

О. Д. Шульга

**ДИСФУНКЦІЯ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРА ТА ІНТРАТЕКАЛЬНА ІМУННА ВІДПОВІДЬ У ПАЦІЄНТІВ З КЛІНІЧНО ІЗОЛЬОВАНИМ СИНДРОМОМ РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ**

О. Д. Шульга

**Дисфункция гематоэнцефалического барьера и интратекальный иммунный ответ у пациентов с клинически изолированным синдромом рассеянного склероза**

O. D. Shulga

**Dysfunction of bloodbrain barrier and intrathecal immune response in patients with clinically isolated multiple sclerosis syndrome**

Дослідження присвячене оцінюванню порушень гематоенцефалічного бар'єра та інтратекального синтезу імуноглобуліну G у пацієнтів з клінічно ізольованим синдромом (КІС) розсіяного склерозу. Наявність олигоклональних смуг та імуноглобуліну G свідчить про підвищений ризик розвитку розсіяного склерозу у пацієнтів з КІС незалежно від наявності інших факторів ризику. Обсерваційне дослідження інтратекальної відповіді у пацієнтів з КІС виконано вперше в Україні. На ґрунті оцінки показників цереброспінальної рідини та крові у 19 пацієнтів дорослого віку встановлено, що порушення проникності гематоенцефалічного бар'єра спостерігається в 68 % пацієнтів. Синтез інтратекального імуноглобуліну G наявний в двох третинах випадків.

**Ключові слова:** клінічно ізольований синдром, розсіяний склероз, гематоенцефалічний бар'єр, інтратекальний синтез, імуноглобулін G

Исследование посвящено оценке нарушений гематоэнцефалического барьера и интратекального синтеза иммуноглобулина G у пациентов с клинически изолированным синдромом (КИС) рассеянного склероза. Наличие олигоклональных полос и иммуноглобулина G свидетельствует о повышенном риске развития рассеянного склероза у пациентов с КИС независимо от наличия других факторов риска. Обсервационное исследование интратекального ответа у пациентов с КИС выполнено впервые в Украине. На основе оценки показателей цереброспинальной жидкости и крови у 19 пациентов взрослого возраста установлено, что нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера наблюдается у 68 % пациентов. Синтез интратекального иммуноглобулина G имеет в двух третях случаев.

**Ключевые слова:** клинически изолированный синдром, рассеянный склероз, гематоэнцефалический барьер, интратекальный синтез, иммуноглобулин G

The study is devoted to the evaluation of blood-brain barrier dysfunction and intrathecal synthesis of immunoglobulin G in patients with clinically isolated syndrome (CIS) of multiple sclerosis. The presence of oligoclonal bands and immunoglobulin G indicates an increased risk of multiple sclerosis in patients with CIS, regardless of the presence of other risk factors. An observational study of an intranasal response in patients with CIS was performed for the first time in Ukraine. Based on the evaluation of cerebrospinal fluid and blood parameters in 19 adult patients, it was found that 68 % of patients had an impairment of permeability of the blood-brain barrier. Synthesis of intrathecal immunoglobulin G is present in two thirds of cases.

**Key words:** clinically isolated syndrome, multiple sclerosis, blood-barrier, intrathecal synthesis, immunoglobulin G

Клінічно ізольований синдром (КІС) розсіяного склерозу (РС) — це монофазний клінічний епізод, про який повідомляє пацієнт, з характерними симптомами та об'єктивною симптоматикою, що характеризується гострим або підгострим початком, триває більше як 24 години, з повним/частковим відновленням функцій, за відсутності інфекції [1]. Діагноз КІС потребує виключення інших запальних, демієлінізуючих, інфекційних та системних захворювань нервової системи. Проведення магнітно-резонансної томографії для оцінювання локалізації вогнищ та визначення лабораторних показників в крові та лікворі набагато зменшує ймовірність діагностичних помилок [1, 2].

Наявність олигоклональних смуг та імуноглобуліну G (IgG) свідчить про підвищений ризик розвитку розсіяного склерозу у пацієнтів з КІС незалежно від наявності інших факторів ризику [1, 3, 4]. Якісне визначення олигоклональних смуг методом ізоелектричного фокусування та імуноглобуліну G увійшло в стандарти діагностики РС та є неодмінною складовою під час проведення диференціальної діагностики захворювання [1].

Усі білки крові проходять через стінки капілярів завдяки пасивній дифузії в мозок, позаклітинну рідину і спинномозкову рідину. Відповідно до законів дифузії, великі молекули (наприклад, IgM), проходять бар'єр повільніше, а фракції в подальшому утворюють більш крутий градієнт концентрації крові до церебро-

спінальної рідини (3000 : 1). Водночас менші молекули, як-от IgG (500 : 1) або альбумін (200 : 1) проходять бар'єр набагато швидше. Концентрація білка в цереброспінальній рідині (ЦСР) залежить від концентрації білка в крові, бар'єрної функції крові — ЦСР, тобто швидкості потоку ЦСР й інтратекального синтезу. Тому інтерпретація даних білка ЦСР на ґрунті абсолютних концентрацій ЦСР або лише сироваткового коефіцієнта є недостатньою [6].

Збільшення концентрації білка в сироватці крові призводить до її збільшення в ЦСР. Отже, ці зміни результують у зміні коефіцієнта концентрації альбуміну в сироватці та ЦСР. Коефіцієнт альбуміну  $Q_{Alb}$  є загальноприйнятим показником бар'єрної функції крові — цереброспінальна рідина [7], включаючи швидкість потоку ЦСР. Збільшення концентрації альбуміну в ЦСР зазвичай пов'язане з дисфункцією бар'єра, оскільки альбумін походить винятково з крові. Коефіцієнт альбуміну визначається за формулою  $Q_{Alb} = \text{Альбумін ЦСР} / \text{Альбумін сироватки}$ . Швидкість потоку ЦСР також модулює концентрацію молекул. Зменшена швидкість потоку ЦСР може виникнути через зниження швидкості її продукції або обмеження потоку в субарахноїдальному просторі, а також перекриття потоку через ворсини в венозну кров.

Для підтвердження інтратекального синтезу визначають також індекс IgG [8]. До того ж зв'язок між  $Q_{IgG}$  і  $Q_{Alb}$  є нелінійним [9, 10], тому його описують гіперболічними лініями дискримінації (чисельними або графічними). Доведено, що використання старих

лінійних обчислень приводить до помилкових інтерпретацій [11, 12].

Ця концепція оцінювання показників білкового обміну графічно наведена в райберграмах або чисельно визначається обчисленням інтракальній синтезованої кількості ( $Ig_{loc}$ ) в мг/л ЦСР або як відносна інтракальній фракція ( $Ig$ ) у відсотках від загальної концентрації  $Ig$  ЦСР. Під час діагностичного підходу для максимального вірогідності інтерпретація інтракальній синтезу відноситься до верхньої межі лінії відліку ( $Q_{lim}$  у факторних діаграмах). Ця лінія ґрунтується на  $Q_{mean} + 3s$  (або довідковому діапазоні, що включає 99 % випадків без ознак запалення) [6].

Досліджень, присвячених КІС, в світі та в Україні небагато, оскільки як окрему нозологічну одиницю КІС виокремлено лише 2008 року. Наявні лімітовані закордонні наукові дослідження щодо інтракальній відповіді у пацієнтів з КІС. Таке дослідження виконується в Україні вперше.

Мета: оцінити дисфункцію гематоенцефалічного бар'єра та інтракальній імунну відповідь у пацієнтів з клінічно ізольованим синдромом розсіяного склерозу.

Дослідження є обсерваційним дослідженням пацієнтів з клінічно ізольованим синдромом РС. У дослідженні залучали пацієнтів, що перебували на лікуванні в неврологічному відділенні, з діагнозом клінічно ізольованого синдрому розсіяного склерозу в період з 01.03.2017 до 01.10.2018 року.

Критерії включення в дослідження: вік досліджуваних — 18—55 років; діагноз КІС, встановлений відповідно до критеріїв McDonald 2010 року з поправкою Polman [13]. У дослідження включали учасників за відсутності будь-якого іншого неврологічного, психічного чи інфекційного захворювання, що спричинює вогнища в головному мозку, відсутності алкогольної або наркотичної залежності. Усі пацієнти підписали добровільно інформовану згоду на участь в дослідженні. Будь-який стан, що не відповідав критеріям включення, вважали критерієм виключення.

У пацієнтів з КІС проводили забір одночасно по 1 мл сироватки крові та цереброспінальної рідини. Рутинний аналіз цереброспінальної рідини проводили в умовах відділення лабораторної діагностики Волинської обласної клінічної лікарні. Визначали цитоз, рівень загального білка, електроліти. Імунофлуориметричний метод визначення білка в лікворі та ізоелектричне фокусування в агарозному гелі проводили в лабораторії MVZ Labor Leipzig (м. Лейпциг, Німеччина). Відправку біозразків робили в день збору матеріалу.

Для статистичного оцінювання та побудови райберграм використано програмне забезпечення Reiber 1994, що є у вільному доступі в мережі (<<http://www.horeiber.de>>).

Для перевірки значущості різниці між обчисленими середніми значеннями використані показники контрольної групи, які можна отримати в мережі за адресою <<http://daten-consult.de/forms/ttestunabh.html>>. Контрольна група представлена 4300 пацієнтами без гуморальної імунної відповіді, що використовують для розрахунку гіперболічного діапазону.

Середні частоти інтракальній синтезу обчислювали з посиланням на верхню межу референтного діапазону  $Q_{lim}$  ( $Q_{lim} = Q_{mean} + 3SD$ , що відповідає рівню 99 %). Також проведені розрахунки до меншого довідкового діапазону ( $Q_{lim} = Q_{mean} + 2SD$ , що відповідає рівню 96 %) [6].

Для обчислення середньої величини кількості синтезованого в мозку імуноглобуліну використовували  $Ig_{loc}$  (середнє) з посиланням на  $Q_{mean}$  замість  $Ig_{loc}$  з посилання на  $Q_{lim}$  за формулою  $Ig_{loc}$  (середнє значення) =  $[Q_{lg} - Q_{mea}(lg)] \times Ig$  сироватки (мг/л). Використано програмне забезпечення Albaum21, що також є у вільному доступі в мережі. Для виявлення середнього інтракальній синтезу в групі пацієнтів програма розраховує для кожного пацієнта індивідуально. Це програмне забезпечення пропонує дані для виконання  $t$ -тесту, достатнього для перевірки нульової гіпотези.

Проведене комплексне обстеження 19 пацієнтів з КІС, віком  $27,68 \pm 10,16$  років, з них 12 жінок та 7 чоловіків.

Показники імуноглобуліну G та альбуміну наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Показники інтракальній та імунної відповіді у пацієнтів з клінічно ізольованим синдромом РС

№	Стать	Альбумін			Імуноглобулін G		
		ЦСР	Кров	Коефіцієнт	ЦСР	Кров	Коефіцієнт
1	ж	395	43,8	9	55,04	10,3	5,3
2	ч	287	33,5	8,6	38,72	8,07	4,8
3	ж	211	39,6	5,3	27,76	11,6	2,4
4	ж	314	44,1	7,1	112	14,7	7,6
5	ж	110	41,1	2,7	30,94	16,8	1,8
6	ч	593	45,5	13	95,33	8,95	10,7
7	ч	150	45,2	3,3	61,82	9,86	6,3
8	ж	206	40,1	5,1	36,25	12	3
9	ж	158	41,1	3,8	35,5	12,5	2,8
10	ч	112	33,7	3,3	39,42	13,8	2,9
11	ч	93,6	41,3	2,3	70,78	13,1	5,4
12	ж	176	29,1	6	27,82	7,06	3,9
13	ж	112	46,3	2,4	31,13	14,4	2,2
14	ж	195	41	4,8	31,03	6,13	5,1
15	ч	122	44,4	2,7	19,7	12,1	1,6
16	ч	275	24,8	11,1	32,7	8,31	3,9
17	ж	287	38,8	7,4	38,03	7,57	5
18	ж	159	40,5	3,9	23,08	11,3	2
19	ж	226	43,3	5,2	49,73	10,6	4,7

Зокрема, згідно з нашими результатами, середні значення коефіцієнта альбуміну склали  $5,63 \pm 2,96$  мг/мл (табл. 2).

Таблиця 2. Частоти коефіцієнта альбуміну для групи пацієнтів з клінічно ізольованим синдромом

	$Q_{Alb}$	$Ig_{loc}$ (mean)
Середнє значення	5,63	17,03
Стандартне відхилення	2,96	19,34
Коефіцієнт варіації	53	114
Кількість	19	19

Для оцінювання дисфункції гематоенцефалічного бар'єра на рівні збільшення його проникності на 10 % і 20 % використані такі формули: для + 10 % рівня ( $Q_{Alb} = 4 + \text{Вік пацієнта}/15 \times 10^{-3}$ )  $\times 1,1$  та для рівня + 20 % ( $Q_{Alb} = 4 + \text{Вік пацієнта}/15 \times 10^{-3}$ )  $\times 1,2$ . Зокрема, порушення гематоенцефалічного бар'єра на етапі КІС діагностовано у 13 (68,42 %) пацієнтів (табл. 3).

Таблиця 3. Частота дисфункції бар'єра крові у групі пацієнтів з клінічно ізольованим синдромом РС

	Кількість	Частота $Q_{Alb}$
Більш ніж + 10 % від рівня	$n_{10}$	7
Більш ніж + 20 % від рівня	$n_{20}$	6
Загальна кількість	$N$	19

Контрольна група (доступна в мережі) представлена 4300 пацієнтами без гуморальної імунної відповіді, що використовують для розрахунку гіперболічного діапазону. Як конкретний результат дифузійно-кровоного процесу переносу білка між простором крові та ЦСР обчислювали постійний коефіцієнт варіації  $Q_{mean}$  для всього діапазону різних значень  $Q_{Alb}$ , зважаючи на те, що коефіцієнт дифузії не залежить від швидкості потоку ЦСР. Власне тому для статистики (не для діагностики) можна краще посилатися на діапазон  $2s [Q_{mean} + (Q_{lim} - Q_{mean}) \times 0,67]$  замість діапазону  $Q_{mean} + 3s (= Q_{lim})$ . Зокрема, розрахунок оцінки двох різних граничних значень:  $3s$ -рівень проводили за такими формулами:  $Q_{IGX} > Q_{lim} (X)$  (діапазон  $Q_{mean} + 3s$ ) і  $2s$ -рівень  $[(Q_{mean} + (Q_{lim} - Q_{mean}) \times 0,67)]$ . Частоту інтратекального синтезу розраховують як  $n/N \times 100, \%$ . Відповідно до наших результатів, інтратекальний синтез IgG спостерігався на рівні більш ніж  $2s$  у 13 (68,4 %) та більш ніж  $3s$  у 10 (52,6 %) пацієнтів (табл. 4).

Таблиця 4. Частота інтратекального синтезу у пацієнтів з КІС

	Кількість	Інтратекальний синтез IgG
Більш ніж $3s$ рівня	$n (3)$	10
Більш ніж $2s$ рівня	$n (2)$	13
Загальна кількість	$N$	19

Під час порівняння з групою контролю встановлено, що у пацієнтів з КІС рівень імуноглобуліну G в лікворі є набагато вищим (табл. 5). В методиці порівняння застосовано  $t$ -тест на значущість відмінностей показників контрольної групи та групи пацієнтів.

Таблиця 5. Статистичні дані для розрахунку значущості (тестування нульової гіпотези) Ig-синтезу на  $Ig_{loc} (m)$

	Середнє значення IgG, mg/ml	Стандартне відхилення, mg/ml	Кількість випадків IgG
Група контролю	0	4,45	500
Група пацієнтів з КІС	17,03	19,34	19

Отже, у пацієнтів з клінічно ізольованим синдромом спостерігається порушення функції гематоенцефалічного бар'єра у 68,4 % пацієнтів. Синтез інтратекального

IgG спостерігається на рівні більш ніж  $2s$  у 13 (68,4 %) та більш ніж  $3s$  у 10 (52,6 %) пацієнтів.

#### Список літератури

1. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria / Thompson A. J., Banwell B. L., Barkhof F. [et al.] // The Lancet Neurology. 2018 Feb; 17(2). P. 162—173. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
- 2.ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis / Montalban X, Gold R., Thompson A. J. [et al.] // European Journal of Neurology. 2018. DOI: 10.1111/ene.13536.
3. Oligoclonal bands increase the specificity of MRI criteria to predict multiple sclerosis in children with radiologically isolated syndrome / Makhani N., Lebrun C., Siva A., [et al.] // Mult Scler J Exp Transl Clin. 2019; 5(1): 2055217319836664. DOI: 10.1177/2055217319836664.
4. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis / Mar Tintore, Àlex Rovira, Jordi Río [et al.] // Brain. 2015. Vol. 138, Issue 7. P. 1863—1874, URL: <https://doi.org/10.1093/brain/awv105>.
5. Reiber H. Cerebrospinal fluid data compilation and knowledge-based interpretation of bacterial, viral, parasitic, oncological, chronic inflammatory and demyelinating diseases: diagnostic patterns not to be missed in Neurology and Psychiatry // Arq. Neuro-Psiquiatr. 2016. Vol. 74, no. 4. P. 336—49. DOI: 10.1590/0004-282X20160044.
6. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report / Andersson M., Alvarez-Cermenó J., Bernardi G. [et al.] // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1994; 57: 897—902. DOI: 10.1136/jnnp.57.8.897.
7. Ganrot, K., Laurell, C. B. Measurement of IgG and albumin content of cerebrospinal fluid and its interpretation // Clin. Chem. 1974; 20: 571—573. PMID: 4207912.
8. Reiber, H. The discrimination between different blood-CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid // J. Neurol. 1980; 224: 89—99. PMID: 6160221.
9. Ganrot-Norlin, K. Relative concentrations of albumin and IgG in cerebrospinal fluid in health and in acute meningitis // Scand. J. Infect. Dis. 1978; 10: 57—60. PMID: 635476.
10. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs // J Neurol Sci. 2001. Vol. 184, Issue 2, P. 101—122. DOI: 10.1016/S0022-510X(00)00501-3.
11. Reiber, H. Evaluation of blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunctions in neurological diseases. In: The blood-brain barrier in health and disease / A. J. Suckling, M. G. Rumsby, M. W. B. Bradbury (Eds.). Ellis Horwood, Chichester, UK; 1986: P. 147—157.
12. Laurell, C. B. On the origin of major CSF proteins. In: Advances in CSF protein research and diagnosis / E. J. Thompson (Ed.). MTP Press, Lancaster, UK; 1987: 123—128.
13. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria / C. H. Polman, S. C. Reingold, B. Banwell [et al.] // Annals of Neurology. 2011. Vol. 69, Issue 2. P. 292—302. DOI: 10.1002/ana.22366.

Надійшла до редакції 08.04.2019 р.

**ШУЛЬГА Ольга Дмитрівна**, лікар-невролог, кандидат медичних наук, завідувачка відділення неврології Волинської обласної клінічної лікарні, м. Луцьк, Україна; e-mail: shulgaolga@ukr.net

**SHULGA Olga**, Physician-neurologist, MD, PhD, Head of the of the Department of Neurology of Volyn Regional Hospital, Lutsk, Ukraine; e-mail: shulgaolga@ukr.net