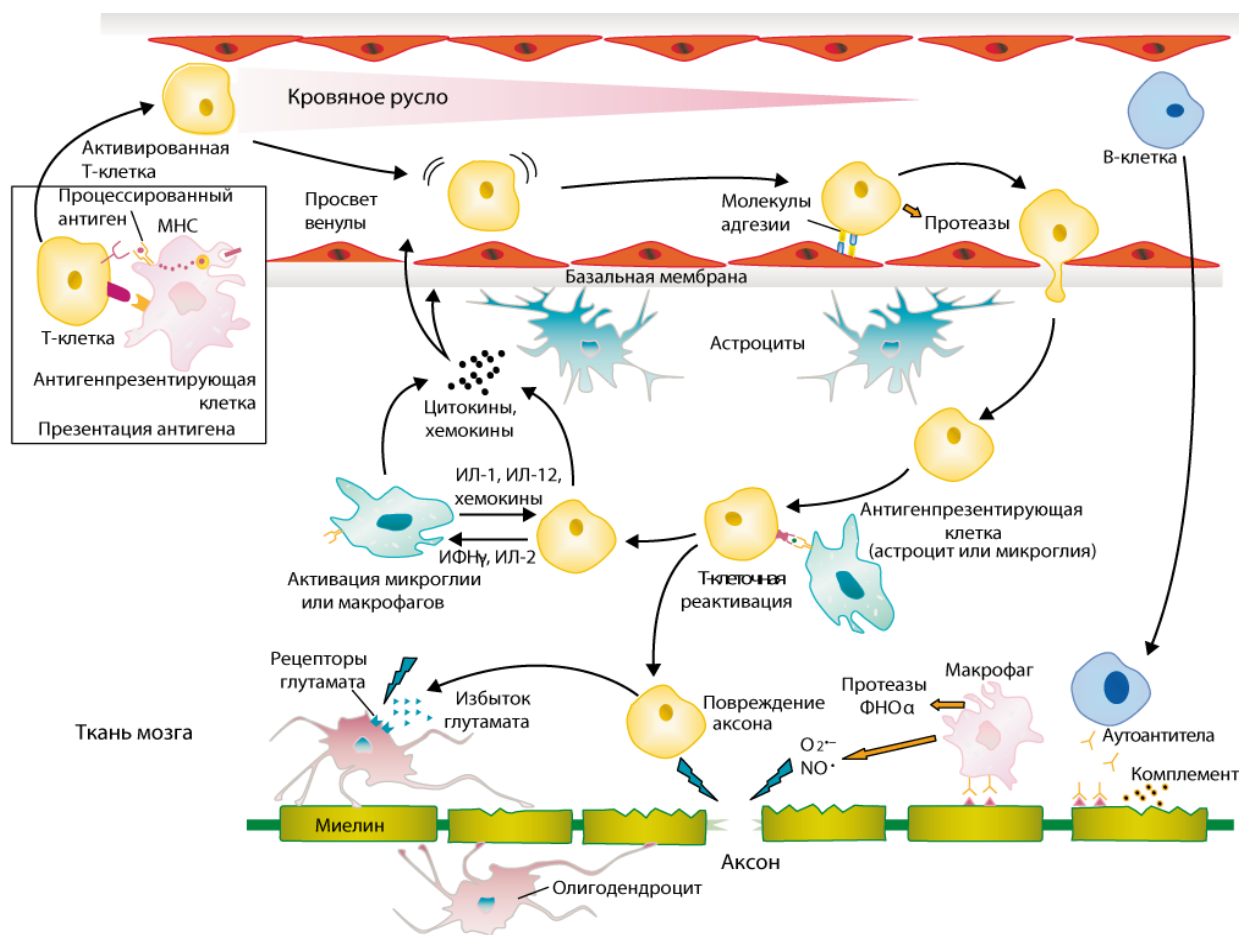


Рисунок 1 (модифицировано из [19]).

В ходе развития РС:

1. Антигенпрезентирующие клетки активируют Т-клетки за счет «подражания» некоторым антигенам (механизм мимикрии).
2. При РС антигены могут «подражать» антигенам ЦНС, что стимулирует активацию Т-лимфоцитов.
3. Клетки присоединяются непосредственно к капиллярам мозгового барьера и перемещаются в головной мозг и активируются астроцитами или микроглией.

5. Вышеописанное вызывает воспалительный процесс, сопровождаемый непосредственно выделением разнообразных веществ.

6. Воспаление поддерживается через обратную связь, активируя другие клетки.

В конечном итоге, происходит разрушение миелина и гибель нервных волокон.

При развитии рассеянного склероза (РС) начинается каскад аутоиммунных реакций в организме, при которых активизируются определенные виды белых кровяных клеток, называемых Т- и В-лимфоцитами (особенно важную роль играют CD4⁺ Т-лимфоциты), находящихся в периферических лимфоидных органах. Это происходит из-за антигенов собственных тканей человека, которые представляются иммунным клеткам чужеродными или из-за антигенов чужеродных микроорганизмов, которые, благодаря своей структуре, могут напоминать нашим клеткам собственные [20].

Активация CD4⁺ Т-лимфоцитов приводит к изменениям в Th1 и Th17, и снижению функции Т-регуляторов. Активированные Т- и В-лимфоциты:

- преодолевают гематоэнцефалический барьер, взаимодействуя непосредственно с белками на клетках и стенках сосудов мозга;
- повреждают миелин, вызывая воспаление, инициирующее непосредственно разрушение миелина и формирование демиелинизирующих очагов, характерных для РС [22]. Из образовавшихся очагов демиелинизации высвобождаются аутоантигены миелина, которые ранее были изолированы, это способствует поддержанию аутоиммунного воспаления в результате постоянной активации Т-лимфоцитов [23]. При развитии стадии вторичного прогрессирования РС, нет необходимости в инфильтрации аутореактивных Т-лимфоцитов, поддержание аутоиммунного процесса происходит даже без этого.

По истечении 10-15 лет заболевания, когда имеется значительная демиелинизация, начинается фаза прогрессирования и накопления неврологического дефицита. При этом происходит уже не только разрушение

миелина, но и повреждение аксонов и гибель клеток. Воспаление при РС локализуется не только в паренхиме головного и спинного мозга, но и оболочках мозга, когда инфильтрация клеток-лимфоцитов происходит в фолликулах, расположенных вблизи оболочек мозга, далее высвобождаются воспалительные медиаторы. Данный процесс приводит к формированию очагов демиелинизации в сером веществе коры головного мозга и способствует повреждению аксонов при прогрессирующем РС (ППРС, ВПРС) [24], так начинается процесс нейродегенерации (нейроаксональное повреждение).

Th1-субпопуляция Т-лимфоцитов играет ключевую роль в аутоиммунном воспалительном процессе, проявленном в моделях РС на животных:

1. Th1-лимфоциты вырабатывают $IFN\gamma$, IL-2 и $TNF\alpha$.
 2. Treg-клетки вырабатывают IL-17 [25]. Взаимодействие между Th1 и Th2 клетками фундаментально в регуляции иммунной системы, включая аутоиммунные процессы.
- Субпопуляция Th2 клеток, вырабатывающая IL-4, 5 и 10, выступает непосредственно в качестве антагонистов Th1 клеток.
 - Модель ЭАЭ демонстрирует баланс между Th1 и Th2 клетками.
 - Эффективность терапии при РС подчеркивает важную роль Th1 клеток и сдвиг в балансе цитокинов в сторону Th2.
 - В механизме развития рассеянного склероза можно выделить следующие этапы:
 1. Активация CD8⁺ Т-клеток: CD8⁺ Т-клетки активируются и направляются к центральной нервной системе.
 2. Нанесение повреждений нейронам и олигодендроцитам: CD8⁺ Т-клетки наносят прямой вред нейронам и олигодендроцитам, что вызывает разнообразные изменения в аксонах.

3. Участие В-клеток: данные клетки также участвуют, вероятно, посредством секреции аутоантител и представление антигенов Т-клеткам.
4. Присутствие В-клеток в очагах поражения: обнаружение В-клеток в очагах поражения в центральной нервной системе, включая оболочки мозга, подтверждает их роль в патогенезе болезни.
5. Эффективность анти-В-клеточной терапии: успех анти-В-клеточной терапии дополнительно подтверждает важность роли В-клеток в процессе развития рассеянного склероза [27].

1.1.3. Факторы, влияющие на развитие РС

Для развития РС нет одного основного фактора. Заболевание мультифакторное (среда, генетические факторы и эпигенетические факторы участвуют непосредственным образом).

1.1.3.1. Факторы окружающей среды и образ жизни

Несмотря на то, что причина РС остается неясной, выявлены ряд факторов, значительно увеличивающих риск заболевания. Среди них – окружающая среда и образ жизни. Самые распространенные среди факторов среды: 1. Хронические вирусные инфекции (Эпштейна-Барр вирус, вирус простого герпеса, цитомегаловирус). 2. Курение (воздействие никотина). 3. Дефицит витамина D. 4. Низкая инсоляция. 5. Дисбаланс кишечной микробиоты (чаще всего в результате использования антибиотиков). 6. Гормональный дисбаланс. 7. Загрязнение окружающей среды (химическая промышленность, нефтеперерабатывающая промышленность, пестициды, бисфенол А (БА), полихлорированные бифенилы (ПХБ), фталаты, персистентные органические загрязнители (ПОЗ), аллергены (белковые), генетически модифицированные продукты, хлорированные органические соединения.). 8. Экспозом (совокупность всех воздействий окружающей среды на организм). [28]. При наличии других факторов, таких как работа в ночное время, чрезмерное употребление кофеина и алкоголя, риск развития РС повышается [29]. Взаимодействуя с генетическими и эпигенетическими

факторами, факторы окружающей среды и образа жизни не действуют изолированно, а совместно могут повысить риск развития РС. Помимо повышения риска развития РС, данные факторы могут также влиять на тяжесть течения заболевания после его манифестации [30].

1.1.3.2. Генетические факторы

Исследования показали, что у лиц, относящихся к различным этносам и также лиц, которые проживают на одной местности, различная частота обнаружения РС. Также были описаны семейные случаи РС. Установлено, что риск формирования РС у родственников выше в тридцать раз, чем в остальной популяции. Частота семейных случаев составляет в среднем 3-12%. Все это позволило говорить о генетической предрасположенности к заболеванию [31].

РС относится к полигенным заболеваниям, так как в его развитии участвует множество полиморфных вариантов и, соответственно, для него характерен не менделевский тип наследования. В результате полногеномных исследований обнаружены 200 локусов, связанных с (РС) [31], преимущественно в генах, кодирующих молекулы, влияющие непосредственно на функционирование иммунной системы, включая гены HLA классов I и II. Они обладали высшей значимостью по отношению к риску (более 3) среди прочих локусов, связанных с предрасположенностью к РС, а также ассоциировались не только с РС, но также и с другими аутоиммунными заболеваниями.

При рассмотрении патогенеза РС ранее отмечалось, что ключевую роль играют Т-клетки. Поэтому очень важно выявление связей непосредственно между полиморфизмами в соответствующих генах IL2 и IL7R, которые участвуют в активации и также в размножении Т-лимфоцитов.

За последние десятилетия панель известных генов, ассоциированных с РС, значительно расширилась. Все благодаря достижениям молекулярной биологии, в частности, благодаря полногеномным ассоциативным исследованиям. Однако, даже последние достижения не позволяют выяснить причину наследуемости при РС. Известные гены и их эффекты объясняют

лишь 20-30% наследственного РС. Феномен «проблемы потерянной наследуемости» имеет несколько причин, включая непосредственно гетерогенность групп, взаимодействие генов и факторов окружающей среды, а также эпигенетические факторы и недооценку роли некодирующей части генома. Основную роль в наследовании РС играет наличие основного аллеля риска РС HLA-DRB1*15:01. [32].

1.2 Роль микробиоты в этиологии и патогенезе рассеянного склероза

На сегодняшний день известно множество факторов, играющих важную роль в развитии РС, но непосредственная причина РС не установлена. Патогенез РС также остается не до конца изученным. В настоящее время концепция этиологии РС заключается в том, что заболевание считается мультифакторным, в основе которого, как ранее уже было описано, лежат факторы как окружающей среды (курение, низкая инсоляция, дефицит витамина Д, инфекция, загрязнение окружающей среды), так и генетические факторы [33]. За последние годы накопилось немало данных о роли нарушений кишечной микробиоты в патогенезе РС [34, 2]. Есть данные, указывающие на роль кишечной микробиоты в регуляции работы центральной нервной системы, иммунной системы, а также в развитии аутоиммунных заболеваний на модели мышей [35]. Все это указывает на то, что микробиота, как самостоятельный орган, способна регулировать работу всего организма. На протяжении всего кишечного тракта состав кишечной микробиоты меняется. И хотя уже достаточно много работ посвящено изучению кишечной микробиоты, надо учесть тот факт, что исследовалась в основном фекальная микробиота путем анализа 16S рибосомальной РНК (рРНК), что не отражает всего разнообразия представленности микробиоты на протяжении всего кишечного тракта, а также микробиома всего организма [36]. В этой связи одним из вариантов изучения микробиома человека выступает анализ микробных метаболитов, так называемых микробиотических маркеров, которые представляют собой липиды жирных кислот, которые, являясь липофильными частицами, могут легко проникать даже через ГЭБ в ЦНС.

Микробные маркеры содержатся во всех тканях и биологических жидкостях организма в различных концентрациях (в зависимости от локализации в организме). При самом минимальном содержании их можно выявить при помощи ГХ-МС (см.табл. 1) [37,38].

Таблица 1— Газовая хроматография-масс-спектрометрия

Метод	Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС)
Описание	Метод анализа, который сочетает в себе две техники: газовую хроматографию (ГХ) и масс-спектрометрию (МС).
Принцип	Образцы разделяются на компоненты с помощью газовой хроматографии, которые затем идентифицируются и анализируются посредством масс-спектрометрии.
Применение	Анализ сложных смесей (в т.ч. биологические образцы), для идентификации/количественного анализа соединений.
Преимущества	Высокая чувствительность, специфичность и точность анализа, возможность определения структуры соединений.
Примеры применения	Определение микробиотических маркеров, анализ органических соединений в биологических образцах, контроль качества пищевых продуктов и многое другое.

Всего известно около трехсот микробиотических маркеров, из которых в организме человека присутствует примерно пятьдесят.

Изменение состава микробиоты кишечника рассматривается в качестве фактора повышения риска развития РС, так как кишечная микробиота может регулировать иммунный ответ и работу мозга [39]. Выдвинута гипотеза, что при изменении вирусной и бактериальной микробиоты происходит инициация аутоиммунных реакций при РС посредством оси «кишечник-иммунитет-мозг» [40,2]. Данная связь представляет собой двунаправленный путь взаимосвязи между микробиотой кишечника и ЦНС, в функционировании которого играют важную роль микроорганизмы, населяющие желудочно-кишечный тракт, так

как их продукты жизнедеятельности оказывают системное влияние на работу иммунной и эндокринной систем [41, 42, 43]. Взаимодействуя в двух направлениях, нервная система человека регулирует перистальтику кишечника и местный иммунитет, передавая нейромедиаторы посредством системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники и блуждающего нерва. В свою очередь, ЖКТ оказывает влияние непосредственно на нейropsychологические функции, контролируя такие важные аспекты как аппетит и настроение [44].

Существует классификация микробиоты кишечника, в основе которой лежит разделение на семейства, род и виды микробов. Это возможно благодаря основному идентификатору - гену 16s рРНК. Дело в том, что данный ген имеет постоянные и переменные участки, которые создают уникальный праймер, что позволяет различать микроорганизмы на видовом уровне. Те участки, которые являются постоянными в гене 16s рРНК, дают возможность проводить амплификацию и маркировку методом ПЦР [45].

В исследованиях последних десятилетий описаны вторичные изменения в симбиотической микробиоте, как проявление воспаления различной локализации. При этом для РС описано, что это может быть, как обеднение, так и увеличение разнообразия состава микробиоты определенными бактериями при сравнении со здоровыми лицами. Выдвинуто предположение, что определенные штаммы связаны с нейровоспалением и коррелируют с фазами РРС (обострение или ремиссия), а другие ассоциированы с прогрессированием заболевания. Открытым остается вопрос, является изменение состава микробиоты кишечника следствием РС, либо все же его причиной [39].

Проводилось исследование влияния микроорганизмов на работу мозга и одним из направлений стало изучение и описание бактериальных токсинов, которые способны проникать в системный кровоток и далее через ГЭБ в вещество мозга. Эпсилон-токсин (ЕТХ) *Clostridium perfringens*, принадлежащий к семейству Clostridiales, увеличивается непосредственно у людей с рассеянным склерозом (РС) или же с другими заболеваниями спектра

оптико-невромиелита (ЗСОНМ). Однако присутствие его обнаружено лишь только у малой доли пациентов с РС. Сведения для точного определения его значимости в данных заболеваниях недостаточно. [43].

В исследовании (международном) микробиома при РС приняли участие всего 1152 чел., среди них пятьсот семьдесят шесть с РС и столько же здоровых лиц, которые составили группу контроля. Часть пациентов с РС уже получали терапию ПИТРС, в то время как 36% пациентов ранее не получали ПИТРС. Полученные результаты продемонстрировали, что у пациентов с РС, которые ранее не получали терапию ПИТРС, наблюдалось снижение представленности видов *Faecalibacterium prausnitzii* и *Blautia*, а также повышение содержания *Ruthenibacterium lactatiformans*, *Akkermansia muciniphila*, *Eisenbergiella tayi* и *Hungatella hathewayi*. Также было отмечено увеличение пути метаболизма фитатов у нелеченых пациентов с РС, в то время как пути деградации углеводов, которые секретируют пируват, были, наоборот, значительно снижены. Микроорганизмы формировали сети у нелеченых пациентов с РС и здоровых лиц контрольной группы. Полученные результаты подтвердили связь измененного состава кишечной микробиоты с риском развития РС, а также ответом на терапию ПИТРС [39].

При обострении рассеянного склероза наблюдается снижение актинобактерий родов *Collinsella* и *Adlercreutzia* в кишечной микробиоте, в то время как в период ремиссии этот эффект отсутствует. Независимо от стадии заболевания выявлено следующее:

- Бактероиды родов *Flavobacterium* и *Pedobacter* увеличиваются.
- *Parabacteroides* снижаются.
- Фирмикутные бактерии родов *Dorea* и *Blautia* увеличиваются.
- Другие фирмикутные бактерии (*Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae*, *Veillonellaceae*) снижаются.
- Протеобактерии *Haemophilus* уменьшаются.
- *Mycoplasma* и *Pseudomonas* увеличиваются [34].

В Испании было проведено исследование микробиотического состава кишечника у пациентов с РС без лечения (15 человек), с лечением (15 человек, получавших интерферон- β 1b) и у лиц контрольной группы, которую составили здоровые индивиды (14 человек). Были обнаружены значимые различия в таксонах таких видов, как Actinobacteria, Euryarchaeota, Lentisphaerae, Firmicutes и Proteobacteria между пациентами с РС и контрольной группой. Помимо этого, интересным фактом стало различие по содержанию такого вида, как Prevotella copri, между лечеными и нелечеными пациентами с РС. Интересен этот факт тем, что ранее данный вид считался протективным фактором в отношении развития РС. В целом, микробиота кишечника пациентов с РС, получавших лечение, была сходна с таковых лиц из контрольной группы [41]. Данные результаты дополнительно подтверждают эффективность интерферона β -1b и его влияние на состав кишечной микробиоты [42].

В экспериментальной работе на модели крыс исследовалось содержание нейротоксичных метаболитов, которые могли бы потенциально спровоцировать повреждение аксонов нервных клеток. В ходе данной работы культивировали нейроны крыс, далее их подвергали воздействию ликвора пациентов с РС, который был собран до и после начала лечения диметилфумаратом. Был также проведен анализ метаболитов в плазме крови и ликворе пациентов с РС. Анализ обнаружил наличие метаболитов фенола и индольной группы, имеющих бактериальное происхождение (индоксилсульфата, N-фенилацетилглутамина и п-крезолсульфата) в образцах, собранных от пациентов с РС до начала лечения, в то время как после начала лечения в образцах данные метаболиты либо не обнаруживались, либо обнаруживались в малых концентрациях. Данные метаболиты считаются потенциально нейротоксичными. По результатам длительного воздействия на культивированные нейроны крыс ликвором нелеченых пациентов с РС было обнаружено, что это снижает при этом показатель скорости их возбуждения и приводит к тому, что повреждаются аксоны. Данное повреждение не зависит

от дисфункции (митохондриального характера) и стресса (окислительного), таким образом обнаруживая (в плане нейротоксичности) совершенно новый путь. МРТ (магнитно-резонансная томография) выявила обратную зависимость между различными уровнями определенных метаболитов, происходящих непосредственно от бактерий (индоксилсульфат, N-фенилацетилглутамин и п-крезолсульфат), и объемом коры головного мозга. Эти метаболиты также напрямую связаны с уровнями легких цепей нейрофиламентов, что является показателем процессов нейродегенерации. Полученные результаты позволили авторам предположить, что данные метаболиты, которые являются производными фенола и индола, имеют микробное происхождение и способны индуцировать повреждение аксонов посредством связи между кишечником и ЦНС [43].

1.3. Классификация и функции некодирующих РНК

Высокопроизводительное секвенирование генома человека показало, что менее 2% геномной ДНК отвечает непосредственно за синтез белков, в то время как основная функция остальной части генома - за регулирование активности генов.

На транскрипцию и посттранскрипционный уровень генов (путем блокирования взаимодействия с транскрипционными комплексами) влияют некодирующие регуляторные РНК (нкРНК), включая длинные формы.

Помимо прочего, длинные нкРНК обладают способностью выпетливать хромосомную ДНК, тем самым способствуя сближению участков хромосом, отдаленных друг от друга (обобщено в [49]). Молекулы, описанные в литературе, осуществляют важную функцию в процессах: апоптоз (программированная клеточная смерть), пролиферация (размножение клеток), метаболизм (химические превращения) и дифференцировка клеток (превращение клеток в специализированные типы). Изменения в механизме действия данных нкРНК связаны с патологическими состояниями (неврологическими, а также аутоиммунными, раком).[46,47,48,49,50,51,52].

Ниже в таблице 2 представлены типы РНК и их описание.

Таблица 2 — Тип РНК и описание

Тип нкРНК	Описание
Короткие структурные нкРНК	
Участники трансляции мРНК	НкРНК, игр-е ключевую роль в процессе перевода информ-и из мРНК в белок, контролируя скорость и точность трансляции.
Малые ядерные РНК (мяРНК)	НкРНК, обеспеч-е, структур-ю и функцион-ю устойчивость ядерного рибосомн-го комп-са и участ-е в его сборке.
мРНК, участвующие в сплайсинге и процессинге	НкРНК, регулир-е процесс сплайсинга - удал-е неинформат-х участков из прекурсор-й РНК и склейку оставш-ся фраг-та для образов зрелой мРНК.
Малые ядрышковые РНК (мякРНК)	НкРНК, игр-ие ключ. роль в регул-ии активности генов и обеспеч-е стабильность ядерных структур.
Короткие регуляторные нкРНК	
Малые интерферирующие РНК (миРНК)	НкРНК, регулир-ие активность генов путем образования комплекса с мишенями мРНК, что препят-ет их трансляции или же способ-ет их разрушению.
ПиРНК	НкРНК, защищ-е клетку от внешн. генет. элементов и регулир-е активность генов.
МикроРНК	НкРНК, участвующие в разнообразных биологических процессах (напр. развитие, дифференцировка), путем влияния на мРНК (стабильность) или же ингибирования их трансляции.

У низших животных, растений были выявлены непосредственно малые интерферирующие РНК. Эти РНК, имеющие форму двухцепочечных молекул с двумя нуклеотидами без пар на концах 3', обладают протяжённостью от

двадцати до двадцати пяти нуклеотидов. МиРНК формируются, разрезая длинные РНК. После создания, они активируют комплекс гена. Разрушается одна цепь миРНК, а другая при этом направляет совокупность к мРНК-мишени. Это приводит к связыванию с RISC и расщеплению мРНК непосредственно благодаря белку Ago2 [53]. Каждая миРНК связывается только с определенной мРНК-мишенью, что называется РНК-интерференцией. Этот процесс очень важен для обеспечения эффективной защиты организма непосредственно от вирусов.

Обнаруженные у человека и многих других животных ПиРНК, сокращение от "PIWI-взаимодействующие РНК", представляют собой короткие регуляторные нкРНК. Отметим, что данные молекулы имеют длину от двадцати одного до тридцати пяти нуклеотидов. Характеризуется пиРНК непосредственно многообразием последовательностей [54]. Главная функция пиРНК заключается непосредственно в подавлении активности транспозонов посредством 2-х главных процессов: подавление транскрипции транспозонов, а также подавление экспрессии генов непосредственно после транскрипции. Последнее достигается непосредственно направлением белков PIWI к разрыву целевой мРНК.

МикроРНК, молекулы длиной от двадцати до двадцати четырех нуклеотида, привлекают наибольший интерес среди коротких нкРНК. Их описание будет представлено детально в следующем разделе.

1.4. Биогенез и механизм действия микроРНК

В начале 90-х гг. у *Caenorhabditis elegans* [55] микроРНК были обнаружены. Они стали предметом активного изучения. Появившись с тех пор, в дальнейшем они были обнаружены у человека, а также у животных, водорослей и вирусов [56]. Количество и многообразие микроРНК зависят непосредственно от сложности самого организма. Малые некодирующие молекулы РНК, протяжённостью от восемнадцати до двадцати пяти нуклеотидов, активно регулируют экспрессию генов на двух уровнях (транскрипции и посттранскрипционном), взаимодействуют непосредственно

с комплексом RISC. Контроль при этом осуществляется в отношении процесса экспрессии генов посредством специфического связывания с целевой мРНК для управления её функционированием. Существует несколько баз данных, где собрана вся информация об известных микроРНК, к ним относятся miRBase, MicroRNAdb, MicroRNAdb, microRNA.org, PhenomiR. В соответствии с последними данными регистров 2654 известных микроРНК обнаружены в организме человека [57].

Существует специальная номенклатура для обозначения микроРНК и их предшественников. МикроРНК объединены в семейства в зависимости от их последовательностей и генов-мишеней [58], внутри этих семейств отдельным микроРНК присваивается суффикс (дополнительный) непосредственно из 1-й буквы. МикроРНК гены имеют разные номера в своих названиях, которые указывают на их разные местоположения. Эти номера добавляются для обозначения генов.

Гены микроРНК делятся на категории относительно локализации в геноме (см.табл.3)[59].

Таблица 3 — Категории генов микроРНК

Категория генов микроРНК	Описание	Примеры
Интронные	Расположены внутри интронов других генов. Интроны, не кодирующие белки, служат местом для этих генов микроРНК. Сплайсинг удаляет интроны (остаются экзоны, содержащие информацию для белкового синтеза).	mir-21, mir-124a

Экзонные	Находятся внутри экзонов других генов, которые сами по себе кодируют белки. Экзоны формируют структуру окончательного мРНК.	mir-17, mir-155
Межгенные	Расположены между генами в геноме, независимо от их кодирующей способности или нахождения в интергенических областях.	mir-10

Как иллюстрирует рисунок 2, в контексте генов микроРНК следует отметить:

1. Расположение внутри интронов: Главная часть генов микроРНК находится внутри интронов различных генов, включая как кодирующие, так и некодирующие гены.
2. Процесс транскрипции: Транскрипция интронных генов микроРНК может происходить параллельно с транскрипцией "хозяйских" генов или независимо от них, с использованием специального промотора.
3. Распределение в геноме:
 - a. Большое количество этих генов также обнаруживается в межгенных областях генома.
 - b. гены микроРНК располагаются в областях, где интроны и экзоны пересекаются в некодирующих генах, редко.

Процесс формирования микроРНК можно разбить на следующие этапы:

1. Транскрипция генов микроРНК: происходит в ядре клетки за счет действия РНК-полимеразы II.
2. Образование первичных микроРНК (pri-miRNA):
 - a. Pri-miRNA длиной обычно от 200 до десятков тысяч нуклеотидов.
 - b. 1 pri-miRNA может включать в себя до 6-и микроРНК (предшественников). Минимум микроРНК — один.

3. Преобразования микроРНК(первичных):
 - а. Осуществляется кэпирование.
 - б. Происходит полиаденилирование.
 - с. Происходит сплайсинг.
4. Обработка pri-miRNA:
 - а. При помощи комплекса белков Drosha-DGCR8 в ядре клетки происходит обработка pri-miRNA.
 - б. Приводит к образованию пре-микроРНК вышеуказанный этап.
5. Формирование пре-микроРНК: Пре-микроРНК, являющийся предшественником микроРНК, имеет длину примерно шестьдесят-семьдесят нуклеотидов[60].

Механизм обработки микроРНК в клетке

1. Инициация процесса. Кофактор Drosha: Содействует каталитическому действию РНКазы III в микропроцессорном комплексе.
2. Перенос в цитоплазму. Экспортина-5 и белок Ran: Обеспечивают перемещение обработанного pre-miRNA из ядра в цитоплазму.
3. Процессинг в цитоплазме. Dicer: Индуцирует дальнейший процессинг, превращая pre-miRNA в двухцепочечный микроРНК-дуплекс.
4. Связывание с белками Ago. Ago (Ago1-4 у человека): Связывается с микроРНК-дуплексом, иницируя разделение его цепей.
5. Формирование miRISC. Пассажирская и направляющая цепи: После разделения, пассажирская цепь отделяется, а направляющая цепь остается связанной с Ago, образуя непосредственно сам комплекс miRISC [61].
6. Выбор направляющей цепи. Факторы определения: Зависит непосредственно от стабильности и типа, с предпочтением к цепи с наиболее низкой 5'-стабильностью или же урацилом в соответствующем положении нуклеотида 1 [62, 63, 64].

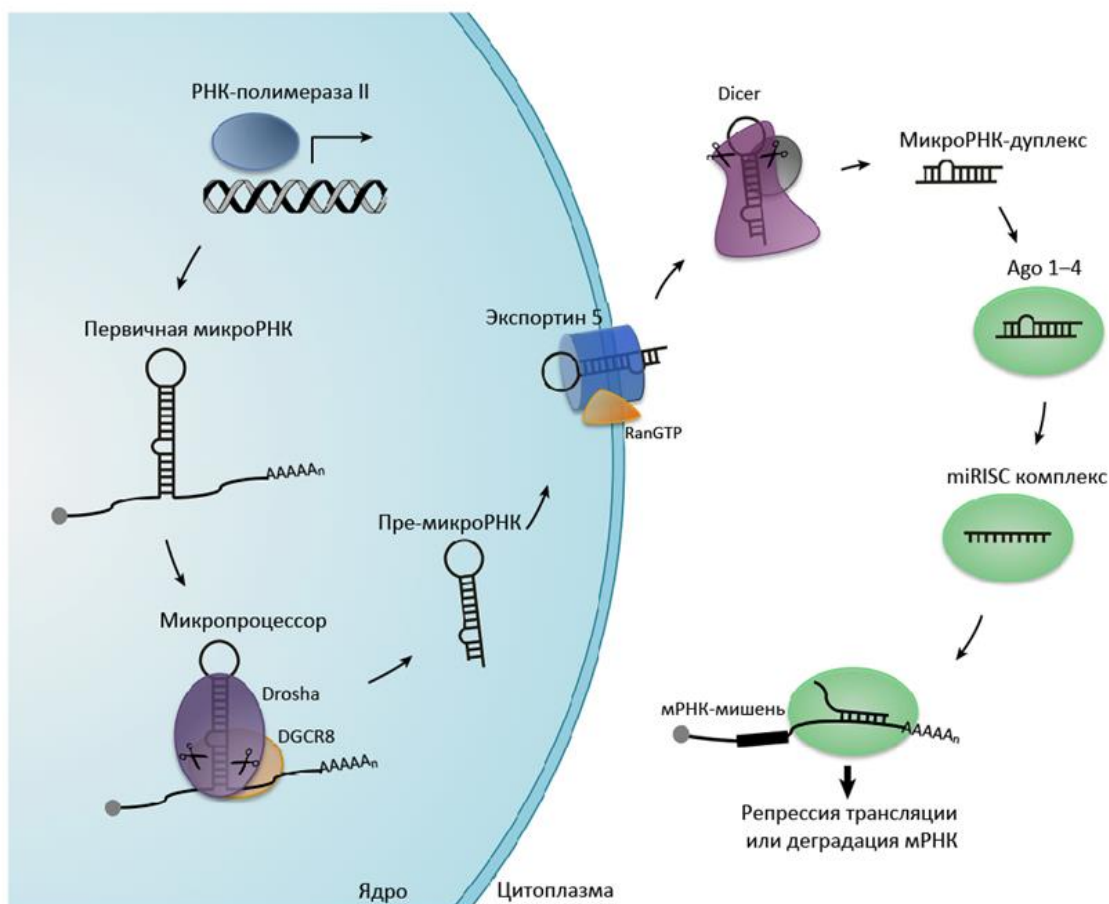


Рисунок 2 (модифицировано из [62]). Механизм формирования микроРНК.

Синтез первичной микроРНК: Образуется в ядре с помощью РНК-полимеразы

II.

Гены микроРНК:

1. Транспортировка в цитоплазму: После обработки в ядре, микроРНК покидает его и попадает в цитоплазму.
2. Обработка пре-микроРНК: Происходит формирование микроРНК-дуплекса под воздействием фермента Dicer.
3. Связывание с белками Ago: МикроРНК-дуплекс соединяется с белками Ago, что вызывает его распад.
4. Направление к мРНК-мишени: Сформировавшийся комплекс miRISC направляется к целевой мРНК.
5. Результат связывания: Соединение микроРНК с мишенью может либо блокировать трансляцию, либо приводить к деградации мРНК.

6. Участок связывания: Процесс связывания микроРНК с мишенью происходит через специфическую затравочную область, находящуюся на двух-семи нуклеотидах цепи микроРНК [63].

Как показали исследования, МиРИСЦ-комплекс обладает разнообразными воздействиями непосредственно на геном, он обладает свойствами, благодаря которым осуществляется взаимодействие непосредственно с мРНК-мишенями. Эти воздействия включают в себя 4 области (ключевые) мРНК:

1. 3'-Нетранслируемая область: Взаимодействие с этой областью приводит к сдерживанию процесса трансляции.
2. 5'-Нетранслируемая область и кодирующая последовательность: Связывание miRISC конкретно с этими мРНК областями приводит непосредственно к ингибированию экспрессии генов [65].
3. Промоторная область: Взаимодействие комплекса с данной областью мРНК обеспечивает активацию транскрипции [66].

Максимальная степень контроля экспрессии генов зависит от точности соответствия микроРНК участкам на мРНК, к которым они пристраиваются. Активация белка Ago2 происходит при соединении miRISC с мРНК, что инициирует разрыв мРНК. Именуется комплементарным данный вид связывания [67]. Исследования выявили следующее:

Механизм разрушения цепи мРНК, характерный непосредственно для людей и вирусов, но неприсущий представителям животного мира, связан конкретно с отсутствием комплементарного связывания комплекса miRISC с мРНК-мишенью в клетках животных.

Это приводит к:

1. Неактивации белка Ago2.
2. Отсутствию разрыва мРНК.

Вместо этого наблюдается следующее:

- Ингибирование трансляции мРНК-мишени.
- Деградация мРНК-мишени. [68].

Рис.3 схематически иллюстрирует механизм подавления трансляции мРНК-мишени непосредственно у представителей животного мира (обобщено в [69]). Осуществляемое через miRISC подавление трансляции обусловлено способностью белка Ago2 одновременно связываться с 5'-m7G кэпом и областью 3'-нетранслируемой мишени мРНК, что приводит непосредственно к нарушению распознавания кэпа фактором инициации eIF4E (трансляции). В итоге ингибируется возникновение комплекса (рибосомного), — это становится причиной подавления мРНК трансляции.(Рис. 3А). Подавляя трансляцию на стадии элонгации, комплекс miRISC вызывает отрыв рибосом от мРНК. Этот процесс приводит к преждевременной остановке синтеза белка и деградации образовавшихся полипептидов. (Рис. 3Б). Исследования выявили в процессе ингибирования трансляции мРНК следующее:

Механизм miRISC:

- а. Осуществляется через механизм miRISC.
- б. Проходит несколько этапов последовательно.

Этапы:

- а. Деаденилирование:
 - Сначала экзонуклеаза, направленная от 3' к 5', удаляет поли(А)-хвост целевой мРНК.
- б. Декэпирование:
 - За декэпирование ответственные ферменты DCP1/2 удаляют кэп с 5'-конца мРНК.
- с. Гидролиз:
 - Экзонуклеаза, после этого действующая от 5' к 3', гидролизует часть мРНК, полностью разрушая ее. Проанализируем данные этапы подробнее в табл. 4

Таблица 4 — Процесс ингибирования трансляции мРНК:

Этап	Действие	Пояснение
------	----------	-----------

1. Привлечение	- Привлечение белка GW182 комплексом miRISC.	GW182 — важную роль играет для привлечения других комплексов, важных для последующих этапов.
	- Взаимодействие GW182 с комплексами PAN2-PAN3 и CCR4-NOT.	
2. Деаденилирование	- Удаление хвостовых поли(А) мРНК.	Взаимодействие триптофановых повторов GW182 и белка PABPC приводит к этому.
3. Декэпирование	- Удаление капы с 5'-конца мРНК белком DCP2.	Этот шаг необходим для дальнейшего разрушения мРНК.
4. Гидролиз	- Разрушение мРНК экзонуклеазой XRN1 в направлении 5'→3'.	Начиная с 5'-конца и (продвигаясь) к 3'-концу мРНК разрушается
5. Разрушение	- Разрушение мРНК под воздействием полисомальной рибонуклеазы PMR1.	Активность PMR1 в обл-ти эндонуклеазы обеспечивает разрушение мРНК (оно полное). Отметим, что завершает такой процесс как непосредственно ингибирование трансляции.

Таблица иллюстрирует описание каждого этапа процесса ингибирования трансляции мРНК.

Комбинация этапов образует сложную последовательность событий и завершается процесс полным разрушением мРНК — ключевой аспект в регуляции биологических процессов (см.Рис. 3В).

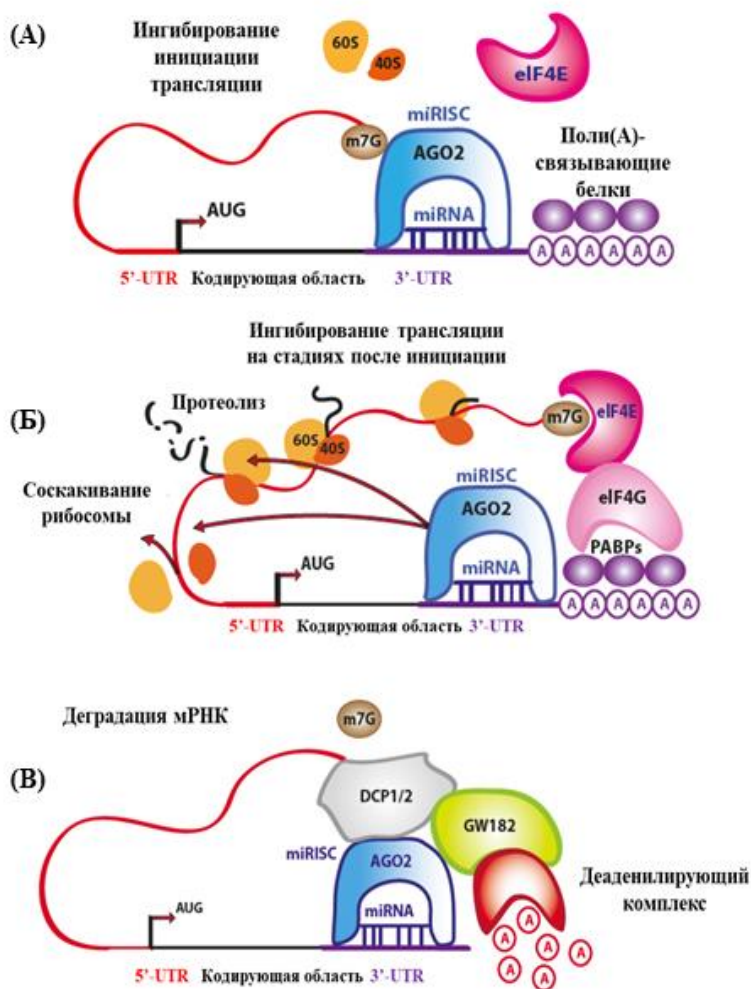


Рисунок 3. Подавление трансляции (у животных), являющееся опосредованным miRISC (модифицировано из [69]).

Ниже представлена таблица 5, иллюстрирующая процесс подавления трансляции посредством miRISC

Таблица 5 — Процесс подавления трансляции посредством miRISC

Шаг	Действие	Результат
1	Белок Ago2 связывается непосредственно с кэпом 5'-m7G и 3'-нетранслируемой областью мишени мРНК.	Нарушение распознавания кэпа фактором инициации трансл-ии eIF4E, препятствуя созданию комплекса (рибосомного) и вызывая прекращение трансляции мРНК.
2	Рибосома отсоединяется от мРНК.	Преждевременное завершение трансляции и разрушение синтезированных белков.

3	Белок Ago2 привлекает белок GW182, а белок DCP2 инициирует декэпирование.	Экзонуклеазы начинают процесс деаденилирования — это приводит непосредственно к разрушению мРНК.
---	---	--

В р-тельцах большие количества медиаторов miRISC-опосредованного разрушения мРНК включают в себя разнообразные комплексы, в частности, CCR4-NOT, — они активно участвуют в таком процессе как деаденилирование. Также присутствуют ферменты, отвечающие за декэпирование, в том числе XRN1. Кроме того, в этом сложном механизме регуляции экспрессии генов важную роль играют GW182 и другие компоненты [70]. В цитоплазматических тельцах процессинга мРНК разрушается и происходит временное хранение мРНК (нераспавшихся).

По предшествующему описанию, преимущественно микроРНК угнетают активность мРНК-мишеней. Тем не менее, при изменении внутриклеточных условий возможно активирование микроРНК — это в результате приводит к стимуляции экспрессии генов-мишеней.[71].

Серия последних исследований продемонстрировала: отмечается внеклеточная микроРНК в дополнение к внутриклеточной форме, формирующейся посредством высвобождения из клетки во внеклеточное пространство (жидкость) (см. Рисунок 4). Являющаяся свободной циркулирующей микроРНК - внеклеточная микроРНК - высвобождается таким образом. Процесс высвобождения из клетки и циркуляции в периферический кровоток этой микроРНК связан непосредственно с транспортным белком, принадлежащим к соответствующему семейству Ago (белки Ago). [72]. Помимо зрелой циркулирующей микроРНК в кровеносное русло могут попадать и предшественники микроРНК в составе везикул, экзосом, которые “выпадают” в результате апоптоза клеток, а также в комплексе с ЛПВП [73]. Циркулирующие микроРНК могут транспортироваться из одних клеток в другие, оказывать влияние на

активность и функцию клеток, таким образом, играя роль гормон подобных факторов модуляции, выступают в качестве эндокринных модуляторов [74].

Активность влияния микроРНК на клетку зависит от количества и локализации микроРНК и от состояния и типа клетки. В недавнем исследовании было выявлено, что для всех типов клеток половину общего набора микроРНК составляют первые 5 интенсивно экспрессирующихся микроРНК [75,76]. Около 50% микроРНК обладают тканеспецифичностью, 25% экспрессируется повсеместно, остальные 25% обладают низкой экспрессией. Плейотропность и избыточность - свойства микроРНК, благодаря которым одна микроРНК с множеством мРНК-мишеней взаимодействует. В итоге, за счет такого взаимодействия, формируются сложные регуляторные сети, (сюда же относятся и регуляторные петли обратной/прямой связи для того, чтобы управлять генными сетями). Последние обеспечивают быстрое реагирование на разнообразные условия (оно временное). Устойчивую экспрессию гена-мишени, как, например, во время процесса дифференцировки, поддерживают в некоторых случаях микроРНК.[77]. Несколько других примеров поддержания устойчивой экспрессии гена-мишени микроРНК во время процесса дифференцировки:

1. miR-290: Содержит семейство микроРНК, которые поддерживают уровень экспрессии генов, связанных с плюрипотентностью эмбриональных стволовых клеток.
2. miR-21: Влияет на множество генов, в том числе на гены, участвующие в процессе дифференцировки клеток.
3. miR-143/145: Регулируют гены, ответственные за дифференцировку гладкомышечных клеток.
4. miR-122: Оказывает влияние на экспрессию генов, связанных с метаболизмом, в том числе в процессе дифференцировки гепатоцитов.
5. miR-155: Регулирует гены, участвующие в иммунном ответе и дифференцировке клеток иммунной системы.

Замечаем, что помимо регулирования экспрессии мРНК-мишеней, микроРНК

после транскрипции могут оказывать воздействие непосредственно на уменьшение показателя шума в экспрессии. [78]. Отметим, что, предотвращая случайные изменения в транскрипции, микроРНК обеспечивают стабильность генетической экспрессии.

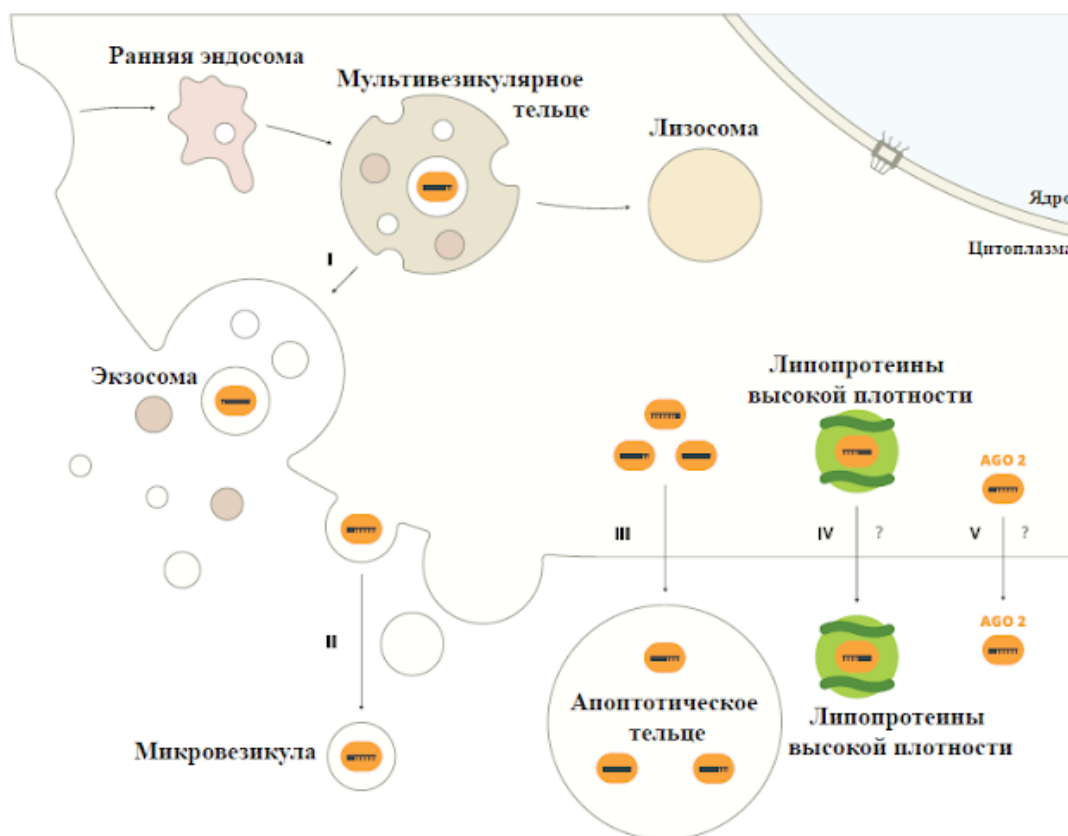


Рисунок 4 (модифицировано из [79,80]). Формирование микроРНК. (I) Может осуществляться секрeция микроРНК в разнообразных везикулах. Во время мембранного впячивания эндосом (ранних) и телец (мультивезикулярных) появляются экзосомы. Образовавшиеся экзосомы высвобождаются в результате слияния мультивезикул с лизосомами. (II) От плазматической мембраны отпочковывается микровезикула. (III) При запрограммированной гибели клетки (апоптоз) образуются апоптотические тельца. (IV, V) Образование микроРНК в комплексе с ЛПВП и белком Ago2 не изучены.

Концепция плейотропности: уровень функциональной активности микроРНК зависит от того, какое количество микроРНК-чувствительных элементов (MRE) в специфической микроРНК. [81]. При увеличении активации экспрессии гена-мишени нагрузка на MRE становится выше, что конечно

приводит к отделению данной микроРНК от других мишеней. Несколько MRE мРНК может содержать. Исследования указывают на то, что если на одной мРНК-мишени присутствует множество MRE, то экспрессия РНК-интерференции увеличивается, а время взаимодействия комплексов-miRISC с этой мРНК также увеличивается.

Под воздействием разнообразных стрессовых условий [82], состояние клетки оказывает влияние на функциональную активность микроРНК. Исследования отражают, что при недостатке питательных веществ микроРНК выходит непосредственно из клеток, что приводит к снижению их уровня внутри клетки[83]. Проведя экспериментальное исследование, внесли в культуру клеток гиппуристанол или циклогексимид непосредственно с целью подавления трансляции микроРНК. В результате осуществляемого вышеперечисленного процесса наблюдалась транспортировка комплексов miRISC из ядра непосредственно в стресс-гранулы, которые являются цитоплазматическими [84]. При снижении активности РНК-интерференции происходят разные последствия: комплексы miRISC в стресс-гранулах могут вернуться в цитоплазму или быть разрушены лизосомами. [85]. Описанный выше механизм иллюстрирует путь транспортировки мРНК при клеточном стрессе (выполняет защитную функцию непосредственно для мРНК, способствует сохранению целостности, и кроме того, функциональности).

Роль микроРНК в клеточной жизнедеятельности. МикроРНК играют важную роль в различных аспектах клеточных процессов, влияя на:

1. Развитие
2. Пролиферацию
3. Дифференцировку
4. Апоптоз
5. Старение
6. Иммунный ответ
7. Передачу сигналов
8. Метаболизм

Это подтверждается результатами соответствующих исследований, где микроРНК выявлены в качестве регуляторов указанных процессов. Их роль особенно проявляется в патологических процессах. Важное значение в патофизиологии различных заболеваний, активно регулируя и модулируя клеточные процессы, имеют микроРНК. Примеры заболеваний: онкологические заболевания, включая рак груди, рак легких, рак простаты. Сердечно-сосудистые заболевания, такие как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, гипертония. Нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, ДЦП. Аутоиммунные заболевания, такие как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, болезнь Крона, болезнь Хашимото, склеродермия, болезнь Бехтерева, псориаз, гломерулонефрит, болезнь Конн, миастения гравис, полиартрит, склерозирующий холангит [86, 87, 88, 89, 90]

1.5. МикроРНК, участвующие в развитии РС

МикроРНК в клеточной жизнедеятельности оказывает влияние непосредственно на различные процессы в клетках. В современных исследованиях особо подчеркивается их роль непосредственно в патогенезе рассеянного склероза. [91]

Рис.5 наглядно иллюстрирует механизмы влияния микроРНК [92].

МикроРНК играют ключевую роль в клеточной жизнедеятельности, оказывая влияние непосредственно на дифференцировку и функции клеток Th17/Th1 (при РС).

Ключевые аспекты одного из последних исследований [93]:

- Некоторые микроРНК, уровень которых повышен при РС, могут снижать активность факторов, препятствующих непосредственно дифференциации клеток Th17/Th1. Вышесказанное поможет понять развитие РС. [94].
- Связь с активностью miR-326. Исследование также подтвердило, что уровень экспрессии микроРНК miR-326 связан непосредственно с Th17, — они вырабатывают интерлейкин-17, что указывает на возможное воздействие miR-

326 на развитие РС и имеет важные последствия в области иммунологии [95, 96]

- Исследование подчеркивает важность микроРНК непосредственно в понимании механизмов болезни и развитии новых подходов к ее лечению. [97].

Механизмы управления дифференциацией Th17 и Th1 клеток в контексте рассеянного склероза:

1. Воздействие miR-326 на дифференцировку Th17 клеток:

- a. Пояснение: При ревматоидном артрите повышение уровня miR-326 связано с активацией дифференциации Th17 клеток.
- b. Механизм: Это происходит за счет подавления экспрессии гена транскрипционного фактора ETS1, который обычно подавляет дифференциацию Th17 клеток.

2. Роль miR-155 в дифференциации Th17/Th1 клеток:

- a. Пояснение: Увеличение уровня miR-155 в Т-клетках при РС оказывает влияние непосредственно на дифференциацию Th17/Th1 клеток.
- b. Механизм: miR-155 действует посредством подавления синтеза фактора ETS1 (транскрипционного), — это способствует непосредственно дифференциации Th17/Th1 клеток. [98, 99, 100, 101].

В исследовании Лиу и коллег [102] был сделан следующий вывод: в период обострения РС у пациентов наблюдаются повышенная активность miR-590. Авторы установили, что miR-590 взаимодействует с мРНК гена TOB1, кодирующий пептид tob/btg1 (антипролиферативный), усиливая в то же время дифференцировку Th17 (патологическую).

Результаты другого исследования показали [103]:

- Объект исследования: пациенты с рассеянным склерозом (РС)
- Найденное изменение: повышение miR-448
- Сопутствующий эффект: снижение активности тирозинфосфатазы типа 2

- Причина: активация Th17-пути (специального типа иммунных клеток)

Другое исследование [104]:

- Объект исследования: пациенты с экспериментальным аутоиммунным энцефалитом (ЭАЭ)

- Найденное изменение: повышенный уровень miR-7e

- Сопутствующий эффект: стимуляция дифференцировки клеток Th1 и Th17 (других типов иммунных клеток)

Ахмадиан-Эльми и его коллеги [105] обнаружили, что в период обострения РС наблюдается увеличение показателя активности miR-27a. Как считают авторы, вышесказанное ведет к тому, что происходит такой процесс как ингибирование экспрессии регуляторов (отрицательных) дифференцировки клеток Th17 (см.рис. 5).

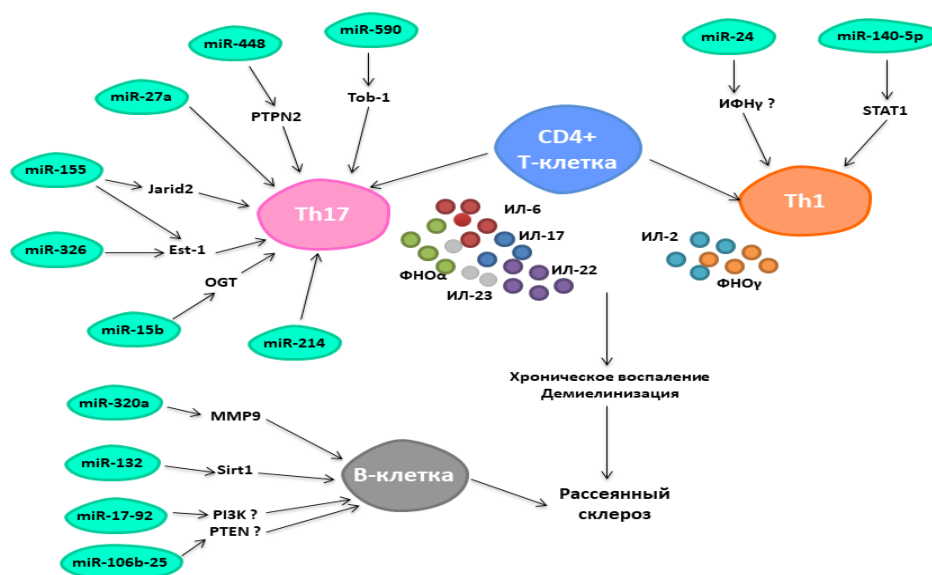


Рисунок 5 (модифицировано из [106]). Участие в развитии иммунного ответа при РС микроРНК. Значимость микроРНК заключается непосредственно в регулировании CD4+ Т-клеток (активности). Происходит активация дифференцировки Th1 и Th17 лимфоцитов. Также микроРНК оказывают влияние на активность В-клеток, обеспечивая их стимуляцию.

Исследование Guerau-de-Arellano и соавторов:

1. Объект исследования: CD4 + Т-лимфоциты при рассеянном склерозе (РС).
2. Найденные результаты:

- в наивных Т-лимфоцитах повышенная экспрессия miR-128 и miR-27b.
- увеличение экспрессии miR-340 в Т-лимфоцитах памяти [107]. Данные микроРНК являются синергистами в стимуляции дифференцировки Th1 клеток и подавлении дифференцировки Th2 клеток. Как оказалось, при РС микроРНК влияют как на Т-клеточное звено, так и на В-клеточное звено (см.табл.6).

Таблица 6 — Влияние микроРНК на РС

Исследование	Воздействие микроРНК	Пример
miR-320a	Снижение уровня miR-320a в В-клетках приводит непосредственно к увеличению проницаемости ГЭБ [108], что может привести к повреждению миелина, защищающего нервные волокна.	У пациентов с РС уровень miR-320a снижен, — это влияет на ГЭБ проницаемость. Имеется риск повреждения миелина.
Обнаружение микроРНК в В-клетках	В В-клетках обнаружены десять различных микроРНК, проявляющих различную активность [109].	В исследовании обнаружены десять различных микроРНК в В-клетках с различающейся активностью. miR-21: фиксируется повышенная экспрессия, регуляция в В-клетках значимая. miR-155: Зафиксировано умеренное повышение активности, — это может указывать непосредственно на его участие в патогенезе рассеянного склероза. miR-146a: Выявлено снижение активности, что может быть связано с дисрегуляцией иммунного ответа в рассеянном склерозе. miR-223: Показал высокую активность, что может указывать на его роль в

		регуляции воспалительных процессов в В-клетках при РС. miR-124: Обнаружено отсутствие активности, что может быть связано с его регуляцией в других клеточных типах, не связанных с иммунным ответом. miR-30a: Показал среднюю активность, что может указывать на его участие в балансировании иммунного ответа. miR-19b: Обнаружена высокая активность, что может свидетельствовать о его роли в пролиферации и дифференцировке В-клеток. miR-181a: Показал низкую активность, что может быть связано с его ролью в регуляции толерантности иммунной системы. miR-29c: Обнаружено повышение активности, что может указывать на его участие в регуляции экспрессии генов, связанных с иммунным ответом. miR-132: Показал среднюю активность, что может быть связано с его участием в регуляции процессов выработки цитокинов и воспаления в В-клетках при рассеянном склерозе.
Воздействие на PI3K и PTEN	Измененная экспрессия микроРНК, в основном, влияет на активность фосфоинозитид-3-киназы	Экспрессия микроРНК регулирует активность PI3K и PTEN, важных факторов в клеточной пролиферации.

	(PI3K) и фосфатазы PTEN. PTEN является ингибитором PI3K и отрицательным регулятором клеточной пролиферации.	
Увеличение экспрессии miR-132	Увеличение экспрессии микроРНК miR-132 в В-клетках у пациентов с РС указывает на его взаимодействие с мРНК гена сирутина 1 (SIR1).	Пациенты с РС имеют увеличение активности miR-132 в В-клетках, — это оказывает влияние непосредственно на регуля-ю процесса выработки цитокинов.

Вышеупомянутые данные свидетельствуют о сложных молекулярных механизмах. Они оказывают влияние непосредственно на развитие и прогрессию РС посредством регуляции микроРНК и их мишеней [110].

Кроме Т- и В-клеток, изучали экспрессию микроРНК в макрофагах. В очагах воспаления при РС фиксируется увеличение уровня экспрессии miR-155 в моноцитах с соответствующим маркером CD14+, и, кроме того, в клетках с маркером CD68+ в сравнении с группой тех, кто является здоровыми [111].

В случае экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЭАЭ) фиксируется в резидентных макрофагах уменьшение экспрессии miR-124 [112]. MiR-124 играет ключевую роль в поддержании устойчивого состояния микроглии в нервной системе и активации моноцитов и макрофагов, стимулируя их трансформацию непосредственно в фенотип M2 при ЭАЭ. Результат: формируется популяция макрофагов фенотипа M2 (для подавления ЭАЭ активности).

В результате исследования [113], которое проводилось Луо и его коллегами, были выявлены двадцать одна дифференциально экспрессирующиеся

микроРНК у пациентов с метастатическим раком простаты (по сравнению с группой людей, являющихся здоровыми). Выявленные микроРНК:

1. miR-199a
2. miR-142-3p

Анализ генов:

Был проведен анализ генов, на которые направлено воздействие этих микроРНК.

Результаты анализа:

- miR-199a воздействует на ген KRAS, связанный с предрасположенностью к раку простаты.
- miR-142-3p оказывает воздействие на гены IL7R и KRAS.

Предложение авторов: На основании полученных результатов авторы предложили рассматривать miR-199a, miR-142-3p и соответствующие им гены (IL7R и KRAS) в качестве потенциальных мишеней для терапии рака простаты.

В литературе также встречаются исследования микроРНК и ремиелинизации.

Последние исследования выявили:

- В условиях, свойственных для ЦНС, происходит увеличение количества и активности некоторых микроРНК, осуществляющие важную функцию в процессах ремиелинизации и регенерации аксонов.

В рамках проведенных исследований было уточнено следующее:

- В процессах ремиелинизации и регенерации аксонов также принимают участие астроциты, среди других клеток.

В ходе исследований Junker и его коллеги обнаружили:

- Астроциты содержат всего десять микроРНК, экспрессия которых в активных очагах демиелинизации значительно возрастает [114].

МикроРНК (miR) - маленькие молекулы, которые играют важную роль в защите миелиновой оболочки.

Результаты исследований показывают следующее:

- miR-219: Одно исследование показало, что miR-219 помогает защищать

миелиновую оболочку. Она помогает сохранять стабильность в зрелых олигодендроцитах [115], взаимодействуя с мРНК гена ELOVL7;

- miR-17-5p и miR-19b: Эти микроРНК контролируют количество олигодендроцитов и взаимодействуют с мРНК гена PTEN, это ген, который влияет на разные процессы в клетке [116];

- miR-23: Эта микроРНК необходима для развития олигодендроцитов и процесса миелинизации, то есть образования миелиновой оболочки вокруг нервных волокон. Он контролирует активность гена, который кодирует белок ламин В1, который важен для этого процесса [117].

Большая часть проведенных исследований, конечно, отражают механизмы патогенеза РС, которые являются молекулярными. Но в большинстве своем, в них не учитывали различные варианты течения РС, фазы РРС. Также, что немаловажно, не принималось во внимание во многих работах влияние ПИТРС, в то время как в ряде работ показано, что ПИТРС могут оказывать влияние на экспрессию микроРНК [118, 119, 120]. Стоит также отметить, что до сих пор не исследован весь пул микроРНК спинномозговой жидкости с использованием высокопроизводительных методов.

1.6 Свободная циркулирующая микроРНК в ЦСЖ как потенциальный диагностический маркер при РС

ЦСЖ, которая омывает всю ЦНС и часто находится в прямом контакте с участком повреждения, может служить ценным источником биомаркеров различных состояний нервной системы, а микроРНК – малые некодирующие РНК, участвующие в процессе посттранскрипционной регуляции экспрессии белок-кодирующих генов, потенциально могут рассматриваться в качестве таких маркеров. Уже неоднократно показано, что микроРНК, присутствующие в биологических жидкостях, могут быть полезны в качестве биомаркеров при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, опухолях ЦНС. Для РС в литературе также представлено несколько работ, исследующих концентрации микроРНК в ЦСЖ в сравнении с другими воспалительными и невоспалительными неврологическими заболеваниями, а также на разных

этапах развития патологического процесса. Особый интерес представляют работы, посвященные возможности использования микроРНК в качестве маркеров перехода РИС и КИС в клинически достоверный РС.

В настоящее время опубликовано десять оригинальных работ, посвященных исследованию изменений концентрации свободной циркулирующей микроРНК в ЦСЖ больных РС, КИС и лиц с РИС. Все эти исследования можно разделить на 3 категории: 1) исследования, в которых проводится сравнение концентрации нескольких микроРНК в ЦСЖ больных РС и пациентов с ДНЗ; 2) работы, в которых микроРНК рассматривается в качестве прогностического маркера, для перехода РИС в РС, КИС в РС и ожидаемого ответа на лечение диметилфумаратом; 3) исследования, в которых сравнивалась концентрация микроРНК в ЦСЖ у больных РС с разными вариантами клинического течения.

В таблице 7 суммированы результаты этих исследований.

Таблица 7. Результаты опубликованных в настоящее время исследований микроРНК в ЦСЖ пациентов с РС

Статья	Исследованные группы пациентов	Группа сравнения	Полученные результаты miR
Сравнение концентрации микроРНК между пациентами с РС и ДНЗ			
Haghikia et al (2012)	РС	ДНЗ	922 ↑ 181c ↑ 633 ↑
Bergman et al (2016)	РС	ДНЗ	150 ↑
	КИС	ДНЗ	150 ↑
Quintana et al (2017)	РС	ДНЗ	30a-5p ↑ 150 ↑ 645 ↑ 328 ↑

			199a-3p ↓ 21 ↓ 106a ↓ 191 ↓ 146a ↓ 365 ↓
Kramer S et al (2019)	PC	ДНЗ	181c ↑ 633 ↑ повышение концентрации miR-922 у больных PC не было подтверждено
Bruinsma IB et al (2020)	PC	ДНЗ	отсутствие миРНК-219 в ЦСЖ у пациентов с PC
Исследование концентрации микроРНК в ЦСЖ в качестве прогностического маркера			
Ahlbrecht J et al (2016)	КИС-PPC	КИС-КИС	miR-922 ↑ miR-181c ↑
Muñoz-San Martín M et al (2020)	РИС-PC	РИС-РИС	144-3p ↑ 448 ↑ 653-3p ↑ в ЦСЖ индивидов с РИС, перешедших в PC за время наблюдения.
Francesca De Vito et al (2022)	PC прогрессирующие варианты	PC	повышение экспрессии miR-142-3p в ЦСЖ пациентов с

			прогрессирующими вариантами РС; терапевтический ответ пациентов с «низким уровнем миР-142-3р» на ДМФ был выше, чем у пациентов с «высоким уровнем миР-142-3р»
Сравнение концентрации микроРНК в ЦСЖ у больных РС с разными вариантами клинического течения			
Haghikia et al (2012)	PPC	ВППС	miR-181c ↑ miR-633 ↑
Muñoz-San Martín et al (2019)	PC Gd+	Gd–	miR-21 ↑ miR-146a/b ↑
Mandolesi G et al (2021)	PPC PPC обострение	ППРС PPC ремиссия	let-7b-5p ↑ let-7b-5p ↓

↑ - повышение, ↓ снижение

Проведя исследование в 2012 г., Haghikia и его коллеги сравнили экспрессию трехсот восьмидесяти микроРНК у пациентов, имеющих рассеянный склероз, с теми, у кого диагностировано девятнадцать прочих неврологических заболеваний. Для этого они использовали miRNome microRNA Profilers QuantiMir Human PCR array.

Была показана дифференциальная экспрессия для miR-922, miR181c и miR-633 между ЦСЖ больных РС и группой больных ДНЗ. Также была показана дифференциальная экспрессия miR-181c и miR-633 при PPC и ВППС [9].

В работе Bergman et al (2016) при сравнении концентрации микроРНК между совокупной группой, включающей больных РС и КИС против группы, включающей больных с ДНЗ (воспалительными и невоспалительными), было

показано, что для больных РС и КИС характерна повышенная концентрация miR-150 в ЦСЖ [10].

Quintana et al (2017) в своем исследовании воспроизвели повышение экспрессии miR-150 в ЦСЖ больных РС. В работе были обнаружены следующие изменения в экспрессии микроРНК:

Увеличение экспрессии — miR:

- 328
- 30a-5p
- 645

Снижение экспрессии — miR:

- 21
- 199a-3p
- 191
- 365
- 106a
- 146a[11]

В работе Kramer S et al (2019) была проведена попытка валидации результатов исследования Haghikia et al (2012).

Анализировались концентрации микроРНК в ликворе, включая miR:

- 181c
- 633
- 922

Общее количество участников исследования:

- двести восемнадцать пациентов с рассеянным склерозом (РС)
- двести одиннадцать пациентов с ДНЗ. Подтверждена повышенная экспрессия miR-181c и miR-633 в ЦСЖ пациентов с РС. Использование этих микроРНК для построения классификатора дало чувствительность 62% и специфичность 89% для дифференцировки РС от ДНЗ, т.е., miR-181c и miR-633, полученные из ликвора, позволяют отличать пациентов с РС от пациентов

с ДНЗ. Результаты Haghighi et al (2012) в отношении miR-922 воспроизвести не удалось [121].

В своем исследовании Bruinsma IB et al (2020) определяли содержание miR -219 в ЦСЖ больных РС и контрольной группы. miR-219 была выбрана для исследования в связи с тем, что она является фактором необходимым для дифференцировки клеток-предшественников в зрелые миелинообразующие клетки (т.е. фактор ремиелинизации). В работе показано отсутствие этой микроРНК на детектируемом уровне в ЦСЖ пациентов с РС [122].

Ahlbrecht J et al (2016) исследовали связь между miR-181с, miR-633 и miR-922 и переходом из КИС в РРС. Авторы сравнили концентрации этих микроРНК в ликворе и сыворотке крови у пациентов с КИС с переходом в РРС (КИС-РРС) и без перехода в РРС (КИС-КИС) в течение 1 года. По результатам исследования: у 30 из 58 пациентов развился РРС. Концентрации miR -922 ЦСЖ, miR -922 сыворотки и miR -181с ЦСЖ были значительно выше в группе КИС-РРС по сравнению с группой КИС-КИС [123].

Muñoz-San Martín M et al (2020) оценивали у 15 пациентов с РИС содержание 216 микроРНК с целью прогнозирования перехода в РС через 5 лет наблюдения и обнаружили специфический профиль дерегуляции циркулирующих микроРНК. Концентрация в ЦСЖ miR-144-3р, miR-448 и miR-653-3р была ниже у пациентов, у которых развился РС за 5 лет наблюдения [124].

В работе Francisco De Vito et al (2022) провели анализ концентрации miR -142-3р в ЦСЖ 151 пациента с РС и обнаружили положительную корреляцию между уровнями miR -142-3р в ЦСЖ и клиническим прогрессированием заболевания. Также было показано, что терапевтический ответ пациентов с «низким уровнем miR-142-3р» на диметилфумарат (ДМФ), был выше, чем у пациентов с «высоким уровнем miR-142-3р». Авторы сделали вывод, что miR-142-3р является потенциальным негативным прогностическим маркером ЦСЖ при РС и может влиять на эффективность терапии ДМФ [125].

Авторы Muñoz-San Martín et al (2019) 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 очагами, накапливающими контрастное вещество и без накопления очагами контрастного вещества обнаружено, что для первых характерно стабильное повышение miR-21 и miR-146a/b [126].

Mandolesi G et al (2021) сравнивали уровень микроРНК let-7b-5p в ликворе у пациентов с РС: у пациентов с РРС и ППРС, у пациентов с обострением и ремиссией. Уровень let-7b-5p в ЦСЖ был значительно ниже у пациентов с ППРС по сравнению с пациентами с РРС, а также в фазу обострения при РРС, в сравнении с ремиссией. Предполагают, что let-7b-5p является защитным фактором при РС, как при нейровоспалении, так и с точки зрения нейродегенерации и инвалидизации [127].

Как это видно из приведенных данных в последние годы идентификации микроРНК в биологических жидкостях для диагностики и прогнозирования РС уделяется большое внимание, но исследования в данном направлении все еще находятся в зачаточном состоянии.

Практически все приведенные исследования выполнены с использованием одного и того же набора методов. На первом этапе авторы на ограниченной выборке искали микроРНК с измененной экспрессией при помощи «чипов низкой плотности», на втором этапе на расширенной выборке проводилась валидация результатов методами количественной ПЦР. Таким образом, разнообразие исследованных микроРНК весьма ограничено. На текущий момент для РС не 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).

Суммируя данные опубликованных работ, есть основания предположить, что микроРНК действительно может быть перспективным маркером для диагностики и прогнозирования течения РС. Несомненно, необходимо

расширение пула исследованных микроРНК, дальнейшая проверка уже имеющихся в литературе данных, исследование с использованием более крупных групп пациентов и данных более длительного периода наблюдения.

Отдельным направлением исследований должно стать выяснение биологической функции наблюдаемых изменений. Необходимо проведение биоинформатического анализа сетей молекулярных взаимодействий, в которые вовлечены белковые продукты генов-мишеней, найденных микроРНК.

1.7. Происхождение свободной циркулирующей микроРНК в ЦСЖ

МикроРНК являются наиболее хорошо изученными видами РНК, поскольку они обнаружены практически во всех биологических жидкостях, включая ликвор, слюну, плазму, сыворотку и мочу. Их персистенция и неизменное содержание во внеклеточной жидкости или ликворе могут играть определенную роль в распространении заболеваний в нервной системе.

Важно отметить, что микроРНК стабильны в циркулирующих жидкостях, предположительно потому что они содержатся в рибонуклеопротеиновых комплексах или мембранных везикулах, что обеспечивает им защиту от деградации [128]

Что касается вопроса о происхождении микроРНК в ЦСЖ, то на сегодняшний день он все же остается открытым. МикроРНК, которые вырабатываются, лишь функционированием внутри отдельных клеток не ограничиваются. Обратим внимание также на то, что они могут попадать в кровоток. В основном ассоциированы с белками семейства AGO внеклеточные микроРНК, составляющие всего от 90 до 99% от общего числа (отсюда они могут попадать в ЦСЖ посредством гематоэнцефалический барьера и оказывать воздействие непосредственно на целевые клетки). [129]. Это позволяет предположить существование дифференциально экспрессирующихся микроРНК при различных типах течения РС и предрасполагающих состояниях (РИС, КИС), которые имеют конкретные мишени.

Еще один возможный источник циркулирующей микроРНК ЦСЖ - микроРНК может высвобождаться из клеток в результате апоптоза и таким образом попадать в ЦСЖ [130]. Эта версия также представляется вполне оправданной с учетом того, что при РС происходит не только воспалительный процесс, но и процесс нейродегенерации и гибели клеток.

Также известно, что циркулирующие микро-РНК могут быть побочным продуктом обычной секреции микровезикул [131]. Экзосомы - это связанные с мембраной везикулы, выделяемые почти всеми типами клеток и содержащие, среди прочего, микроРНК. Значительное увеличение концентрации циркулирующих экзосом происходит при многих воспалительных заболеваниях [132]. Поскольку экзосомы могут проникать через ГЭБ, некоторые из циркулирующих экзосом проникают в ЦНС и у пациентов с РС могут быть получены из пораженных клеток ЦНС или связанной с ними воспалительной среды - ЦСЖ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект 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:

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

Пациенты в стадии ремиссии:

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

Пациенты с ППРС:

- д) 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:

- а. Двадцать два человека мужского пола;
- б. Двадцать пять человек женского пола.

Средний возраст: 38.2 ± 13.9 лет

Контрольная группа включала заболевания ЦНС:

- с. Не имеющие аутоиммунной или воспалительной природы;
- д. 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 8.

Таблица 8. 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 ± 5.5	35.3 ± 7.9	33.8 ± 6.1	31.6 ± 5.3
Тяжесть состояния по шкале EDSS	2.5 ± 1.0	1.5 ± 1.5	2.5 ± 1.5	-

Длительность заболевания (в годах)	4.9 ± 3.2	5.1 ± 1.2	3.0 ± 2.8	1.2 ± 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 (ЦСЖ) у пациентов с различными формами РС и контрольной группы.

Объекты исследования:

Двадцать шесть неродственных пациентов с впервые диагностированным РС:

- а. Ремиттирующий РС (в ремиссии): одиннадцать образцов;
- б. Ремиттирующий РС (обострение): три образца;
- с. 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 ± 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 (ЦСЖ): учитывались стадии заболевания и отсутствие предшествующей терапии у пациентов с рассеянным склерозом (РС).

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:

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

Пациенты в стадии ремиссии:

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

Пациенты с ППРС:

- д) 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 9.

Таблица 9. 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. $\pm$ SD	35.3 $\pm$ 7.9	34.9 $\pm$ 5.5	33.8 $\pm$ 6.1	31.6 $\pm$ 5.3
EDSS, средн. $\pm$ SD	1.5 $\pm$ 1.5	2.5 $\pm$ 1.0	2.5 $\pm$ 1.5	-
Длит-ть. РС (лет), средн. $\pm$ SD	5.1 $\pm$ 1.2	4.9 $\pm$ 3.2	3.0 $\pm$ 2.8	1.2 $\pm$ 1.9

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

2.2 Общеклиническое исследование пациентов

Пациентов оценивали с учётом следующих процедур: сбора медицинской истории, осмотра тела с оценкой кожных покровов, ощупывания, перкуссии и прослушивания грудной клетки и живота, проверки наличия перитонеальных симптомов и симптома поколачивания, измерения артериального давления, а также проведения неврологического осмотра в соответствии с общепринятой методикой (Гусев Е.И. и др., 1988), с оценкой степени инвалидизации по 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 радиологически изолированный синдром устанавливался на основании нейровизуализационных данных и

неврологического осмотра. При оценке сопутствующих заболеваний проводилось их изучение при поступлении в отделение до начала участия в исследовании. Это основывалось на жалобах, данных анамнеза, осмотра, данных анализов и результатов инструментальных методов обследования.

Всем участникам исследования проводилась люмбальная пункция для оценки микробиотического состава крови и ЦСЖ и выделения свободной циркулирующей микроРНК из ЦСЖ. Все образцы крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) собраны для диагностики в соответствии с протоколом и одобрением местного этического комитета. Каждый пациент дал соответствующее согласие на участие в исследовании.

2.3. Подготовка образцов крови

1. Образцы собраны в пробирки — они в качестве антикоагулянта включают ЭДТА.
2. Цельную кровь сразу замораживали при температуре -20°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.

2.4. 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°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 +4⁰С, отбирали супернатант с помощью стерильной пипетки в стерильные эппендорфы.

5. Далее супернатанты замораживали при температуре -80⁰С.

2.5. 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 [37].

Методика включает:

1. Извлечение кислот(жирных), стеринов и альдегидов из плазмы (а также из ликвора).

2. Разделение компонентов методом хроматографии.

3. Обнаружение и идентификация компонентов с использованием масс-спектрометрии(МС) [133, 134].

4. Применение методики Осипова и соавторов для анализа [135].

5. Предварительная подсушка образцов при плюс 80⁰С.

6. Добавление метанола для увеличения скорости сушки.

Ниже представлена таблица 10, иллюстрирующая этапы и описание.

Таблица 10. ГХ (газовая хроматография): Этапы и описание методики

Этап	Описание
Метанолиз	Высвобожд. 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 анализа в ГХ-МС для анализа с масс-селективн. детект-м ([135])
--------------	---

Ниже представлена таблица 11, иллюстрирующая характеристику работы МС.

Таблица 11 — Описание работы МС (масс-спектрометрия) [136].

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 12.

Таблица 12. 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

2.6. 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.13):

Таблица 13. 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 вортексировали 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 6).

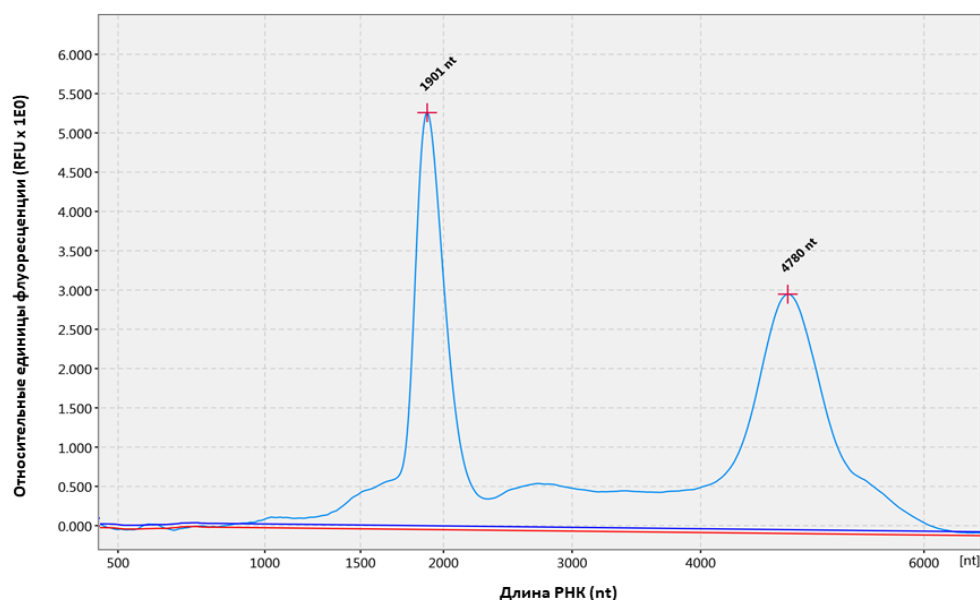


Рисунок 6. Электрофореграмма тотальной РНК, выделенной из ликвора. На электрофореграмме тотальной РНК из ликвора наблюдается два пика: один соответствует 28S рибосомной РНК (около 4тыс. 800 нуклеотидов), а другой -

18S рибосомной РНК (приблизительно 1тыс.900 нуклеотидов). Индекс целостности РНК (RIN) для образца составляет 9.2.

2.7. 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 флуорометрии.

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.

2.8. Анализ данных секвенирования микроРНК

Анализ данных секвенирования:

1. Инструменты обработки (Пайплайн):
 - а. nf-core/smrnaseq (Small RNA-Seq Best Practice Analysis Pipeline) версии 2.1.0[137]
2. Качество сырых прочтений (Ридов):
 - а. Программное обеспечение (ПО): FastQC версии 0.11.9
3. Удаление последовательностей адаптеров:
 - а. ПО: Trim Galore версии 0.6.5

4. Выравнивание ридов на базу данных последовательностей зрелых микроРНК:

- a. База данных: miRBase version [138]
- b. ПО для выравнивания: Bowtie1 версии 1.3.1[139]

2.9. Статистический анализ

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования:

- 1. Пакет для проведения анализа: DESeq2 версии 1.36.0 [140]
- 2. Поправка на сравнения (множествен-е): Метод Бенджамини-Хохберга (FDR) [141]
- 3. Критерии дифференциальной экспрессии микроРНК:
 - a. МикроРНК считали экспрессирующейся (дифференциально) в том случае, если уровни ее экспрессии непосредственно между сопоставляемыми категориями отличались не менее чем вдвое.
 - b. Ном. значимость: $p < 0.05$

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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. 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. 14 подробно описывают отличия в содержании маркеров между контрольной группой, пациентами с РС и лицами с РИС.

Таблица 14. 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] *p=0,04	0,23 [0,11-0,48] *p=0,03	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] *p=0,004	0,1 [0,02-1,5] p=0,49	0,36 [0,06-0,68]
20:1d11	<i>Streptococcus</i> (anaerobic)	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] *p=0,02	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,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Vibrio, Neisseria,</i> <i>Moraxella,</i> <i>Kingella,</i> <i>Ps.pertucinogena</i>	0,03 [0,01-0,05] p=0,25	0,04 [0,02-0,13] *p=0,01	0,04 [0,02- 0,07] *p=0,03	0,06 [0,04-0,08] *p=0,02	0,02 [0,01-0,03]
i14a	<i>Bifidobacterium,</i> <i>Butirivibrio</i>	0,33 [0,15-0,73] p=0,21	0,72 [0,29-1,41] *p=0,002	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] *p=0,02	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 микроскопы</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,</i> <i>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,</i> <i>Streptococcus,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>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,</i> <i>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>Butyrivibrio</i> , <i>Lactobacillus</i> (rumen), <i>Propionibacterium</i> <i>acnes</i>	0,18 [0,08-0,27] p=0,87	0,43 [0,17-0,94] *p=0,003	0,45 [0,27-1,1] *p=0,02	0,22 [0,12-1,37] p=0,33	0,17 [0,07-0,34]
a15a	<i>Butyrivibrio</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Frigoribacterium</i> , <i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i> , <i>Propionibacterium</i> <i>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] *p=0,013	0,56 [0,33-0,74] *p=0,03	0,18 [0,17-1,28] p=0,42	0,23 [0,1-0,45]
2h26	<i>Грибы</i> <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</i> <i>viscosus</i> , <i>Propionibacterium</i> <i>jensenii</i> , <i>Streptococcus</i>	0,23 [0,12-0,4] p=0,42	0,43 [0,28-0,69] *p=0,01	0,4 [0,18-0,72] p=0,2	0,29 [0,08-1,07] p=0,65	0,18 [0,11-0,51]

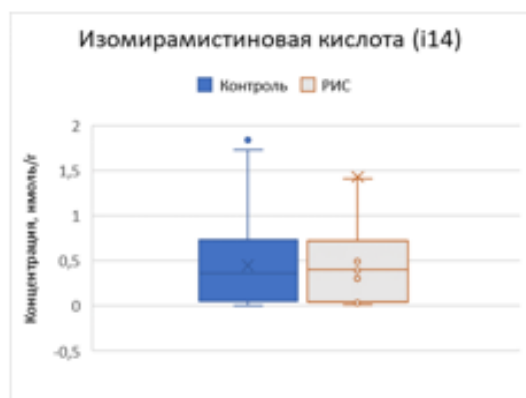
	(анаэробные), <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>St. salivarius</i> , <i>St. mutans</i>					
Cholestadien он	<i>Cytomegalovirus</i>	0,02 [0,01-0,05] p=0,73	0,02 [0,02-0,05] p=0,38	0,03 [0,02-0,07] p=0,36	0,03 [0,01-0,05] p=0,7	0,02 [0,01-0,05]
Эндотоксин (сумма)		1,01 [0,62-1,69] p=0,8	1,44 [1,09-2,71] *p=0,02	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 н (по 16а)		0,12 [0,06-0,37] p=0,6	0,53 [0,23-1,21] *p=0,01	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 – изомирамистинный; 15:1d9 - 9,10-пентадеценная; 18:1d11a - цис-вакценная; 18:1d11 - цис-вакценная; a13 – антеизодеканная; a15a - антеизопентадеканная; 16:1d11 - 11,12-гексадеценная; 20:1 – арахидная; 19сус - циклононадеканная; 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).

Ниже в виде серии диаграмм (ящики с усами) для некоторых микроорганизмов наглядно представлено содержание их микробных маркеров во всех исследуемых группах пациентов (Рисунок 7).

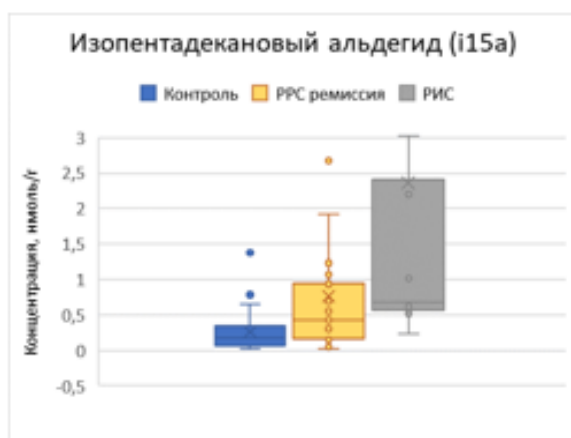
Рисунок 7.



Peptostreptococcus anaerobius

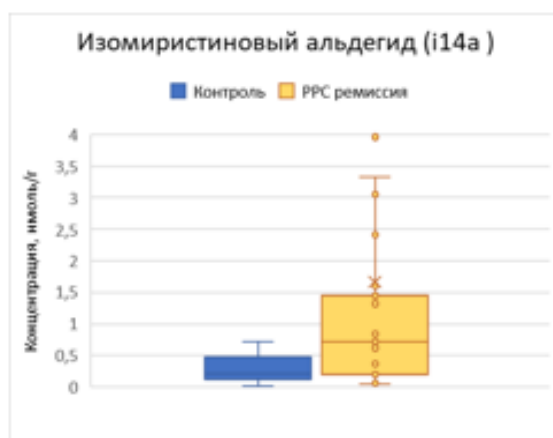


Epstein-Barr



Butyrivibrio, *Lactobacillus (rumen)*,

Propionibacterium acnes



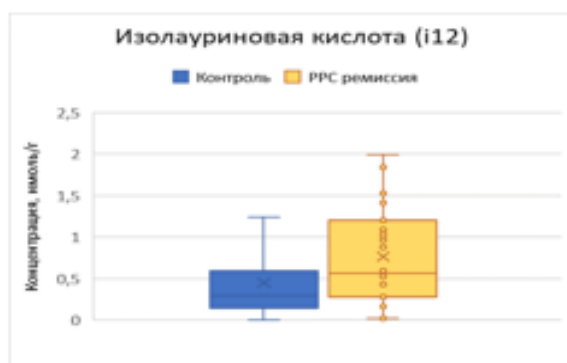
Bifidobacterium, *Butyrivibrio*



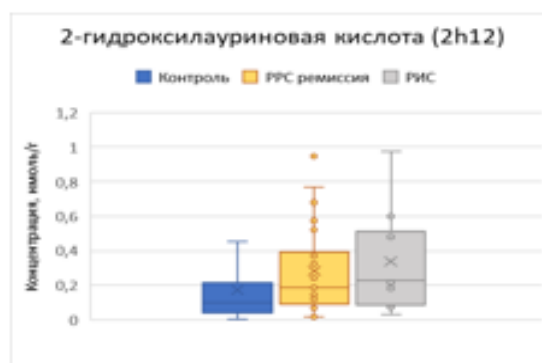
Actinomyces/Actinomyces viscosus, *Propionibacterium jensenii*

Streptococcus (анаэробные), *Streptococcus thermophilus*, *St. salivarius*,

St. mutans



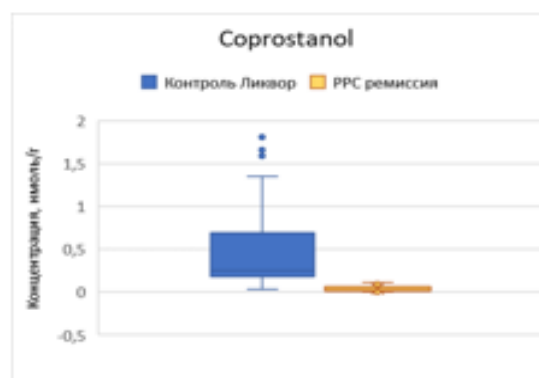
Pentostreptococcus anaerobius



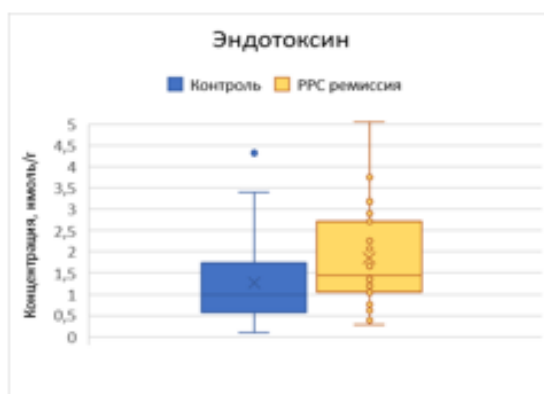
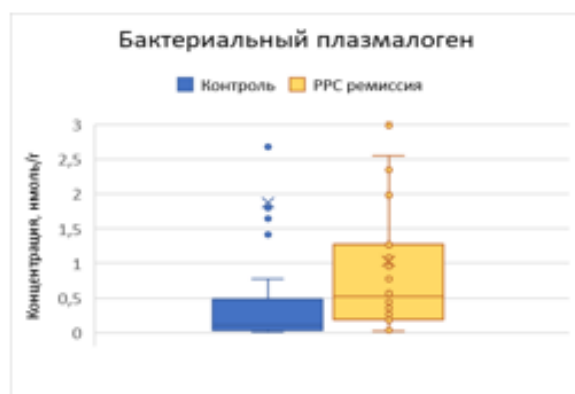
Pseudomonas aeruginosa



p. Acinetobacter, *Pseudomonas*,
Vibrio, *Neisseria*,
Moraxella, *Kingella*, *Ps. pertucinogena*



Eubacterium



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 нагрузки среды. Многие анаэробные и некоторые факультативно анаэробные бактерии производят бактериальный плазмалоген [142]. Эндотоксин — липополисахарид (ЛПС), основная компонента внешней мембраны грамотрицательных бактерий [143]. 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 нагрузки 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 нагрузке 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.

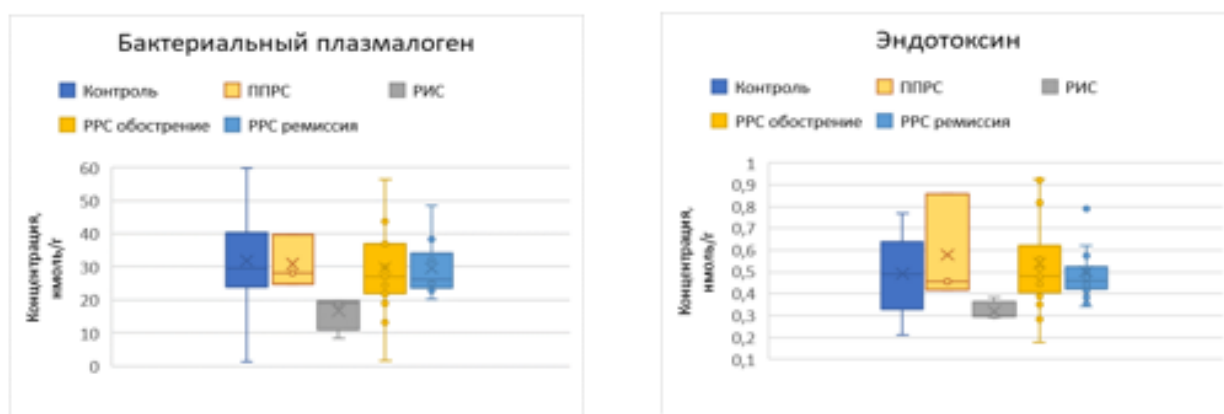
Исследование уровня микробных маркеров в цельной крови пациентов с рассеянным склерозом (РРС) в различных стадиях заболевания и контрольной группы не выявило статистически значимых различий между этими группами (см. таблицу 15).

Таблица 15. Уровень содержания микробных маркеров в цельной крови пациентов с РС в стадии обострения, ремиссии и контрольной группы, нмоль/г

Микробный маркер	PPC в стадии обострения	PPC в стадии ремиссии	Контрольная группа
Плазмалоген (по 16a)	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 процентиля). Ниже приведены данные о содержании плазмалогена и эндотоксина в цельной крови в виде диаграмм (ящичков с усами) (Рисунок 8).

Рисунок 8.



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

3.2.1. 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 шестнадцать микроРНК, экспрессия которых отличалась более чем в два раза по сопоставлению с контрольной группой ($\text{Fold change, FC} -1 < \text{Log}_2 \text{FC} > 1$ и $\text{padj} < 0.05$) (Рисунок 9).

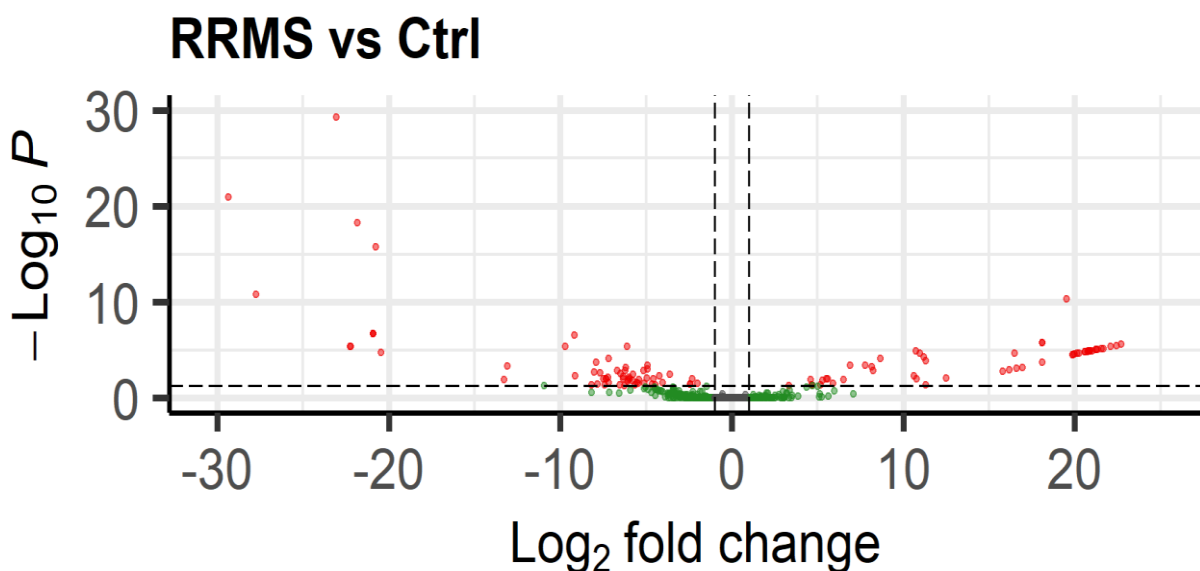


Рисунок 9.

Среди них экспрессия 54 микроРНК была повышена ($\text{Log}_2 \text{FC} > 1$), а 62 – понижена при РРС ($\text{Log}_2 \text{FC} < -1$). Результат представлен в таблице 16.

Таблица 16. МикроРНК, уровни которых в ЦСЖ значительно разнились как показало сравнение больных РРС во время ремиссии и больных контрольной группы.

№	МикроРНК	log2FC	padj
1	hsa-miR-4731-5p	22,6990714	0,0000027
2	hsa-miR-9983-3p	22,4507858	0,0000034
3	hsa-miR-3614-5p	22,1094569	0,0000004
4	hsa-miR-4752	21,6818891	0,0000067
5	hsa-miR-618	21,5656725	0,0000074
6	hsa-miR-3155a	21,3342232	0,0000095
7	hsa-miR-3158-5p	21,2709516	0,0000095
8	hsa-miR-3158-3p	21,2709516	0,0000095
9	hsa-miR-5572	21,0349385	0,0000123
10	hsa-miR-6085	20,8991781	0,0000135
11	hsa-miR-519c-3p	20,8539511	0,0000135
12	hsa-miR-1911-5p	20,8539511	0,0000135
13	hsa-miR-6794-3p	20,8265554	0,0000135
14	hsa-miR-4705	20,8127294	0,0000135
15	hsa-miR-548b-3p	20,7400911	0,000014
16	hsa-miR-518f-3p	20,6169828	0,0000156
17	hsa-miR-1193	20,5984871	0,0000156
18	hsa-miR-6515-5p	20,2644423	0,0000224
19	hsa-miR-3170	20,1537524	0,0000236
20	hsa-miR-4520-3p	19,9984349	0,0000278

21	hsa-miR-11401	19,9169717	0,0000299
22	hsa-miR-6812-3p	19,8749626	0,0000307
23	hsa-miR-6799-3p	19,5387757	4,57E-11
24	hsa-miR-10396a-5p	18,1126422	0,0000017
25	hsa-miR-10396b-5p	18,1126422	0,0000017
26	hsa-miR-5581-3p	18,1074392	0,0002015
27	hsa-miR-6782-5p	16,9522942	0,0006316
28	hsa-miR-6790-3p	16,601609	0,0008741
29	hsa-miR-1283	16,4979973	0,0000236
30	hsa-miR-3149	16,2099433	0,0012559
31	hsa-miR-7158-5p	15,826121	0,0016884
32	hsa-miR-6785-5p	12,5028887	0,0088586
33	hsa-miR-520f-5p	11,3346246	0,0001283
34	hsa-miR-1912-3p	11,3262974	0,0425306
35	hsa-miR-3916	11,1921015	0,0000531
36	hsa-miR-383-3p	10,9768227	0,0000224
37	hsa-miR-487a-5p	10,7788299	0,0104841
38	hsa-miR-512-3p	10,7245044	0,0000135
39	hsa-miR-656-3p	10,6409296	0,0047702
40	hsa-miR-5689	8,6760681	0,0000768
41	hsa-miR-519d-5p	8,2436056	0,0013902

42	hsa-miR-1913	8,1829307	0,0005648
43	hsa-miR-499b-3p	7,7878138	0,0004146
44	hsa-miR-631	6,8935169	0,0004146
45	hsa-miR-7704	6,5261921	0,0127106
46	hsa-miR-338-5p	5,9085001	0,0317752
47	hsa-miR-3131	5,5865592	0,0104841
48	hsa-miR-4454	5,5251366	0,00991
49	hsa-miR-6765-3p	5,3071839	0,0147706
50	hsa-miR-6842-5p	5,1903556	0,0444737
51	hsa-miR-365a-3p	4,673251	0,0397992
52	hsa-miR-365b-3p	4,673251	0,0397992
53	hsa-miR-379-5p	4,588083	0,0131819
54	hsa-miR-1469	3,3366388	0,047625
1	hsa-miR-451a	-1,9985018	0,0288558
2	hsa-miR-9-5p	-2,2947546	0,00991
3	hsa-miR-7-5p	-2,4344355	0,0336683
4	hsa-miR-3529-3p	-2,4344355	0,0336683
5	hsa-miR-346	-3,6179457	0,0036986
6	hsa-miR-340-3p	-4,034479	0,0261102
7	hsa-miR-29b-3p	-4,223456	0,0050154
8	hsa-miR-181c-5p	-4,4703258	0,0449671

9	hsa-miR-30c-5p	-4,5635818	0,00991
10	hsa-miR-582-5p	-4,6480262	0,0360777
11	hsa-miR-574-5p	-4,9008718	0,000414
12	hsa-miR-181d-5p	-4,930607	0,000883
13	hsa-miR-708-5p	-4,9425283	0,00928
14	hsa-miR-135a-5p	-5,1076226	0,0288901
15	hsa-miR-487b-3p	-5,1355011	0,0014971
16	hsa-miR-19b-3p	-5,4013919	0,0121158
17	hsa-miR-1249-3p	-5,4370142	0,0288901
18	hsa-miR-433-3p	-5,5335332	0,0261102
19	hsa-miR-450a-5p	-5,655858	0,0470055
20	hsa-miR-517-5p	-5,7519315	0,0036986
21	hsa-miR-181a-3p	-5,7967041	0,0146875
22	hsa-miR-3184-5p	-5,9594143	0,00991
23	hsa-miR-96-5p	-5,9700648	0,0071096
24	hsa-miR-625-5p	-6,0111572	0,0124255
25	hsa-miR-335-3p	-6,0784375	0,017073
26	hsa-miR-29c-3p	-6,0832191	0,0000039
27	hsa-miR-425-5p	-6,1835658	0,0007035
28	hsa-miR-409-3p	-6,2284597	0,0013902
29	hsa-miR-4446-3p	-6,2538536	0,0498455

30	hsa-miR-363-3p	-6,3207652	0,0055649
31	hsa-miR-129-1-3p	-6,3455405	0,00991
32	hsa-miR-126-5p	-6,4850912	0,0028354
33	hsa-miR-6746-3p	-6,5069397	0,0425306
34	hsa-miR-135b-5p	-6,6847409	0,0013902
35	hsa-miR-125b-1-3p	-7,1665662	0,0232341
36	hsa-miR-219b-5p	-7,1918641	0,0000768
37	hsa-miR-133b	-7,2211515	0,0065914
38	hsa-miR-219a-5p	-7,3314038	0,0095985
39	hsa-miR-219b-3p	-7,3314038	0,0095985
40	hsa-miR-590-3p	-7,4014056	0,0441061
41	hsa-miR-942-5p	-7,4852856	0,00991
42	hsa-miR-532-3p	-7,6782127	0,0023658
43	hsa-miR-345-5p	-7,8167398	0,0331708
44	hsa-miR-31-5p	-7,8914692	0,0002022
45	hsa-miR-887-3p	-8,0085585	0,0021604
46	hsa-miR-4725-3p	-8,1722255	0,0449671
47	hsa-miR-320d	-9,1470701	0,0047702
48	hsa-miR-490-5p	-9,1606579	0,0000003
49	hsa-miR-361-5p	-9,7161583	0,000004
50	hsa-miR-3978	-13,0819355	0,0004568

51	hsa-miR-3126-3p	-13,2588311	0,0127145
52	hsa-miR-10395-3p	-20,436584	0,0000197
53	hsa-miR-941	-20,7494642	1,87E-16
54	hsa-miR-3689a-5p	-20,9181333	0,0000002
55	hsa-miR-3689b-5p	-20,9181333	0,0000002
56	hsa-miR-3689e	-20,9181333	0,0000002
57	hsa-miR-107	-21,820832	5,57E-19
58	hsa-miR-3622b-5p	-22,2060077	0,0000039
59	hsa-miR-6749-5p	-22,2689264	0,0000039
60	hsa-miR-744-5p	-23,0474858	5,41E-30
61	hsa-miR-1284	-27,7473033	1,47E-11
62	hsa-miR-589-5p	-29,368517	1,08E-21

3.2.2. 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 $\text{Fold change, } \text{FC}-1 < \text{Log}_2\text{FC} > 1$ и $\text{padj} < 0.05$ (Рисунок 10).

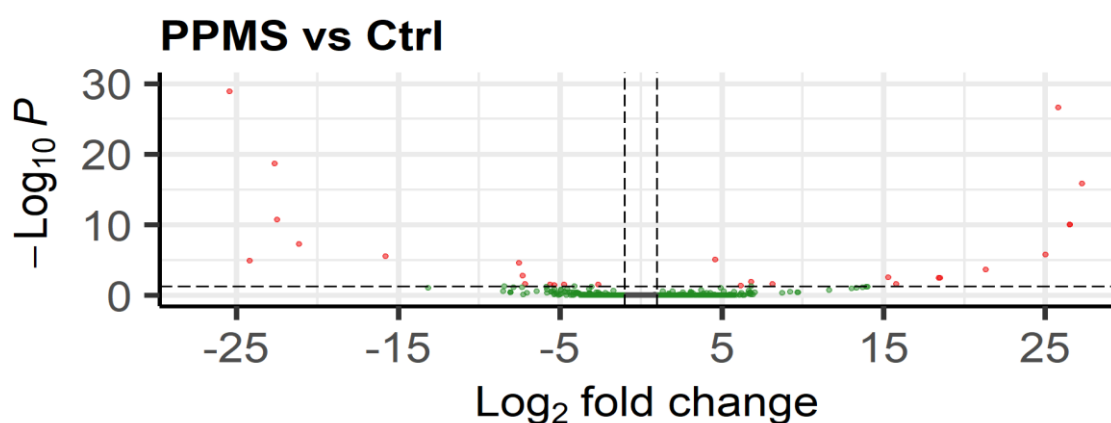


Рисунок 10.

Среди них экспрессия 15 микроРНК была повышена ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$), а 13 – понижена при ППРС ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$). См.табл 17.

Таблица 17. МикроРНК, уровни которых в ЦСЖ значимо отличались при сравнении больных ППРС и контрольной группы.

№	МикроРНК	log2FoldChange	padj
1	hsa-miR-5581-3p	30	1,54E-08
2	hsa-miR-6799-3p	27,2672266	1,62E-16
3	hsa-miR-10396a-5p	26,5233077	9,89E-11
4	hsa-miR-10396b-5p	26,5233077	9,89E-11
5	hsa-miR-1913	25,7977056	2,74E-27
6	hsa-miR-4685-3p	25,01024	0,0000016
7	hsa-miR-518f-3p	21,3447931	0,0002384
8	hsa-miR-6515-5p	18,4850538	0,0031956
9	hsa-miR-3614-5p	18,4222877	0,0031997
10	hsa-miR-6812-3p	15,8016626	0,0247131
11	hsa-miR-1283	15,2920534	0,0026839
12	hsa-miR-4758-5p	8,1532878	0,0235258
13	hsa-miR-3131	6,8127414	0,0126084
14	hsa-miR-4507	6,2016963	0,0446253
15	hsa-miR-150-5p	4,5907789	0,0000093
1	hsa-miR-9-5p	-2,6248923	0,0295416
2	hsa-miR-487b-3p	-4,7362794	0,0295416
3	hsa-miR-708-5p	-5,3503541	0,0360356
4	hsa-miR-219b-5p	-5,6040053	0,0295416

5	hsa-miR-935	-7,1563061	0,0235258
6	hsa-miR-409-3p	-7,3198792	0,0016369
7	hsa-miR-138-5p	-7,5445102	0,0000253
8	hsa-miR-429	-15,7898283	0,0000029
9	hsa-miR-656-3p	-21,1193476	5,81E-08
10	hsa-miR-6823-3p	-22,4901382	1,88E-11
11	hsa-miR-187-3p	-22,640659	2,10E-19
12	hsa-miR-12127	-24,1640014	0,0000124
13	hsa-miR-488-3p	-25,4117152	1,40E-29

3.2.3. 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, $FC-1 < \text{Log}_2\text{FC} > 1$ и $\text{padj} < 0.05$) (Рисунок 11).

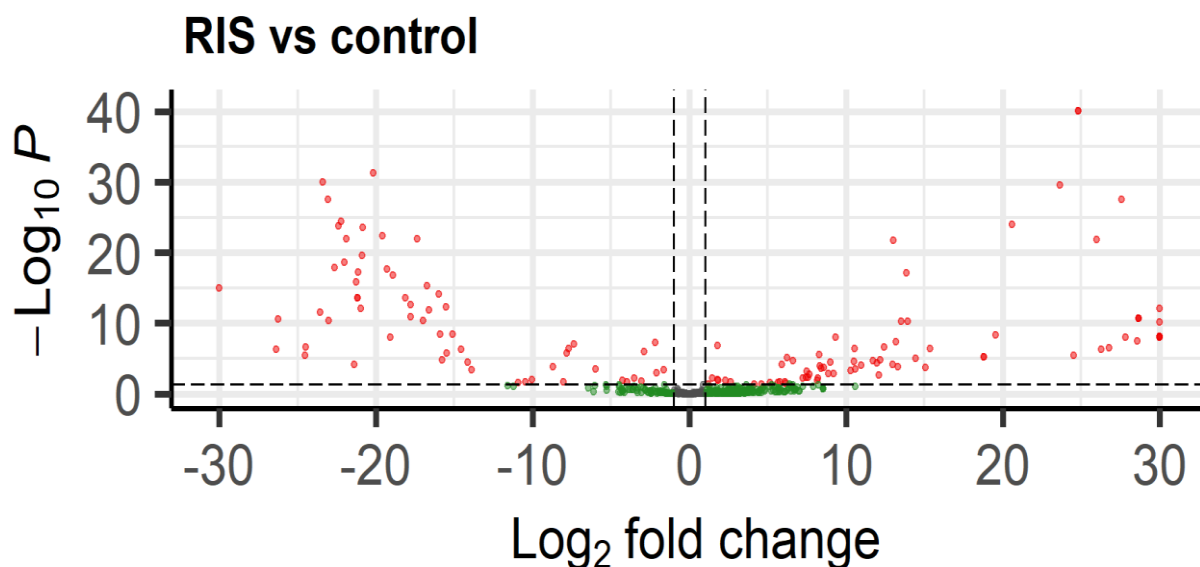


Рисунок 11.

Среди них экспрессия 75 микроРНК была повышена ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$), а 60 – понижена при РИС ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$). См.табл.18

Таблица 18. МикроРНК, уровни которых в ЦСЖ значительно отличались при сравнении лиц с РИС и контрольной группы.

№	МикроРНК	log2FoldChange	padj
1	hsa-miR-517a-3p	30	8,37E-41
2	hsa-miR-517b-3p	30	8,37E-41
3	hsa-miR-487b-3p	30	4,64E-32
4	hsa-miR-95-3p	30	9,67E-31
5	hsa-miR-516a-5p	30	2,93E-30
6	hsa-miR-130a-3p	30	2,60E-28
7	hsa-miR-522-3p	28,6819777	2,60E-28
8	hsa-miR-323a-3p	28,6819777	3,78E-25
9	hsa-miR-3131	28,6819777	9,02E-25
10	hsa-miR-195-5p	28,5838737	1,80E-24
11	hsa-miR-199a-5p	27,8287007	2,93E-24
12	hsa-miR-219b-5p	27,5651242	4,36E-23
13	hsa-miR-361-5p	26,7703445	9,92E-23
14	hsa-miR-30c-5p	26,302618	1,21E-22
15	hsa-miR-518c-3p	25,9856031	1,57E-22
16	hsa-miR-5189-3p	24,8083941	1,70E-22
17	hsa-miR-584-5p	24,8083941	2,42E-20
18	hsa-let-7a-3p	24,5379833	2,62E-19
19	hsa-miR-133a-3p	23,6645733	1,46E-18
20	hsa-miR-33a-5p	20,6051389	2,10E-18
21	hsa-miR-410-3p	19,5589435	5,70E-18
22	hsa-miR-1304-5p	18,7988879	7,23E-18

23	hsa-miR-153-3p	18,7988879	1,69E-17
24	hsa-miR-129-2-3p	15,3514823	1,56E-16
25	hsa-miR-382-5p	15,089344	5,01E-16
26	hsa-miR-130b-5p	14,4593873	1,10E-15
27	hsa-miR-222-3p	13,9271576	7,78E-15
28	hsa-miR-625-5p	13,8627385	2,33E-14
29	hsa-miR-219a-5p	13,5343127	2,36E-14
30	hsa-miR-219b-3p	13,3337137	2,36E-14
31	hsa-miR-497-5p	13,1703322	2,50E-13
32	hsa-miR-4787-3p	13,0025533	4,84E-13
33	hsa-miR-323b-3p	12,9674834	8,42E-13
34	hsa-miR-1283	12,4451872	8,72E-13
35	hsa-miR-154-5p	12,1674163	1,29E-12
36	hsa-miR-590-3p	12,1125068	3,25E-12
37	hsa-miR-187-3p	11,9678394	1,22E-11
38	hsa-miR-3689a-5p	11,7069156	2,12E-11
39	hsa-miR-3689b-5p	10,9584479	2,12E-11
40	hsa-miR-3689e	10,5857316	2,12E-11
41	hsa-miR-3195	10,544	2,57E-11
42	hsa-miR-532-3p	10,5252847	4,35E-11
43	hsa-miR-340-5p	10,3112964	4,35E-11
44	hsa-miR-4507	9,3244933	6,17E-11
45	hsa-miR-412-5p	9,2028334	6,17E-11
46	hsa-miR-6785-5p	9,0091536	7,80E-11

47	hsa-miR-376c-3p	8,8733079	3,68E-09
48	hsa-miR-338-5p	8,5919582	3,98E-09
49	hsa-miR-6799-3p	8,4150434	4,67E-09
50	hsa-miR-7158-5p	8,3315198	8,56E-09
51	hsa-miR-6790-3p	8,3028566	8,56E-09
52	hsa-miR-6782-5p	8,2142873	8,91E-09
53	hsa-miR-3149	8,1855017	9,16E-09
54	hsa-miR-8485	7,6800992	9,50E-09
55	hsa-miR-4755-5p	7,5604357	9,70E-09
56	hsa-miR-141-3p	7,5118658	1,11E-08
57	hsa-miR-3170	7,4357771	3,86E-08
58	hsa-miR-1304-3p	7,263448	4,49E-08
59	hsa-let-7d-3p	6,631531	5,47E-08
60	hsa-miR-5100	6,2285865	0,0000001
61	hsa-let-7a-5p	6,155963	0,0000002
62	hsa-miR-1284	6,1170423	0,0000002
63	hsa-miR-5689	5,921595	0,0000002
64	hsa-miR-510-5p	5,7871876	0,0000003
65	hsa-let-7b-3p	5,6750239	0,0000004
66	hsa-miR-3916	5,1629945	0,0000004
67	hsa-miR-518b	4,6106419	0,0000004
68	hsa-miR-3126-3p	4,1452029	0,0000005
69	hsa-miR-12127	2,6583949	0,0000005
70	hsa-miR-214-3p	2,2988559	0,0000006

71	hsa-miR-1260a	1,856274	0,000001
72	hsa-miR-29a-3p	1,8148367	0,0000018
73	hsa-miR-493-5p	1,7912505	0,000002
74	hsa-miR-664a-5p	1,4900609	0,000003
75	hsa-miR-6871-3p	1,225483	0,0000034
1	hsa-miR-1287-5p	-1,6058216	0,0000036
2	hsa-miR-10396a-5p	-2,0963001	0,000006
3	hsa-miR-10396b-5p	-2,1897498	0,000006
4	hsa-miR-6813-3p	-2,8690594	0,0000079
5	hsa-miR-520f-5p	-3,0382715	0,0000095
6	hsa-miR-6756-5p	-3,4919985	0,0000153
7	hsa-miR-23b-5p	-3,990239	0,0000159
8	hsa-miR-145-5p	-4,2538114	0,0000204
9	hsa-miR-519d-5p	-5,9851314	0,0000229
10	hsa-miR-1913	-7,3730098	0,0000307
11	hsa-miR-199b-5p	-7,6876253	0,0000331
12	hsa-miR-4454	-7,8293539	0,0000386
13	hsa-miR-383-3p	-8,0105012	0,0000456
14	hsa-miR-498-5p	-8,6890227	0,0000724
15	hsa-miR-3622b-5p	-10,038004	0,0000736
16	hsa-miR-574-5p	-10,4645424	0,0000736
17	hsa-miR-512-3p	-10,9064079	0,0000983
18	hsa-miR-3972	-13,8849278	0,0001165
19	hsa-miR-6823-3p	-14,156286	0,00015

20	hsa-miR-181c-5p	-14,5652763	0,000151
21	hsa-miR-4259	-15,0914653	0,0001816
22	hsa-miR-3978	-15,4760162	0,000191
23	hsa-miR-6728-5p	-15,5102683	0,0002674
24	hsa-miR-107	-15,7552082	0,0003421
25	hsa-miR-197-3p	-15,8934354	0,0003455
26	hsa-miR-10a-5p	-15,9919276	0,0003682
27	hsa-miR-6820-3p	-16,6218472	0,0004142
28	hsa-miR-5001-3p	-16,7427058	0,0005254
29	hsa-miR-631	-16,9678378	0,0006777
30	hsa-miR-1260b	-17,3650889	0,001091
31	hsa-miR-8060	-17,7608294	0,0013053
32	hsa-miR-214-5p	-17,7609225	0,0014431
33	hsa-miR-495-5p	-18,1110636	0,0018584
34	hsa-miR-4655-5p	-18,9026895	0,0022296
35	hsa-miR-6842-5p	-19,0941935	0,0047294
36	hsa-miR-365a-5p	-19,3052828	0,005211
37	hsa-miR-499b-3p	-19,5917324	0,0055844
38	hsa-miR-23a-3p	-20,1469011	0,0058318
39	hsa-miR-124-3p	-20,8187968	0,0062605
40	hsa-miR-324-5p	-20,88685	0,006581
41	hsa-miR-5088-3p	-20,9754932	0,0101886
42	hsa-let-7c-5p	-21,1355143	0,0102686
43	hsa-miR-941	-21,169754	0,0125946

44	hsa-let-7d-5p	-21,169754	0,0134678
45	hsa-miR-4695-3p	-21,2599522	0,0134678
46	hsa-let-7g-5p	-21,3871104	0,013983
47	hsa-miR-9-3p	-21,8793831	0,0183745
48	hsa-miR-376b-3p	-22,0130307	0,0199201
49	hsa-miR-656-3p	-22,2095847	0,0199201
50	hsa-miR-4667-3p	-22,3924352	0,0200738
51	hsa-miR-6865-5p	-22,637246	0,0200738
52	hsa-miR-433-3p	-23,0278586	0,0208315
53	hsa-miR-29c-3p	-23,0437523	0,022458
54	hsa-miR-6765-3p	-23,398228	0,0249244
55	hsa-miR-6752-3p	-23,5648008	0,0263092
56	hsa-miR-487a-5p	-24,4892247	0,0287779
57	hsa-miR-10392-3p	-24,5039394	0,0368391
58	hsa-let-7b-5p	-26,2164957	0,0406863
59	hsa-miR-4745-3p	-26,3455799	0,0412295
60	hsa-miR-6780b-3p	-29,9942586	0,045504

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

Ниже представлена таблица 19, иллюстрирующая общие микроРНК, выявленные при сопоставлении отличий между группами пациентов с РРС в стадии ремиссии, ППРС, РИС и контрольной группой.

Таблица 19. Общие микроРНК, выявленные при сопоставлении отличий между группами пациентов с РРС в стадии ремиссии, ППРС, РИС и контрольной группой.

Сравнение групп	Количество общих микроРНК, отличающихся 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. 12 ниже иллюстрирует 9 общих микроРНК для групп РРСремиссия, ППРС и РИС при сравнении с контрольной группой.

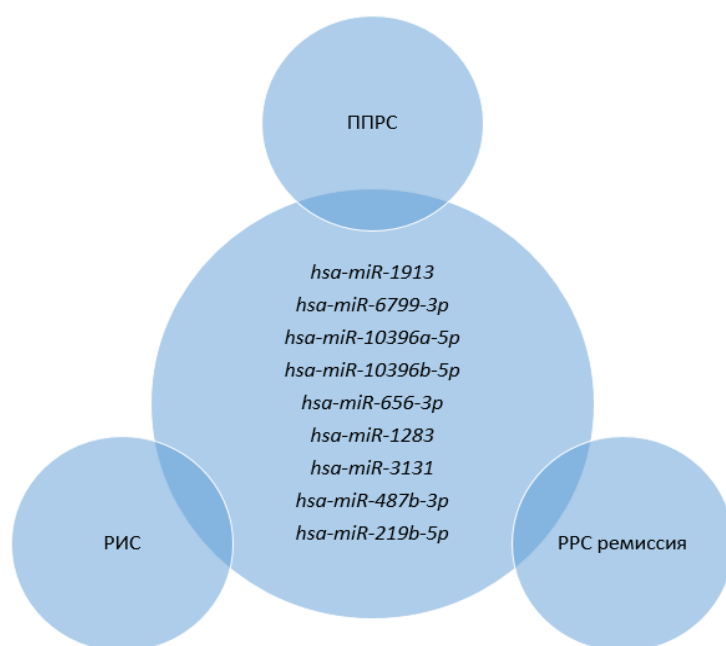


Рисунок 12. 9 общих микроРНК для групп РРСремиссия, ППРС и РИС при сравнении с контрольной группой.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. 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 олигодендроцитарному 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* [144]. Следует отметить, что бактерии *Acinetobacter* присутствуют на коже и в носовых пазухах человека [145].

Важное патогенетическое значение также имеет повышение уровня эндотоксина в ликворе пациентов с РС. В литературе выдвинута эндотоксиновая теория нейродегенерации [143], поскольку эндотоксин активизирует 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 [146]. 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 [147]. Было показано наличие грибковой инфекции в тканях ЦНС пациентов с РС [148]. 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 [4, 149].

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. [150].

4.2. 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 ($p_{adj} < 0.05$, 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 РСремиссия 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 РРСремиссия - 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 РРСремиссия, 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 РРСремиссия, 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. GBD 2016 Multiple Sclerosis Collaborators. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019 Mar;18(3):269-85. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30443-5. Epub 2019 Jan 21.
2. Boziki MK, Kesidou E, Theotokis P, Mentis AA, Karafoulidou E, Melnikov V, Sviridova A, Rogovski V, Boyko A, Grigoriadis N. Microbiome in MS; where are we, what we know and do not know. *Brain Science* 2020 Apr 14; 10(4). pii: E234. doi: 10.3390/brainsci10040234
3. Wang HH, Sun DW, Kuang R. Inhibition of *Escherichia coli* by dimethyl fumarate. *Int J Food Microbiol.* 2001; 65 (1-2): 125-130. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00504-3
4. Ma N, Wu Y, Xie F, Du K, Wang Y, Shi L, Ji L, Liu T, Ma X. Dimethyl fumarate reduces the risk of mycotoxins via improving intestinal barrier and microbiota. *Oncotarget.* 2017;8(27):44625-44638. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17886>
5. Alonso R, Fernández-Fernández AM, Pisa D, Carrasco L. Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. *Neurobiol Dis.* 2018; 117: 42-61. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.05.022
6. Zhao Y, Jaber V, Alexandrov PN, Vergallo A, Lista S, Hampel H, Lukiw WJ. microRNA-Based Biomarkers in Alzheimer's Disease (AD). *Front Neurosci.* 2020 Oct 30;14:585432. doi: 10.3389/fnins.2020.585432.
7. Kopkova A, Sana J, Machackova T, Vecera M, Radova L, Trachtova K, Vybihal V, Smrcka M, Kazda T, Slaby O, Fadrus P. Cerebrospinal Fluid MicroRNA Signatures as Diagnostic Biomarkers in Brain Tumors. *Cancers (Basel).* 2019 Oct 12;11(10):1546. doi: 10.3390/cancers11101546.
8. Fejes Z, Erdei J, Pócsi M, Takai J, Jeney V, Nagy A, Varga A, Bácsi A, Bognár L, Novák L, Kappelmayer J, Nagy B Jr. Elevated Pro-Inflammatory Cell-Free MicroRNA Levels in Cerebrospinal Fluid of Premature Infants after Intraventricular Hemorrhage. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 19;21(18):6870. doi: 10.3390/ijms21186870

9. Haghighi A, Haghighi A, Hellwig K, Baraniskin A, Holzmann A, Décard BF, Thum T, Gold R. Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology*. 2012 Nov 27;79(22):2166-70. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182759621
10. Bergman P, Piket E, Khademi M, James T, Brundin L, Olsson T, Piehl F, Jagodic M. Circulating miR-150 in CSF is a novel candidate biomarker for multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016 Apr 20;3(3):e219. doi: 10.1212/NXI.0000000000000219
11. Quintana E, Ortega FJ, Robles-Cedeño R, Villar ML, Buxó M, Mercader JM, Alvarez-Cermeño JC, Pueyo N, Perkal H, Fernández-Real JM, Ramió-Torrentà L. miRNAs in cerebrospinal fluid identify patients with MS and specifically those with lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler*. 2017 Nov;23(13):1716-1726. doi: 10.1177/1352458516684213
12. Muñoz-San Martín M, Reverter G, Robles-Cedeño R, Buxó M, Ortega FJ, Gómez I, Tomàs-Roig J, Celarain N, Villar LM, Perkal H, Fernández-Real JM, Quintana E, Ramió-Torrentà L. Analysis of miRNA signatures in CSF identifies upregulation of miR-21 and miR-146a/b in patients with multiple sclerosis and active lesions. *J Neuroinflammation*. 2019 Nov 14;16(1):220. doi: 10.1186/s12974-019-1590-5.
13. Perdaens O, Dang HA, D'Auria L, van Pesch V. CSF microRNAs discriminate MS activity and share similarity to other neuroinflammatory disorders. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020 Feb 7;7(2):e673. doi: 10.1212/NXI.0000000000000673.
14. Cree BAC, Arnold DL, Chataway J, Chitnis T, Fox RJ, Pozo Ramajo A, Murphy N, Lassmann H. Secondary Progressive Multiple Sclerosis: New Insights. *Neurology*. 2021 Aug 24;97(8):378-388. doi: 10.1212/WNL.00000000000012323
15. Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*. 2009 Dec 8;73(23):1996-2002. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c5b47f.

- 16.Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H; UBC MS Clinic Neurologists. The natural history of secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Sep;81(9):1039-43. doi: 10.1136/jnnp.2010.208173
- 17.Filippi M. [и др.]. Multiple sclerosis. // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2018. T. 1. № 4. C. 43
- 18.Toubi E., Vadasz Z. Innate immune-responses and their role in driving autoimmunity // *Autoimmun. Rev.* 2019. T. 3. № 18. C. 306–311
- 19.Baranzini S.E., Hauser S.L. Large-scale gene-expression studies and the challenge of multiple sclerosis. // *Genome Biol.* 2002. T. 10. № 3. C. reviews1027
- 20.Dendrou C.A., Fugger L., Friese M.A. Immunopathology of multiple sclerosis // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. T. 9. № 15. C. 545–558.
- 21.Ciccarelli O. Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. // *Lancet. Neurol.* 2014. T. 8. № 13. C. 807–22.
- 22.Thompson A.J. Multiple sclerosis // *Lancet.* 2018. T. 10130. № 391. C. 1622–1636.
- 23.McMahon E.J. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. // *Nat. Med.* 2005. T. 3. № 11. C. 335–9.
- 24.Howell O.W. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis // *Brain.* 2011. T. 9. № 134. C. 2755–2771.
- 25.Selzer R.C., Hemmer B. Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis. // *ImmunoTargets Ther.* 2013. T. № 2. C. 21–30.
- 26.Rangachari M. Editorial: Lymphocytes in MS and EAE: More Than Just a CD4+ World // *Front. Immunol.* 2017. T. № 8. C. 133.
- 27.Claes N. B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions // *Front. Immunol.* 2015. T. № 6. C. 642.
- 28.Filippi M. Multiple sclerosis. // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2018. T. 1. № 4. C. 43.
- 29.Olsson T., Barcellos L.F., Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. // *Nat. Rev. Neurol.* 2017. T. 1. № 13. C. 25–36.
- 30.Zheleznyakova G.Y. Epigenetic research in multiple sclerosis: progress, challenges, and opportunities // *Physiol. Genomics.* 2017. T. 9. № 49. C. 447–461.

- 31.Sawcer S., Franklin R.J.M., Ban M. Multiple sclerosis genetics. // *Lancet. Neurol.* 2014. Т. 7. № 13. С. 700–9.
- 32.Baranzini S.E., Oksenberg J.R. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. // *Trends Genet.* 2017. Т. 12. № 33. С. 960–970
- 33.Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J.* Apr-Jun 2017;19(1):1-10. doi: 10.22074/cellj.2016.4867. Epub 2016 Dec 21.
- 34.Кожиева М.Х., Мельников М.В., Роговский В.С., Олескин А.В., Кабилов М.Р., Бойко А.Н. Кишечная микробиота человека и рассеянный склероз. *Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова.*2017; 117 (10 2): 11 19. <https://doi.org/10.17116/jnevro201711710211-19> [Kozhieva MK, Melnikov MV, Rogovsky VS, Oleskin AV, Kabilov MR, Boyko AN. [Gut human microbiota and multiple sclerosis]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2017; 117(10-2): 11-19. doi: 10.17116/jnevro201711710211-19] (in Russian)
- 35.Reynders T, Devolder L, Valles-Colomer M, et al. Gut microbiome variation is associated to Multiple Sclerosis phenotypic subtypes. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020 Apr;7(4):406-19. doi: 10.1002/acn3.51004. Epub 2020 Mar 12.
- 36.Yan W, Sun C, Zheng J, et al. Efficacy of Fecal Sampling as a Gut Proxy in the Study of Chicken Gut Microbiota. *Front Microbiol.* 2019 Sep 13;10:2126. doi: 10.3389/fmicb.2019.02126. eCollection 2019.
- 37.Osipov GA, Verkhovtseva NV. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers. *Benef Microbes.* 2011 Mar;2(1):63-78. doi: 10.3920/BM2010.0017.
- 38.Ktsoyan ZA, Beloborodova NV, Sedrakyan AM, et al. Profiles of Microbial Fatty Acids in the Human Metabolome are Disease-Specific. *Front Microbiol.* 2011 Jan 20;1:148. doi: 10.3389/fmicb.2010.00148. eCollection 2010.
- 39.Zhou X, Baumann R, Gao X, Mendoza M, Singh S, Katz IS, Xia Z, Cox LM, Chitnis T, Yoon H, Moles L, Caillier SJ, Santaniello A, Ackermann G, Harroud A, Lincoln R, Gomez R, González Peña A, Digga E, Hakim DJ, Vazquez-Baeza Y, Soman K, Warto S, Humphrey G, Farez M, Gerdes LA, Oksenberg JR, Zamvil SS, Chandran

- S, Connick P, Otaegui D, Castillo-Triviño T, Hauser SL, Gelfand JM, Weiner H L, Hohlfeld R, Wekerle H, Graves J, Bar-Or A, Cree BAC, Correale J, Knight R, Baranzini SE. Gut microbiome of multiple sclerosis patients and paired household healthy controls reveal associations with disease risk and course. *Cell*. 2022; 185 (19): 3467-3486. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.08.021>
40. Thirion F, Sellebjerg F, Fan Y, Lyu L, Hansen TH, Pons N, Levenez F, Quinquis B, Stankevic E, Søndergaard HB, Dantoft TA, Poulsen CS, Forslund SK, Vestergaard H, Hansen T, Brix S, Oturai A, Per Sørensen S, Ehrlich SD, Pedersen O. The gut microbiota in multiple sclerosis varies with disease activity. *Genome Medicine*. 2023; 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01148-1>
41. Castillo-Álvarez F, Marzo-Sola ME. Role of the gut microbiota in the development of various neurological diseases *Neurología*. 2022; 37 (6): 492-498. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2019.03.017>
42. Castillo-Álvarez F, Pérez-Matute P, Oteo JA, Marzo-Sola ME. The influence of interferon β -1b on gut microbiota composition in patients with multiple sclerosis *Neurología*. 2021; 36 (7): 495-503. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.04.006>
43. Ntranos A, Hye-Jin P, Wentling M, Tolstikov V, Amatruda M, Inbar B, Kim-Schulze S, Frazier C, Button J, Kiebish MA, Lublin F, Edwards K, Casaccia P. Bacterial neurotoxic metabolites in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and plasma. *Brain*. 2022; 145 (2): 569–583. <https://doi.org/10.1093/brain/awab320>
44. Boussamet, Léo, Rajoka MSR, Berthelot L. Microbiota, IgA and Multiple Sclerosis. *Microorganisms*. 2022;10(3):617. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030617>
45. Telalovic JH, Music A. Using data science for medical decision making case: role of gut microbiome in multiple sclerosis. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. 2020; 20: 262. <https://doi.org/10.1186/s12911-020-01263-2>
46. Gibb E.A., Brown C.J., Lam W.L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas // *Molecular Cancer*. 2011.
47. Costa F.F. Non-coding RNAs: Meet thy masters // *BioEssays*. 2010.], [Dunham I. [и др.]. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome // *Nature*. 2012.

48. Brosnan C.A., Voinnet O. The long and the short of noncoding RNAs. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009. T. 3. № 21. C. 416–25.
49. Li L. Long Non-coding RNA in Neuronal Development and Neurological Disorders // *Front. Genet.* 2019. T. № 9.
50. Dahl M., Kristensen L.S., Grønbæk K. Long Non-Coding RNAs Guide the Fine-Tuning of Gene Regulation in B-Cell Development and Malignancy. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. T. 9. № 19. C. 2475.
51. Lin Y.-H. Long Non-Coding RNAs as Mediators of Tumor Microenvironment and Liver Cancer Cell Communication. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. T. 12. № 19. C. 3742.
52. Xu F. Long noncoding RNAs in autoimmune diseases // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2019. T. 2. № 107. C. 468–475.
53. Dana H. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. // *Int. J. Biomed. Sci.* 2017. T. 2. № 13. C. 48–57.
54. Ozata D.M. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. // *Nat. Rev. Genet.* 2019. T. 2. № 20. C. 89–108.
55. Reinhart B.J. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. // *Nature*. 2000. T. 6772. № 403. C. 901–6.
56. Kamanu T.K.K. Exploration of miRNA families for hypotheses generation. // *Sci. Rep.* 2013. T. 1. № 3. C. 2940
57. Eulalio A., Mano M. MicroRNA Screening and the Quest for Biologically Relevant Targets. // *J. Biomol. Screen.* 2015. T. 8. № 20. C. 1003–17
58. Meunier J. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. // *Genome Res.* 2013. T. 1. № 23. C. 34–45.
59. Olena A.F., Patton J.G. Genomic organization of microRNAs. // *J. Cell. Physiol.* 2010. T. 3. № 222. C. 540–5.
60. Baulina N.M., Kulakova O.G., Favorova O.O. MicroRNAs: The Role in Autoimmune Inflammation. // *Acta Naturae*. T. 1. № 8. C. 21–33.
61. Treiber T., Treiber N., Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. T. 1. № 20. C. 5–20.

- 62.Daugaard I., Hansen T.B. Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs. // Trends Genet. 2017. T. 3. № 33. C. 208–219.
- 63.Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014. T. 8. № 15. C. 509–24.
- 64.O'Brien J. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2018. T. № 9. C. 402.
- 65.Forman J.J., Legesse-Miller A., Collier H.A. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. T. 39. № 105. C. 14879–84.
- 66.Dharap A. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. // PLoS One. 2013. T. 11. № 8. C. e79467.
- 67.Jo M.H. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. // Mol. Cell. 2015. T. 1. № 59. C. 117–24.
- 68.Jonas S., Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing // Nat. Rev. Genet. 2015. T. 7. № 16. C. 421–433.
- 69.Sacco L. Da, Masotti A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of microRNAs binding to 5' untranslated region. // Int. J. Mol. Sci. 2012. T. 1. № 14. C. 480–95.
- 70.Liu J. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. // Nat. Cell Biol. 2005. T. 7. № 7. C. 719–23
- 71.Valinezhad Orang A., Safaralizadeh R., Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation // Int. J. Genomics. 2014. T. № 2014. C. 1–15.
- 72.Arroyo J.D. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. T. 12. № 108. C. 5003–8.
- 73.Turchinovich A. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? // Front. Genet. 2013. T. № 4. C. 119
- 74.Iftikhar H., Carney G.E. Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs: From expression profiling to functional testing: Potential roles of

- extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. // *Bioessays*. 2016. T. 4. № 38. C. 367–78.
75. Rie D. de. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. // *Nat. Biotechnol.* 2017. T. 9. № 35. C. 872–878.
 76. Lai X., Wolkenhauer O., Vera J. Understanding microRNA-mediated gene regulatory networks through mathematical modelling. // *Nucleic Acids Res.* 2016. T. 13. № 44. C. 6019–35
 77. Zhang J. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. // *RNA Biol.* 2011. T. 5. № 8. C. 829–38.
 78. Schmiedel J.M. Gene expression. MicroRNA control of protein expression noise. // *Science*. 2015. T. 6230. № 348. C. 128–32.
 79. Makarova J.A. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role // *Prog. Histochem. Cytochem.* 2016. T. 3–4. № 51. C. 33–49.
 80. Denzler R. Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression. // *Mol. Cell.* 2016. T. 3. № 64. C. 565–579.
 81. Chou C.-H. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. // *Nucleic Acids Res.* 2018. T. D1. № 46. C. D296–D302.
 82. Kucherenko M.M., Shcherbata H.R. miRNA targeting and alternative splicing in the stress response - events hosted by membrane-less compartments. // *J. Cell Sci.* 2018. T. 4. № 131. C. jcs202002.
 83. Wang K. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. // *Nucleic Acids Res.* 2010. T. 20. № 38. C. 7248–59.
 84. Leung A.K.L., Calabrese J.M., Sharp P.A. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. T. 48. № 103. C. 18125–30
 85. Protter D.S.W., Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. // *Trends Cell Biol.* 2016. T. 9. № 26. C. 668–679

- 86.Ivey K.N., Srivastava D. microRNAs as Developmental Regulators. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. T. 7. № 7. C. a008144
- 87.Hwang H.-W., Mendell J.T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. // Br. J. Cancer. 2006. T. 6. № 94. C. 776–800
- 88.Song L., Tuan R.S. MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. // Birth Defects Res. C. Embryo Today. 2006. T. 2. № 78. C. 140–9.
- 89.Subramanian S., Steer C.J. MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. // J. Cell. Physiol. 2010. T. 2. № 223. C. 289–98.
90. Smith-Vikos T., Slack F.J. MicroRNAs and their roles in aging. // J. Cell Sci. 2012. T. Pt 1. № 125. C. 7–17
- 91.Momen-Heravi F., Bala S. miRNA regulation of innate immunity // J. Leukoc. Biol. 2018. T. 6. № 103. C. 1205–1217
- 92.Inui M., Martello G., Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. T. 4. № 11. C. 252–263
93. Vienberg S. MicroRNAs in metabolism. // Acta Physiol. (Oxf). 2017. T. 2. № 219. C. 346–361.
- 94.Peng Y., Croce C.M. The role of MicroRNAs in human cancer. // Signal Transduct. Target. Ther. 2016. T. 1. № 1. C. 15004.
- 95.Zhou S.-S. miRNAS in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. // Acta Pharmacol. Sin. 2018. T. 7. № 39. C. 1073–1084.
- 96.Viswambharan V. miRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders. // Biomark. Med. 2017. T. 2. № 11. C. 151–167
- 97.Du C. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. // Nat. Immunol. 2009. T. 12. № 10. C. 1252–9.
- 98.Hu R. MicroRNA-155 confers encephalogenic potential to Th17 cells by promoting effector gene expression. // J. Immunol. 2013. T. 12. № 190. C. 5972–80.
- 99.O’Connell R.M. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. // Immunity. 2010. T. 4. № 33. C. 607–19

100. Zhang J. MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. // J. Neuroimmunol. 2014. T. 1–2. № 266. C. 56–63
101. Escobar T.M. miR-155 Activates Cytokine Gene Expression in Th17 Cells by Regulating the DNA-Binding Protein Jarid2 to Relieve Polycomb-Mediated Repression // Immunity. 2014. T. 6. № 40. C. 865–879
102. Liu Q. MicroRNA-590 promotes pathogenic Th17 cell differentiation through targeting Tob1 and is associated with multiple sclerosis. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. T. 2. № 493. C. 901–908
103. Wu R. MicroRNA-448 promotes multiple sclerosis development through induction of Th17 response through targeting protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 (PTPN2). // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. T. 3. № 486. C. 759–766
104. Guan H. MicroRNA let-7e is associated with the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. // Eur. J. Immunol. 2013. T. 1. № 43. C. 104–14
105. Ahmadian-Elmi M. miR-27a and miR-214 exert opposite regulatory roles in Th17 differentiation via mediating different signaling pathways in peripheral blood CD4+ T lymphocytes of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. // Immunogenetics. 2016. T. 1. № 68. C. 43–54.
106. Yang X. Noncoding RNAs in multiple sclerosis. // Clin. Epigenetics. 2018. T. 1. № 10. C. 149
107. Guerau-de-Arellano M. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. // Brain. 2011. T. Pt 12. № 134. C. 3578–89
108. Aung L.L. MMP-9 expression is increased in B lymphocytes during multiple sclerosis exacerbation and is regulated by microRNA-320a. // J. Neuroimmunol. 2015. T. № 278. C. 185–9
109. Sievers C. Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis: towards a better understanding of treatment effects. // Clin. Immunol. 2012. T. 1. № 144. C. 70–9

110. Miyazaki Y. A novel microRNA-132-sirtuin-1 axis underlies aberrant B-cell cytokine regulation in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis [corrected]. // PLoS One. 2014. T. 8. № 9. C. e105421
111. Moore C.S. miR-155 as a multiple sclerosis-relevant regulator of myeloid cell polarization. // Ann. Neurol. 2013. T. 5. № 74. C. 709–20
112. Ponomarev E.D. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. // Nat. Med. 2011. T. 1. № 17. C. 64–70
113. Luo D., Fu J. Identifying characteristic miRNAs-genes and risk pathways of multiple sclerosis based on bioinformatics analysis. // Oncotarget. 2018. T. 4. № 9. C. 5287–5300
114. Junker A. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. // Brain. 2009. T. Pt 12. № 132. C. 3342–52
115. Dugas J.C. Dicer1 and miR-219 Are Required for Normal Oligodendrocyte Differentiation and Myelination // Neuron. 2010. T. 5. № 65. C. 597–611
116. Lindberg R.L.P. Altered expression of miR-17-5p in CD4⁺ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. // Eur. J. Immunol. 2010. T. 3. № 40. C. 888–98.
117. Lin S.-T., Fu Y.-H. miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. // Dis. Model. Mech. 2009. T. 3–4. № 2. C. 178–88
118. Friess J. Fingolimod alters the transcriptome profile of circulating CD4⁺ cells in multiple sclerosis. // Sci. Rep. 2017. T. 1. № 7. C. 42087.
119. Hecker M. MicroRNA expression changes during interferon-beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. // Int. J. Mol. Sci. 2013. T. 8. № 14. C. 16087–110.
120. Waschbisch A. Glatiramer Acetate Treatment Normalizes Deregulated microRNA Expression in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis // PLoS One. 2011. T. 9. № 6. C. e24604

121. Kramer S, Haghikia A, Bang C, Scherf K, Pfanne A, Duscha A, Kaisler J, Gisevius B, Gold R, Thum T, Haghikia A. Elevated levels of miR-181c and miR-633 in the CSF of patients with MS: A validation study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2019 Oct 1;6(6):e623. doi: 10.1212/NXI.0000000000000623
122. Bruinsma IB, van Dijk M, Bridel C, van de Lisdonk T, Haverkort SQ, Runia TF, Steinman L, Hintzen RQ, Killestein J, Verbeek MM, Teunissen CE, de Jong BA. Regulator of oligodendrocyte maturation, miR-219, a potential biomarker for MS. *J Neuroinflammation.* 2017 Dec 4;14(1):235. doi: 10.1186/s12974-017-1006-3
123. Ahlbrecht J, Martino F, Pul R, Skripuletz T, Sühs KW, Schauerte C, Yildiz Ö, Trebst C, Tasto L, Thum S, Pfanne A, Roesler R, Lauda F, Hecker M, Zettl UK, Tumani H, Thum T, Stangel M. Deregulation of microRNA-181c in cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome is associated with early conversion to relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2016 Aug;22(9):1202-14. doi: 10.1177/1352458515613641
124. Muñoz-San Martín M, Torras S, Robles-Cedeño R, Buxó M, Gomez I, Matute-Blanch C, Comabella M, Villar LM, Perkal H, Quintana E, Ramió-Torrentà L. Epigenomics. Radiologically isolated syndrome: targeting miRNAs as prognostic biomarkers. *Future Medicine.* 2020 Dec;12(23):2065-2076. doi: 10.2217/epi-2020-0172
125. De Vito F, Musella A, Freseigna D, Rizzo FR, Gentile A, Stampanoni Bassi M, Gilio L, Buttari F, Procaccini C, Colamatteo A, Bullitta S, Guadalupi L, Caioli S, Vanni V, Balletta S, Sanna K, Bruno A, Dolcetti E, Furlan R, Finardi A, Licursi V, Drulovic J, Pekmezovic T, Fusco C, Bruzzaniti S, Hornstein E, Uccelli A, Salvetti M, Matarese G, Centonze D, Mandolesi G. MiR-142-3p regulates synaptopathy-driven disease progression in multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022 Feb;48(2):e12765. doi: 10.1111/nan.12765
126. Muñoz-San Martín M, Reverter G, Robles-Cedeño R, Buxó M, Ortega FJ, Gómez I, Tomàs-Roig J, Celarain N, Villar LM, Perkal H, Fernández-Real JM, Quintana E, Ramió-Torrentà L. Analysis of miRNA signatures in CSF identifies upregulation of miR-21 and miR-146a/b in patients with multiple sclerosis and

- active lesions. *J Neuroinflammation*. 2019 Nov 14;16(1):220. doi: 10.1186/s12974-019-1590-5
127. Mandolesi G, Rizzo FR, Balletta S, Stampanoni Bassi M, Gilio L, Guadalupi L, Nencini M, Moscatelli A, Ryan CP, Licursi V, Dolcetti E, Musella A, Gentile A, Freseigna D, Bullitta S, Caioli S, Vanni V, Sanna K, Bruno A, Buttari F, Castelli C, Presutti C, De Santa F, Finardi A, Furlan R, Centonze D, De Vito F. The microRNA let-7b-5p Is Negatively Associated with Inflammation and Disease Severity in Multiple Sclerosis. *Cells*. 2021 Feb 5;10(2):330. doi:10.3390/cells10020330
 128. Lusardi TA, Phillips JI, Wiedrick JT, Harrington CA, Lind B, Lapidus JA, Quinn JF, Saugstad JA. MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;55(3):1223-1233. doi: 10.3233/JAD-160835. PMID: 27814298; PMCID: PMC5587208
 129. Turchinovich A, Cho WC. The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids. *Front Genet*. 2014 Feb 12;5:30. doi: 10.3389/fgene.2014.00030.
 130. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011 Apr;13(4):423-33. doi: 10.1038/ncb2210. Epub 2011 Mar 20.
 131. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012;22(3):125–132.
 132. Momen-Heravi F, Saha B, Kodys K, Catalano D, Satishchandran A, Szabo G. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J Transl Med*. 2015 Aug 12;13:261. doi: 10.1186/s12967-015-0623-9.
 133. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. В кн.: Химический анализ в медицинской диагностике. Москва: Наука; 2010. (Osipov GA. Chromato-mass spectrometric analysis of microorganisms and communities in clinical samples for infections and dysbiosis.

- In: *Khimicheskiy analiz v meditsinskoy diagnostike* [Chemical analysis in medical diagnostics]. Moscow: Nauka; 2010) (In Russ.)
134. Yang Y, Misra BB, Liang L. Integrated microbiome and metabolome analysis reveals a novel interplay between commensal bacteria and metabolites in colorectal cancer. *Theranostics*. 2019 May 31;9(14):4101-14. doi: 10.7150/thno.35186. eCollection 2019.
135. Osipov GA, Boiko NB, Fedosova NF, et al. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces. *Microb Ecol Health Dis*. 2009;21(3-4):159-71
136. Баранов ВМ, Осипов ГА, Мухамедиева ЛН. Оценка микроэкологического статуса человека методом хроматомасс-спектрометрии. Новая медицинская технология МЗ РФ No НЮ-40006. 2009. [Baranov VM, Osipov GA, Mukhamediyeva LN. Otsenka mikroekologicheskogo statusa cheloveka metodom khromatomass-spektrometrii. Novaya meditsinskaya tekhnologiya MZ RF No NYU-40006. 2009] [Assessment of the microecological status of a person by chromatomass spectrometry. New medical technology of the Ministry of Health of the Russian Federation No. NYU-40006. 2009] (In Russ.)
137. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, Garcia MU, Di Tommaso P, Nahnsen S. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol*. 2020 Mar;38(3):276-278. doi: 10.1038/s41587-020-0439-x.
138. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function // *Nucleic Acids Res*. 2019. T. D1. № 47. C. D155–D162.
139. Ben Langmead, Cole Trapnell, Mihai Pop, Steven L Salzberg. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25
140. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. // *Bioinformatics*. 2010. T. 1. № 26. C. 139–40.

141. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing // *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 1995. T. 57. 289–300 c.
142. Goldfine H. Plasmalogens in bacteria, sixty years on. *Front Mol Biosci*. 2022; 9: 962757. doi: 10.3389/fmolb.2022.962757
143. Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2019; 16 (1): 180. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1564-7>
144. Hughes LE, Smith PA, Bonell S, Natt RS, Wilson C, Rashid T, Amor S, Thompson EJ, Croker J, Ebringer A.. Cross-reactivity between related sequences found in *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003; 144 (1-2): 105-115. DOI: 10.1016/s0165-5728(03)00274-1
145. Ebringer A, Rashid T, Wilson C. The role of *Acinetobacter* in the pathogenesis of multiple sclerosis examined by using Popper sequences. *Med Hypotheses*. 2012; 78 (6): 763-769. DOI: 10.1016/j.mehy.2012.02.026
146. Barro C, Paul A, Saleh F, Chitnis T, Weiner HL. Validation of Two Kinetic Assays for the Quantification of Endotoxin in Human Serum. *Front Neurol*. 2021; 12: 691683. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.691683>
147. Mangalam AK. Fungal microbiome and multiple sclerosis: The not-so-new kid on the block. *EBioMedicine*. 2021; 72: 103621. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103621>
148. Alonso R, Fernández-Fernández AM, Pisa D, Carrasco L. Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. *Neurobiol Dis*. 2018; 117: 42-61. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.05.022
149. Wang HH, Sun DW, Kuang R. Inhibition of *Escherichia coli* by dimethyl fumarate. *Int J Food Microbiol*. 2001; 65 (1-2): 125-130. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00504-3
150. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A.. Longitudinal analysis reveals

high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022; 375 (6578): 296-301. DOI: 10.1126/science.abj8222

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Клинический пример 1.

Пациентка П, 49 лет, страдает первично-прогрессирующим РС.

Поступила с жалобами на головокружение, чувство слабости, периодическое чувство скованности в правой ноге, шаткость при ходьбе.

Из анамнеза известно, что впервые ухудшение отметила в 2019 году, когда на несколько недель ослабла правая нога. Через несколько недель сила в ноге выросла, однако сохранялось чувство скованности в ней. Вскоре в течение нескольких месяцев отмечала появление и нарастание выраженности головокружения, шаткости при ходьбе. 02.02.2021 отметила усиление головокружения (сопровождалось тошнотой, была однократная рвота). 03.02.2021 проведена МРТ, выявлены признаки многоочагового поражения головного мозга. Также отмечает, что в 2013 г. была проведена МРТ головного мозга, где также были выявлены очаговые изменения.

Из общесоматического анамнеза: Хроническая железодефицитная анемия, дегенеративные изменения шейного и поясничного отделов позвоночника.

Неврологический статус: сознание ясное. Контакт в полном объеме. Ориентировка в месте, времени и собственной личности сохранена. Эмоциональный фон лабильный. Общемозговая и менингеальная симптоматика: отсутствует. Обоняние не нарушено. Зрение не снижено, поля зрения ориентировочно сохранены. Зрачки округлой формы, средней величины (2-3 мм), глазные щели S=D, анизокории, диплопии нет. Реакция на аккомодацию сохранена. Реакция на свет живая. Конвергенция достаточная. Движения глазных яблок в полном объеме. Нистагм в крайних отведениях. Болезненности в точках выхода ветвей тройничного нерва нет. Чувствительность на лице не нарушена. Функция жевательных мышц сохранена. Корнеальный рефлекс сохранен. Асимметрии лица нет. Слух не снижен. Глотание, речь не нарушены. Язык по средней линии. Парезов нет. Мышечный тонус несколько повышен в правой ноге. Сухожильные и периостальные рефлексы с рук средней живости без четкой разницы сторон, с

ног оживлены, D>S. Патологических стопных знаков нет. Пальце-носовую пробу справа выполняет с дисметрией, слева удовлетворительно. Пяточно-коленную пробу выполняет удовлетворительно. При пробе Ромберга пошатывается. Убедительных данных за нарушение чувствительности не получено. Нарушение функции тазовых органов отрицает. EDSS 2,0 балла.

При дообследовании: в общем анализе ликвора без особенностей.

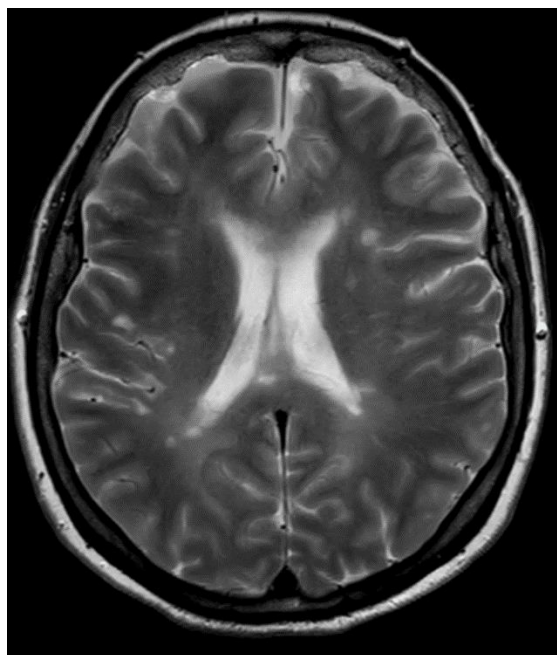
Анализ ликвора на олигоклональные IgG от 20.02.2021 - выявлен 2 тип синтеза олигоклональных IgG.

ЗВП от 20.02.2021. Заключение: По данным ЗВП РШП (средний и мелкий размер клетки) выявлены признаки нарушения проведения зрительной афферентации в кору по аксонально-демиелинизирующему типу с двух сторон, с преобладанием на прехиазмальном уровне слева.

MPT головного мозга и шейно-грудного отдела спинного мозга от 24.02.2021.

Заключение: МР-картина множественных очагов в веществе спинного мозга, вероятнее, демиелинизирующего характера, без признаков накопления контрастного препарата.

Рисунок 13. МР-томограммы пациента с ППРС в режиме T2; головной мозг (А), шейный отдел спинного мозга (Б).



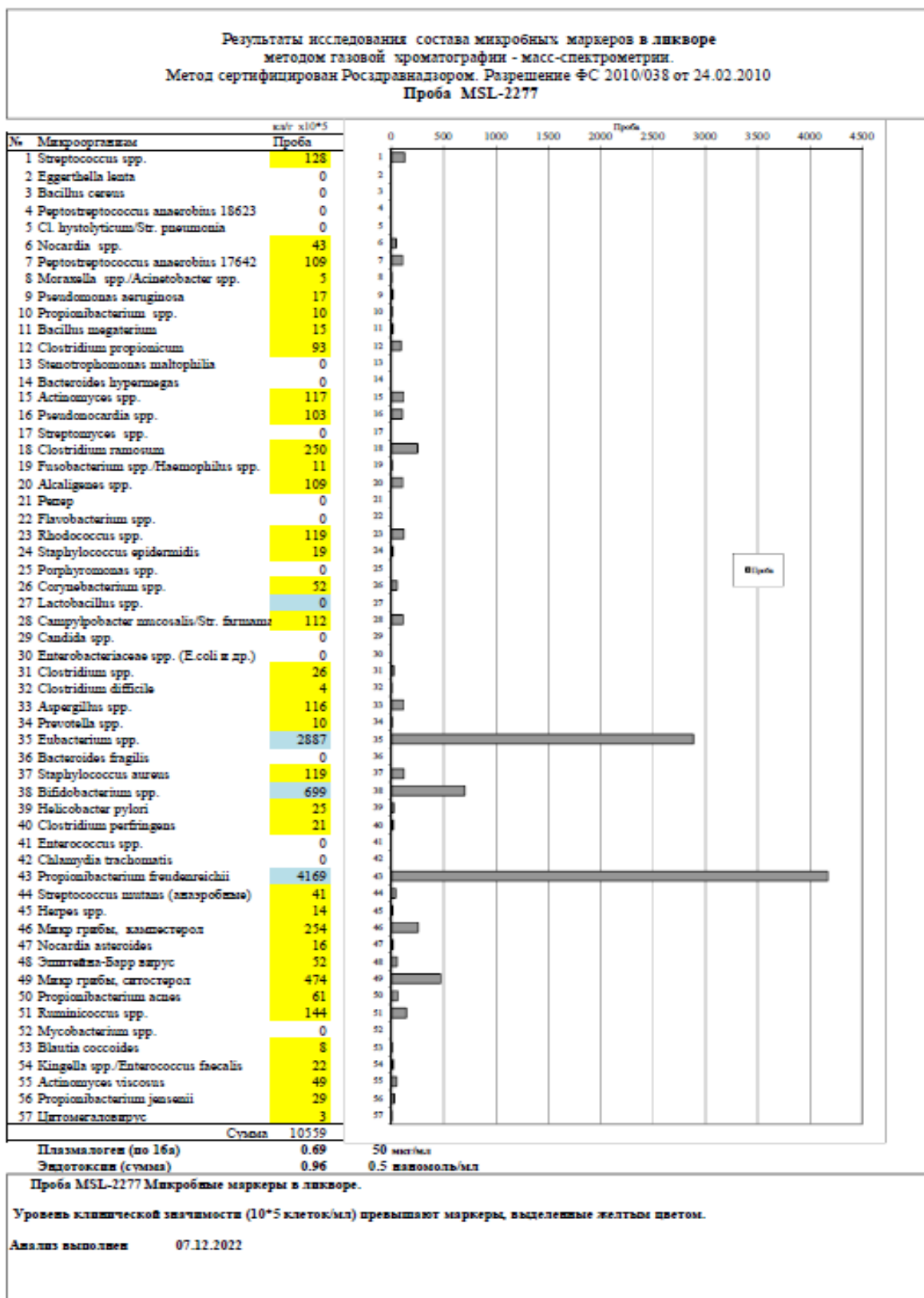
А



Б

Пациентке была рекомендована терапия окрелизумабом.

Результат анализа ликвора данной пациентки на наличие микробных маркеров представлен на рисунке 14:



Отмечается повышение нормофлоры.

Приложение 2. Клинический пример 2.

Пациентка Л, 30 лет, страдает РИС.

Поступила с жалобами на снижение концентрации, внимания, повышенную утомляемость, периодическую головную боль.

Из анамнеза известно, что считает себя больной с декабря 2016 года, когда на фоне физического и психоэмоционального переутомления появились головные боли. В феврале 2017г самостоятельно выполнила МРТ головного мозга дважды, где выявлены супратенториальные изменения в перивентрикулярных отделах на уровне передних рогов боковых желудочков и в субкортикальных отделах лобных долей (сосудистого генеза? демиелинизирующий процесс?), МР-картина незначительно выраженной наружной гидроцефалии, кисты шишковидной железы. Проходила курс неспецифической терапии с частичным положительным эффектом. Каждые полгода выполняла МРТ ГМ. С декабря 2020г стали беспокоить выше указанные жалобы. В январе 2021г обратилась на прием к врачу неврологу, обследование не назначалось, рекомендована ЛФК, прием НПВС. Улучшения состояния не отмечалось.

Общесоматический анамнез без особенностей.

Неврологический статус: сознание ясное. Контакт в полном объеме. Ориентировка в месте, времени, собственной личности сохранена. Общемозговая и менингеальная симптоматика: отсутствует. Обоняние не нарушено. Зрение не снижено. Зрачки округлой формы, средней величины (2-3 мм), глазные щели S = D, анизокории, диплопии нет. Реакция на аккомодацию сохранена. Реакция на свет живая. Конвергенция достаточная. Горизонтальный установочный нистагм при взгляде в стороны. Болезненности в точках выхода ветвей тройничного нерва нет. Чувствительность на лице не нарушена. Функция жевательных мышц сохранена. Корнеальный рефлекс сохранен. Асимметрии лица нет. Слух сохранен. Глотание, речь не нарушены. Язык по средней линии. Парезов нет. Мышечный тонус не изменен. Сухожильные и периостальные рефлексы с рук и ног низкие, без асимметрии сторон. Симптом

Бабинского отрицательный с двух сторон. Координаторные пробы: пальце-носовую пробу выполняет удовлетворительно с двух сторон, пяточно-коленную пробу выполняет удовлетворительно с двух сторон. При пробе Ромберга устойчива. Объективных нарушений чувствительности не выявлено. Нарушение функции тазовых органов отрицает. Нарушений походки нет.

При дообследовании:

В общем анализе ликвора без особенностей.

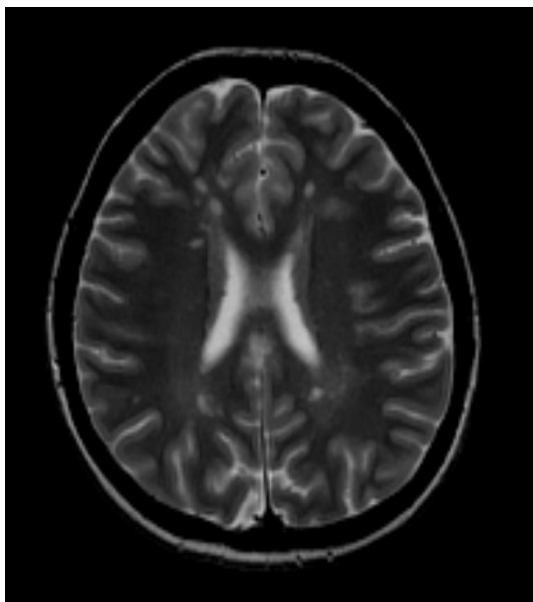
Анализ ликвора на олигоклональные IgG: 1 тип синтеза.

ЗВП от 20.10.21г: По данным ЗВП РШП (стимуляция мелким и средним размером клетки) признаков демиелинизации и аксональных изменений афферентных путей не выявлено.

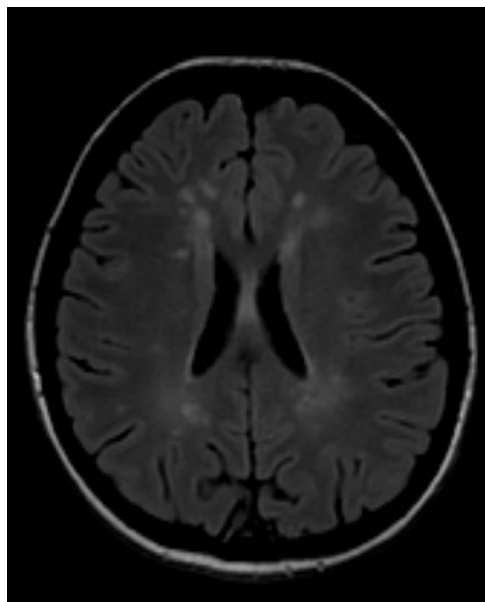
МРТ головного мозга и шейно-грудного отдела спинного мозга от 09.09.2021г:

МР-картина супратенториальных очагов в веществе головного мозга, вероятно, демиелинизирующего характера. Динамики в сравнение с предыдущими исследованиями не отмечено. Спинной мозг - без очаговых изменений.

Рисунок 15. МР-томограммы пациента с РИС в режиме T2 (А) и FLAIR (Б).



А

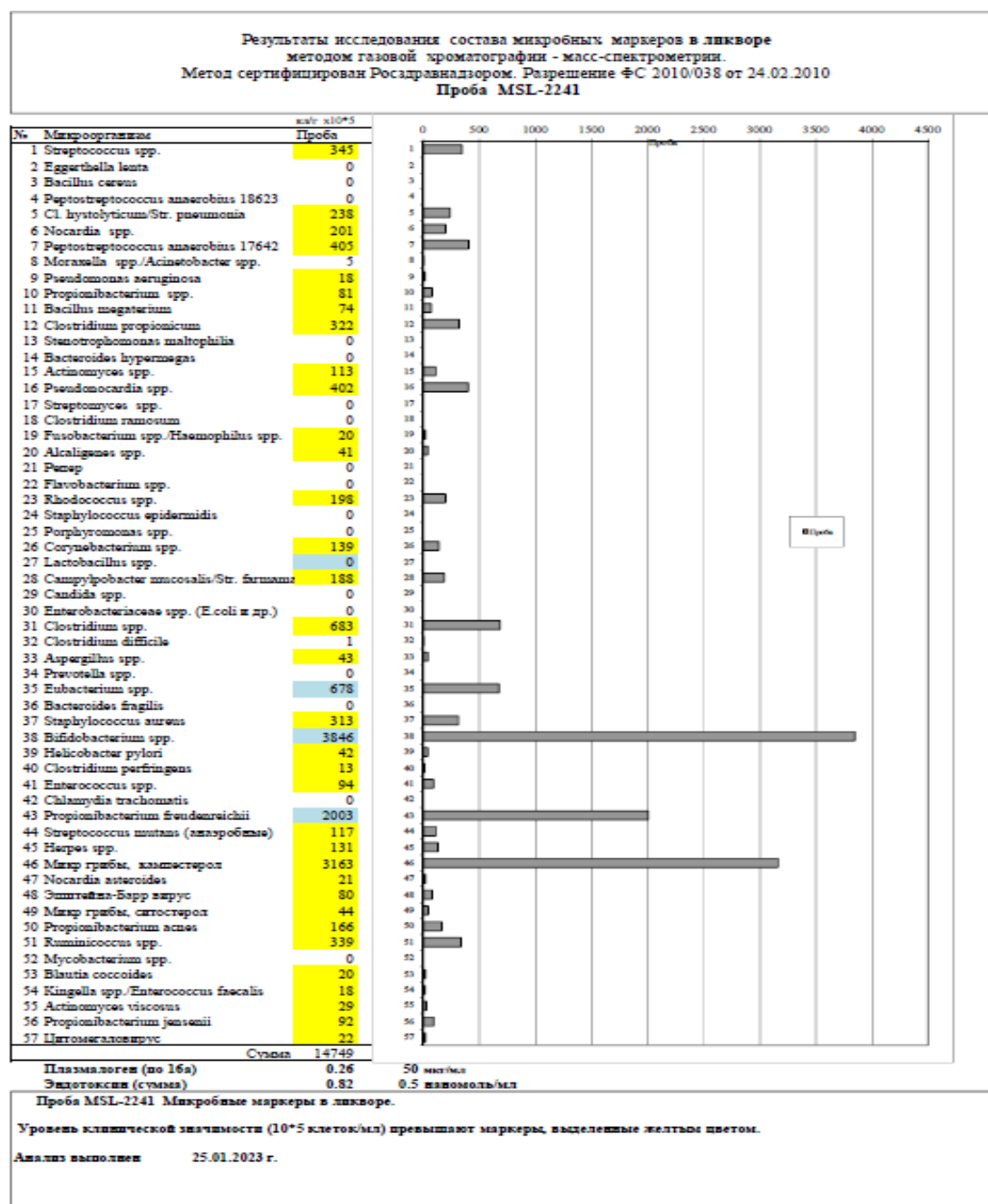


Б

Консультация ревматолога от 26.10.2021: данных за системное заболевание не выявлено.

Было рекомендовано динамическое наблюдение невролога, проведение МРТ головного мозга, шейного и грудного отделов спинного мозга с введением контрастного препарата в динамике через 6 месяцев или при появлении новых симптомов.

Результат анализа ликвора данной пациентки на наличие микробных маркеров представлен на рисунке 16:



Отмечается высокая микробная, грибковая и герпес-вирусная нагрузка.

Приложение 3. Клинический пример 3.

Пациентка П, 35 лет, страдает РРС, находится в фазе ремиссии.

Поступила с жалобами на головокружение, шаткость, пелену перед глазами с двух сторон.

Из анамнеза известно, что впервые 26.05.2021г отметила диплопию, неустойчивость при ходьбе, головокружение непостоянного характера.

31.05.2021г обратилась к офтальмологу, рекомендована консультация невролога.

МРТ ГМ с МР-ангиографией от 09.06.2021г: множественные мелкоочаговые изменения в супра- и инфратенториальных отделах ГМ могут быть обусловлены демиелинизирующим заболеванием.

В июне 2021 госпитализация в неврологическое отделение по м/ж с диагнозом: «Резидуальная энцефалопатия с цефалгией, рассеянной органической неврологической симптоматикой, зрительными нарушениями, легкой вестибулопатией с наличием множественных мелкоочаговых изменений в супа- и инфратенториальных отделах ГМ, демиелинизирующего характера? (по данным МРТ от 09.06.2021г)». Проведена терапия: дексаметазон 24 мг+200.0 физ. р-ра в/в капельно №3, дексаметазон 20 мг+200.0 физ. р-ра в/в капельно №2, солугидин 1000 мг + 200.0 физ. р-ра в/в кап., с положительной динамикой в виде регресса диплопии. Выполнена люмбальная пункция (документация не предоставлена, со слов, проведен общий анализ ликвора).

ЗВП от 04.06.2021г: функция проводимости не нарушена.

МРТ ГМ с КУ от 20.06.2021г: МР-признаки множественных очаговых изменений в супра и субтенториальных структурах ГМ, может соответствовать демиелинизирующему процессу (РС), вне фазы активного процесса.

Окулист от 17.06.2021г: Глазное дно в норме. Диагноз: Одноименная диплопия. Миопия слабой степени с ast OU.

Окулист от 06.07.2021г: ОУ-спокойны, подвижность в полном объеме.

Передняя камера-средней глубины, среды прозрачны. На глазном дне: ДЗН: б/розовые, границы четкие. Артерии и вены обычного калибра. Диагноз: сложный близорукий астигматизм обоих глаз слабой степени.

МРТ ГМ с КУ от 14.05.2022г: МР-картина демиелинизирующего заболевания ГМ, более вероятно SD, неактивная стадия. В сравнении с исследованием от 20.06.2021 МР-картина стабильная.

Общесоматический анамнез без особенностей.

Неврологический статус: Пациентка в ясном сознании. Доступна продуктивному речевому контакту. Ориентирована в месте, времени, собственной личности правильно. Общемозговых и менингеальных симптомов нет. ЧН: I пара (n. olphactorius): обоняние, со слов, не нарушено. Обонятельные галлюцинации отсутствуют. II пара (n. opticus): зрение, со слов, снижено на оба глаза. Выпадение полей зрения, зрительные галлюцинации не выявлены. Цветовое восприятие не изменено. III пара (n. oculomotorius), IV (n. trochlearis), VI (n. abducens): Глазные щели D=S. Зрачки OD=OS, округлой формы. Фотореакции (прямая, содружественная). Движения глазных яблок в полном объеме. Птоза нет. Мелкоразмашистый горизонтальный нистагм в крайних отведениях, нечеткость зрения в крайних отведениях. V (n. trigeminus): корнеальные рефлексы живые. Чувствительность на лице не нарушена. Трофика и сила жевательных мышц не нарушены. VII (n. facialis): Лицо симметрично в покое и при проведении мимических проб. Лакримации, сухости склеры, расстройств чувствительности на передних 2/3 поверхности языка нет. VIII (n. vestibulocohlearis): слух сохранен. IX (n. glossopharyngeus): пареза мягкого неба нет, глоточный рефлекс и небный рефлекс живой. Uvula по средней линии. X (n. vagus): дисфонии, дисфагии, дизартрии нет. XI (n. accessorius): положение головы не нарушено, произвольные движения головы и мышц плечевого пояса в полном объеме. XII (n. hypoglossus): девиация языка вправо, гипотрофии языка и фибрилляции нет. Двигательная система: Мышечный тонус в руках и ногах не изменен. Мышечная сила в руках и ногах 5-5-5б. Сухожильные рефлексы: с

верхних конечностей средней живости, $D=S$, с нижних конечностей средней живости, $D>S$. Брюшные рефлексы с двух сторон живые. Патологических рефлексов нет. Клонусов нет. Фасцикуляции, фибрилляции отсутствуют. Система чувствительности: поверхностная чувствительность не изменена. Вибрационная чувствительность: снижена в ногах, в руках не изменена. Система координации: в пробе Ромберга с ОГ- устойчива, с ЗГ- пошатывается. Координаторные пробы: ПНП с лёгкой атаксией справа, ПКП выполняет удовлетворительно. Походка не нарушена. Функции тазовых органов: контролирует. EDSS – 2,06.

При дообследовании:

В общем анализе ликвора без особенностей.

Анализ крови на антитела к аквапоину-4 от 21.06.2022: <10 у.е. (отрицательно).

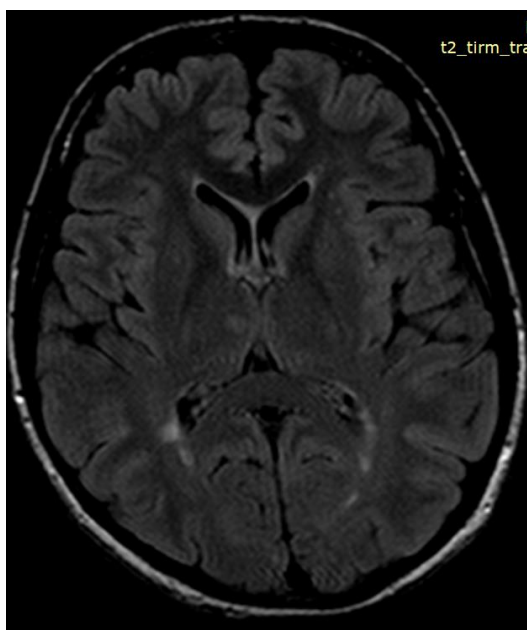
Анализ крови и ликвора на олигоклональные антитела от 21.06.2022: 2 тип синтеза.

Анализ ликвора на каппа- и лямбда-цепи иммуноглобулинов в ликворе от 21.06.2022: лямбда-цепи 0.1 мкг/мл, каппа-цепи 0.11 мкг/мл (отрицательно).

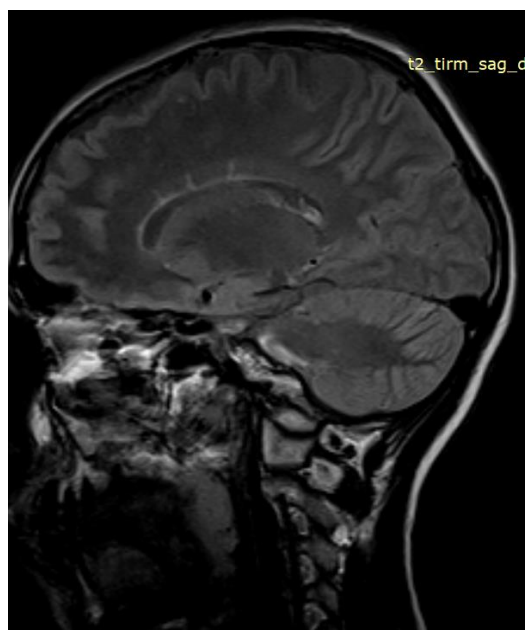
ЗВП от 22.06.2022г: По данным ЗВП РШП выявляются признаки нарушения проведения зрительной афферентации в кору по демиелинизирующему типу с двух сторон, с преобладанием на прехиазмальном уровне справа: латентность пика P100 для левого глаза 117 мс, для правого глаза 123 мс; асимметрия амплитуды ответа со снижением при стимуляции правого глаза.

МРТ в стационаре не проводилась. Представлена МРТ из стороннего учреждения, которую предоставила пациентка.

Рисунок 17. МР-томограммы головного мозга пациента с РРС в стадии ремиссии в режиме T2; аксиальный срез (А) и сагиттальный срез (Б).



А

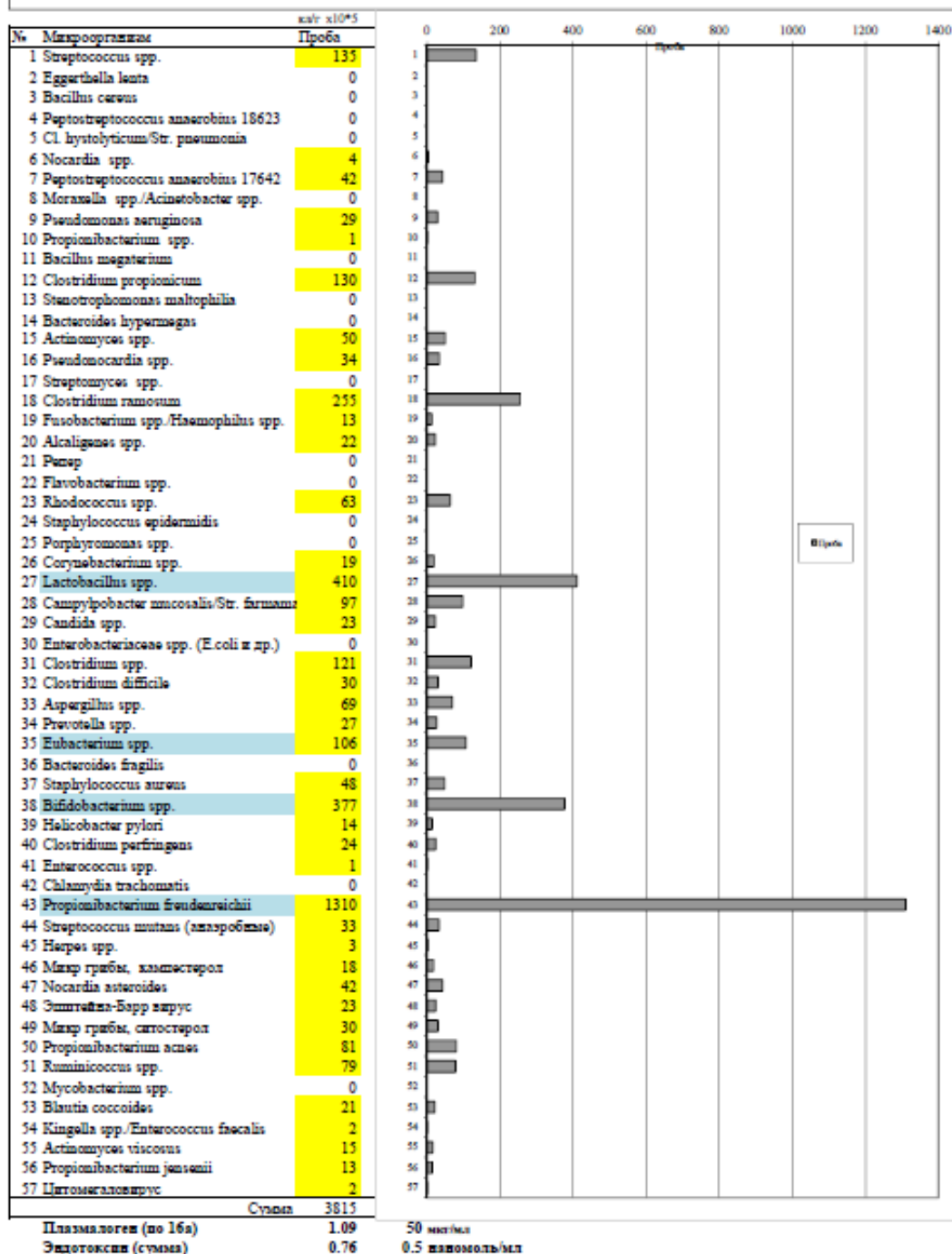


Б

Пациентке было рекомендовано начало терапии ПИТРС 1 линии.

Результат анализа ликвора пациентки на наличие микробных маркеров представлен на рисунке 18:

Результаты исследования состава микробных маркеров в ликворе
методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии.
Метод сертифицирован Росздравнадзором. Разрешение ФС 2010/038 от 24.02.2010
Проба MSL-23113



Проба MSL-23113 Микробные маркеры в ликворе.

Уровень клинической значимости (10⁵ клеток/мл) превышают маркеры, выделенные желтым цветом.

Анализ выполнен 25.04.2023

Отмечается повышение нормофлоры и плазмалогена.

Далее на рисунке 19 будут представлены результаты анализа ликвора пациентов на содержание микроРНК в виде графика PCA (principal component analysis), с помощью которого можно представить данные многомерного пространства в двух измерениях.

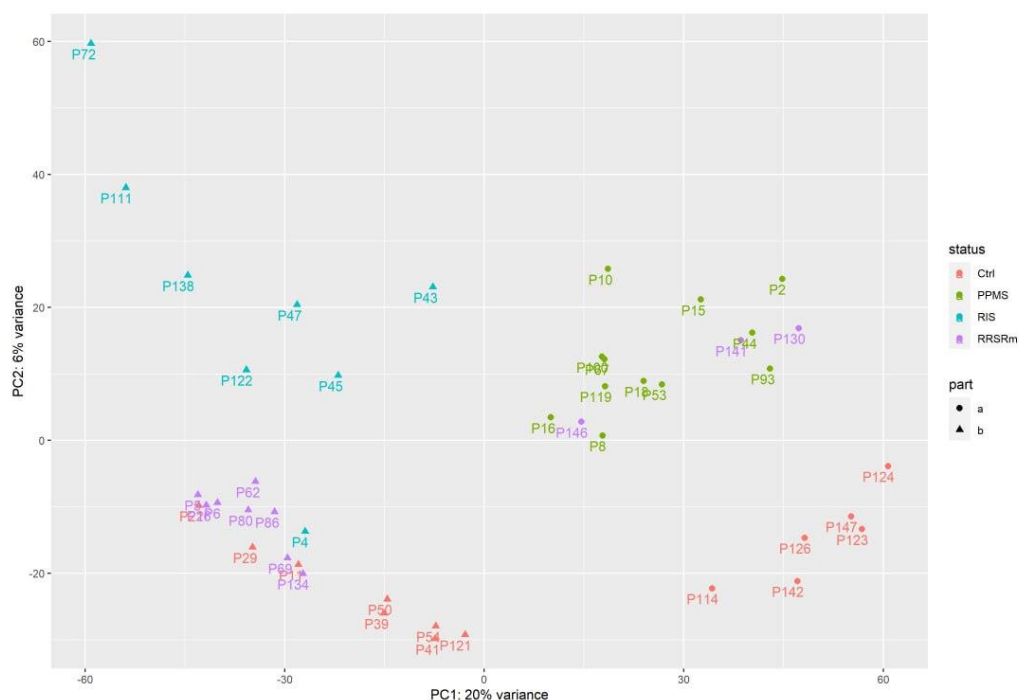


Рисунок 19. Описанные выше пациенты указаны на данном графике под кодом P10, P72 и P130 соответственно. Как можно увидеть, для данных пациентов в своей группе содержание различных микроРНК было наибольшее.