

На правах рукописи

Крынский Сергей Андреевич

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИНДРОМА
МЯГКОГО КОГНИТИВНОГО СНИЖЕНИЯ

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России».

Научные руководители:

заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор

Дидковский Николай Антонович

доктор медицинских наук, профессор

Гаврилова Светлана Ивановна

Официальные оппоненты:

Калюжин Олег Витальевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)».

Нестерова Ирина Вадимовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры аллергологии и иммунологии факультета непрерывного дополнительного образования медицинских работников Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения РФ.

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2019 года на заседании диссертационного совета ПДС 0300.002 на базе ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов" (РУДН) Минобрнауки РФ по адресу: г. Москва 117198, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2, каб. 249.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ по адресу: г. Москва 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета
ПДС 0300.002 по защите диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук,
на соискание ученой степени доктора наук,
кандидат медицинских наук, доцент

**Баткаева
Надежда Владимировна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Синдром мягкого когнитивного снижения амнестического типа (amnesic mild cognitive impairment, аМСІ) в настоящее время рассматривается как возможный наиболее ранний, додементный клинический этап болезни Альцгеймера (БА). БА – нейродегенеративное заболевание мультифакториальной этиологии, приводящее к прогрессирующему нарушению памяти, зрительно-пространственных функций, изменениям эмоциональной сферы и личности в целом. В настоящее время болезнью поражены около 32 миллионов человек в мире, а к 2020 году ожидается увеличение этого числа до 54 миллионов. Эффективные методы терапии БА на стадии деменции не разработаны.

Диагноз аМСІ устанавливается на основании результатов нейропсихологического тестирования, жалоб на когнитивные нарушения со стороны пациента или его родственников, отсутствия значимых нарушений повседневной активности пациента, исключения других причин когнитивного снижения. Показатели нейропсихологических шкал при аМСІ являются промежуточными между соответствующей возрастной нормой и значениями, характерными для деменции. Риск развития деменции альцгеймеровского типа у пациентов с аМСІ составляет около 15% в год, но у некоторых больных когнитивные расстройства имеют стабильный характер или регрессируют: частота восстановления когнитивных функций при аМСІ достигает, по разным данным, от 15 до 30%. С учетом этого представляет большую важность поиск маркеров прогнозирования когнитивного снижения при аМСІ.

Степень разработанности темы. По современным представлениям, прогрессированию нейродегенерации при аМСІ способствует длительная латентная активация механизмов врожденного иммунного ответа в центральной нервной системе (ЦНС) (нейровоспаление). В мозге при аМСІ отмечается патологическая активация клеток микроглии, секреция ими избыточного уровня провоспалительных цитокинов (ЦК), свободных радикалов и нейромедиатора глутамата, усиливающих повреждение нейронов. Изучается связь между сывороточными маркерами системного воспаления, отдельными показателями иммунитета и нейровоспалением при аМСІ. Воздействие периферически синтезированных ЦК и других медиаторов воспаления на ЦНС может происходить по крайней мере тремя различными способами: проникновение ЦК через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) за счет механизмов активного транспорта, изменение активности афферентных механизмов автономной нервной системы при воздействии на окончания блуждающего нерва, модуляция секреции медиаторов иммунной системы эндотелиоцитами ГЭБ при воздействии ЦК периферического кровотока.

Результаты различных работ, оценивающих отдельные показатели иммунитета при аМСІ, нередко противоречивы. При этом работы, в которых проводилось бы комплексное изучение иммунных показателей при аМСІ в сравнении с нормой и с БА, практически отсутствуют. Не изучалось влияние динамики параметров иммунитета на прогноз аМСІ. Кроме того, в имеющихся

работах пациенты с аМСІ как правило рассматриваются в качестве иммунологически однородной группы. Между тем, с учетом многофакторности патогенеза аМСІ и разнонаправленности результатов оценки отдельных показателей иммунитета при данном синдроме, приводящихся в литературе, не исключено наличие гетерогенности аМСІ по характеру иммунологических изменений, что может иметь значение для прогноза риска прогрессирования когнитивных нарушений. В связи с этим становится очевидной актуальность задач, решаемых в данном исследовании.

Цель исследования. Изучить иммунологические расстройства при синдроме мягкого когнитивного снижения амнестического типа (аМСІ) и болезни Альцгеймера на различных стадиях, исследовать связь нарушений иммунного ответа при аМСІ с выраженностью когнитивных расстройств и прогнозом.

Задачи исследования

1. Изучить основные параметры гуморального и клеточного иммунитета у больных с мягким когнитивным снижением амнестического типа, с болезнью Альцгеймера и в группе контроля.

2. Исследовать уровень маркеров системного воспаления, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у больных с синдромом аМСІ, с болезнью Альцгеймера и в группе контроля.

3. Изучить связь иммунологических расстройств при аМСІ с результатами клинической оценки когнитивных функций в динамике, оценить риск прогрессирования когнитивных нарушений при аМСІ в зависимости от профиля и выраженности иммунных нарушений.

4. На основе полученных данных провести поиск потенциальных биомаркеров для прогнозирования клинического течения синдрома аМСІ.

Научная новизна работы. Впервые проведено комплексное изучение нарушений иммунитета и уровня маркеров системного воспаления в динамике у больных с синдромом мягкого когнитивного снижения амнестического типа, включающее оценку основных показателей клеточного (CD45+CD3+CD4+, CD45+CD3+CD8+, CD45+CD3-CD19+, CD45+CD3-CD16+CD56+, CD45+CD3-CD16+CD56+HLA-DR+) и гуморального (уровень общих иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG) иммунного ответа, уровня основных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 (p40+p70), IFN γ , TNF α).

Впервые выявлены и охарактеризованы основные варианты иммунологических изменений при синдроме мягкого когнитивного снижения амнестического типа, описаны иммунологические фенотипы синдрома аМСІ, характеризующиеся достоверными изменениями основных показателей врожденного и адаптивного иммунитета.

В результате комплексного обследования, включавшего оценку клинических, нейропсихологических и иммунных показателей у больных аМСІ в динамике в течение года, впервые изучена связь различных вариантов иммунологических нарушений при аМСІ с риском прогрессирования когнитивных расстройств и развития деменции альцгеймеровского типа.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате работы впервые показана неоднородность синдрома мягкого когнитивного снижения амнестического типа по наличию низкоуровневого системного воспаления, гуморальной недостаточности, недостаточности Th1-ответа, выделены основные варианты данного синдрома по характеру преобладающих иммунных нарушений, что важно для рационального дизайна последующих фундаментальных и клинических исследований.

Полученные результаты позволили установить наличие взаимосвязи между характером иммунных нарушений при синдроме аМСИ, динамикой расстройств иммунитета при наблюдении и прогнозом в отношении прогрессирования когнитивных нарушений, что имеет значение для разработки новых прогностических маркеров при аМСИ, а также для обоснования возможного использования иммунотерапии у отдельных групп больных. Комплекс мер, предлагаемых к внедрению, даст возможность повысить эффективность лечебной работы, обеспечить повышение качества помощи пациентам с синдромом аМСИ, а также рационально использовать имеющиеся ресурсы. Результаты исследования могут быть использованы в деятельности учреждений первичного и специализированного звена здравоохранения, оказывающих помощь пациентам с додементными когнитивными расстройствами.

Методология и методы исследования. В исследовании использовался общеклинический метод, нейропсихологическое обследование, молекулярно-биологические методы, включая иммуноферментный анализ и проточную цитометрию, современные статистические методы. На первом этапе исследования формировалась выборочная совокупность в соответствии с задачами исследования. Набор пациентов проводился на базе отдела гериатрической психиатрии Федерального государственного бюджетного научного учреждения Научный центр психического здоровья Федерального агентства научных организаций России (ФГБНУ НЦПЗ), г. Москва. Основным объектом исследования явились пациенты с мягким когнитивным снижением амнестического типа в возрасте 54-84 лет, получавшие амбулаторную помощь в ФГБНУ НЦПЗ (100 пациентов). 40 пациентов с аМСИ прошли клиническое и нейропсихологическое обследование в динамике. В период наблюдения 20 пациентов получили курс терапии церебролизином – 20 внутривенных инфузий церебролизина по 30 мл с постепенным наращиванием дозы в течение первых четырех дней (5, 10, 20, 30 мл) препарата в 100 мл физиологического раствора на протяжении 4 нед. Еще 20 пациентов получали лечение холина альфосцератом (церетон) в течение 3 мес. по 1200 мл/сут в 3 приема. Больные были обследованы в начале терапии, через 10 недель и 26 недель после ее завершения. Группу сравнения составили пациенты с болезнью Альцгеймера на стадии мягкой и умеренной деменции (64-86 лет, ср. возраст $74,3 \pm 5,7$ лет). В контрольную группу были набраны 40 человек без когнитивных расстройств, сопоставимые по возрасту и полу с основной группой и группой сравнения.

Клиническое обследование пациентов включало сбор анамнеза жизни и заболевания, выявление сопутствующей патологии, физикальное и

инструментальное обследование. Для нейропсихологического обследования использовались шкалы CGI (Clinical Global Impression - шкала общего впечатления), краткой шкалы оценки психического статуса (MMSE, Mini- Mental State Examination), шкалы MoCA-test (Монреальская шкала оценки когнитивных функций), шкалы BNT (Boston naming test - Бостонский тест называния), шкалы оценки когнитивных нарушений при болезни Альцгеймера (ADAS-Cog, Alzheimer's Disease Assessment Scale). Иммунологическое обследование включало исследование субпопуляций лимфоцитов (CD45+CD3+CD4+, CD45+CD3+CD8+, CD45+CD3-CD19+, CD45+CD3-CD16+CD56+, CD45+-CD16+CD56+HLA-DR+) в периферической крови методом проточной лазерной цитометрии с использованием моноклональных антител производства «Becton Dickinson», количественное определение иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) и С-реактивного белка (СРБ) методом ИФА, определение содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови методом преципитации иммунных комплексов в 4,5% растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 в полимеризующем буфере с последующим фотометрированием, определение уровня цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12) в сыворотке крови методом ИФА, с использованием наборов производства ООО «Цитокин», ООО «Вектор-Бест», «BCM Diagnostics».

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Microsoft Office Excel (Microsoft, 2007). Средние значения количественных показателей по группам представлены как $M \pm$ доверительный интервал. Проверка распределения на нормальность проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий количественных показателей между группами определялась посредством Т-критерия Стьюдента. Достоверность различий частоты обнаружения признаков определялась посредством точного критерия Фишера, доверительные интервалы для долей рассчитывались по формуле Уилсона. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Показано, что у большинства пациентов с синдромом мягкого когнитивного снижения амнестического типа отмечаются признаки низкоуровневого системного воспаления.

2. Выявлено, что сочетание маркеров низкоуровневого системного воспаления, включая повышение уровня С-реактивного белка до значений выше 5 мг/л и повышение уровня 2 и более провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8, TNF α , ассоциируется при aMCI с недостаточностью и дисбалансом адаптивного иммунного ответа, а также с неблагоприятной клинической динамикой когнитивных нарушений.

3. Выявлены и охарактеризованы 4 основных иммунологических варианта синдрома мягкого когнитивного снижения амнестического типа в зависимости от наличия низкоуровневого системного воспаления и гуморальной недостаточности. Данным вариантам соответствуют комплексные достоверные изменения показателей иммунитета и уровня основных ЦК.

4. Обнаружено, что наличие признаков низкоуровневого системного воспаления в сочетании с устойчивым снижением показателей гуморального иммунитета в динамике шестимесячного наблюдения является прогностическим маркером прогрессирования когнитивных нарушений у пациентов с мягким когнитивным снижением амнестического типа.

Апробация результатов и степень их достоверности. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточной по объему и репрезентативной базой данных включенных в статистический анализ показателей: 100 пациентов с мягким когнитивным снижением амнестического типа, 45 пациентов с болезнью Альцгеймера на стадиях мягкой и умеренной деменции, 40 добровольцев без когнитивных расстройств, включенных в контрольную группу.

Основные положения и результаты данной работы докладывались и обсуждались на: IV European Congress of Immunology (Vena, 2015); 5ом Международном симпозиуме «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и при патологии» (Санкт-Петербург, 2015); Конференции молодых ученых ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва, 2016, 2017); Курчатовской молодежной научной школе (2015, 2016); Первом российском кристаллографическом конгрессе (Москва, 2016); Межрегиональном форуме с международным участием «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (Казань, 2016), Двенадцатом, тринадцатом и четырнадцатом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2016, 2017, 2018); 31st International Conference of Alzheimer's Disease (Будапешт, 2016); Конкурсе молодых ученых в рамках XVI Всероссийского научного форума с международным участием «Дни иммунологии» (Санкт-Петербург, 2015, 2017).

Доклад «Эффекты нейротрофической терапии на системное воспаление, уровни BDNF, IGF-2 и NT-4 при синдроме мягкого когнитивного снижения» отмечен 2ой премией на конкурсе молодых ученых в рамках XVI Всероссийского научного форума с международным участием «Дни иммунологии».

Публикации. Основные теоретические и практические результаты диссертации опубликованы в 6 научных статьях, среди которых 6 публикаций в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных в действующем перечне ВАК, и в 14 тезисах докладов. Результаты доложены и получили одобрение на 14 международных, всероссийских и межвузовских научно-практических конференциях, перечисленных в конце автореферата.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Материал изложен на 128 страницах, включает 10 таблиц, 24 рисунка. Список использованных источников содержит 169 наименований.

Во **введении** обосновывается актуальность выбранной темы диссертационного исследования, характеризуется степень ее

разработанности, определяются цели и задачи, осуществляется выбор предмета и объекта исследования. Формулируются положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** диссертационной работы дается обзор современных представлений о патогенезе болезни Альцгеймера, приводятся сведения о состоянии клеточного и гуморального иммунитета, изменениях уровня основных ЦК у пациентов с болезнью Альцгеймера и мягким когнитивным снижением амнестического типа, подробно рассматривается на основании данных современной литературы роль нейровоспаления и системных иммунных нарушений в развитии и прогрессировании когнитивных расстройств альцгеймеровского типа. Обсуждаются ограничения существующих работ в данной области, важность новых комплексных исследований для поиска методов прогнозирования течения додементной стадии болезни Альцгеймера и разработки индивидуализированных подходов к терапии.

Во **второй главе** приводятся характеристики выборки больных, критерии формирования основной группы, группы сравнения и контрольной группы, описываются использованные методы клинического, нейропсихологического и лабораторного обследования, применявшиеся подходы к статистической обработке.

Третья глава содержит результаты оценки показателей иммунного ответа и системного воспаления при болезни Альцгеймера и аМСІ, описание и характеристику выявленных иммунологических фенотипов аМСІ, анализ взаимосвязи между динамикой показателей иммунного ответа при аМСІ и клиническим прогнозом.

При оценке основных показателей гуморального и клеточного иммунитета, уровня маркеров системного воспаления и основных ЦК при аМСІ и БА по сравнению с нормой было обнаружено, что при когнитивных расстройствах альцгеймеровского типа в ряде случаев отмечаются признаки низкоуровневого системного воспалительного ответа. Так, сывороточный уровень маркера воспаления СРБ был достоверно повышен по сравнению с нормой при аМСІ ($7,14 \pm 2,71$ мг/л и $1,75 \pm 0,15$ мг/л, $p < 0,05$). При анализе сывороточного уровня ЦК было обнаружено, что как при болезни Альцгеймера ранней и умеренной стадии, так и при аМСІ средние уровни провоспалительных ЦК IL-1 β , TNF α достоверно превышали показатели контрольной группы лиц без когнитивных нарушений ($p < 0,05$) (Рисунок 1).

В отличие от IL-1 β и TNF α , средний уровень хемокина IL-8 при аМСІ и БА не отличался от нормы. Не был достоверно изменен при БА и аМСІ также уровень противовоспалительных ЦК IL-10 и IL-1RA.

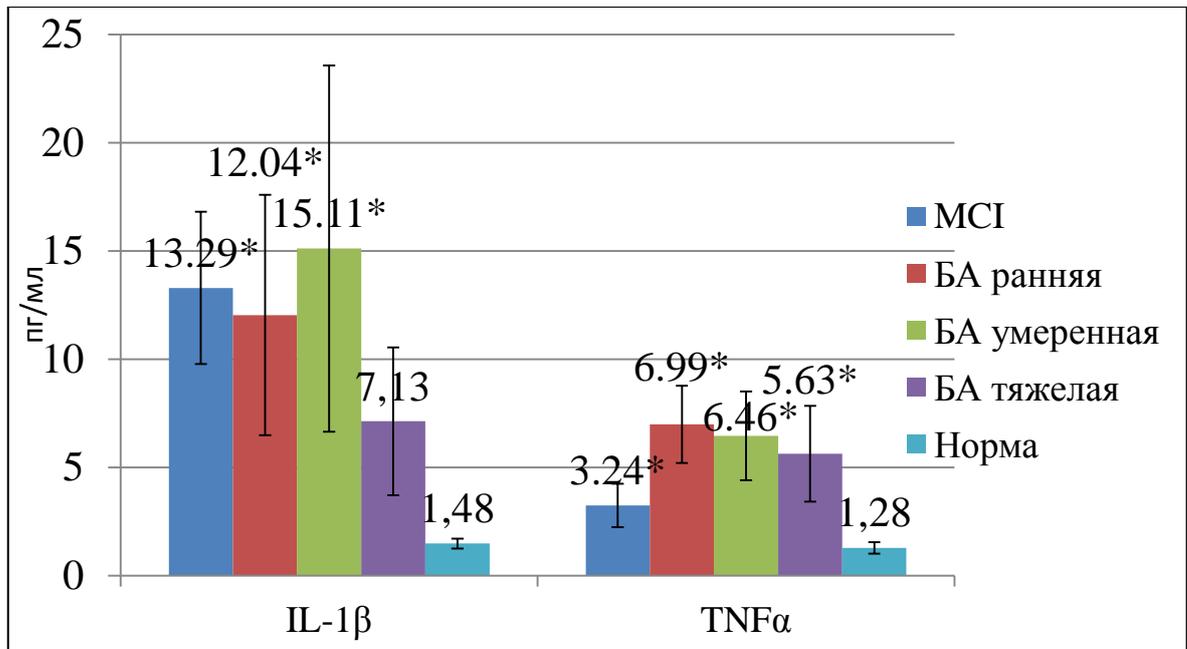


Рисунок 1 - Уровень IL-1β и TNFα при мягком когнитивном снижении (аМСИ) и болезни Альцгеймера (БА) по сравнению с контролем (* - достоверные различия по сравнению с контролем, $p < 0,05$)

Уровень ЦК Th1-иммунного ответа IL-2 и IFNγ, а также ЦК Th2-иммунного ответа IL-4 при аМСИ и БА также не отличался от нормы. Однако у пациентов с аМСИ уровень IFNγ проявлял тенденцию к повышению ($p > 0,05$) и был выше 50 пг/мл в 40% наблюдений, при контрольных показателях $32,52 \pm 18,54$ пг/мл.

Достоверные различия между БА на стадии ранней деменции и аМСИ были выявлены по уровню ЦК IL-12 (Рисунок 2). Уровень IL-12 при БА был выше нормы, а также превышал значение этого показателя при аМСИ ($p = 0,001$). У пациентов с аМСИ концентрация IL-12 не отличалась от контрольных значений.

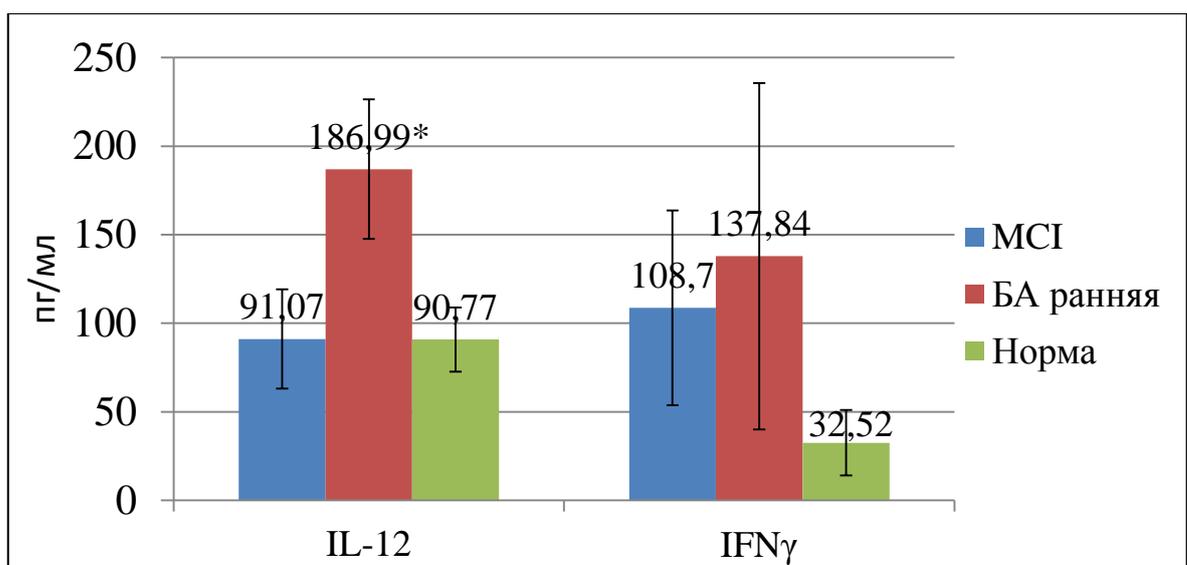


Рисунок 2 - Уровень IL-12 и IFNγ при мягком когнитивном снижении (аМСИ) и болезни Альцгеймера (БА) по сравнению с контролем (* - достоверные различия по сравнению с контролем, $p < 0,05$)

Основные показатели гуморального иммунитета в среднем у пациентов с когнитивными расстройствами не были достоверно изменены, однако уровень иммуноглобулина G (IgG) имел выраженную неоднородность в группе больных аМСІ: 46 пациентов имели невысокий, пограничный с нижней границей нормы уровень IgG (700-1000 мг%), у 49 больных уровень IgG был в пределах от 1000 до 1600 мг% и у 8 пациентов он был повышен (более 1600 г%).

С учетом полученных данных об имеющемся более чем у половины больных аМСІ повышении уровня СРБ и провоспалительных ЦК, на следующем этапе исследования были проанализированы уровни показателей гуморального и клеточного иммунитета при аМСІ в зависимости от наличия низкоуровневого системного воспаления. В подгруппу больных с низкоуровневым системным воспалением вошли пациенты, имевшие повышение уровня С-реактивного белка до значений выше 5 г/л и повышение уровня 2 и более провоспалительных ЦК (IL-1 β , IL-8, TNF α) (46 больных). Остальные пациенты вошли в группу без признаков низкоуровневого системного воспаления. Как в первой, так и во второй подгруппе пациенты приблизительно равномерно разделились в зависимости от уровня иммуноглобулина G. У 29 пациентов первой подгруппы и у 17 пациентов второй подгруппы уровень IgG был выше 1000 г%, а у 37 пациентов первой подгруппы и у 17 пациентов второй подгруппы уровень этого иммуноглобулина был ниже 1000 г%. В зависимости от уровня IgG наблюдаемые изменения клеточного иммунитета и уровни основных ЦК имели существенные особенности, в связи с чем были выделены 4 иммунологических варианта аМСІ (таблица 1).

Таблица 1. Группы пациентов с аМСІ по наличию низкоуровневого системного воспаления и недостаточности гуморального иммунитета

| | Нет недостаточности гуморального иммунитета | Есть недостаточность гуморального иммунитета | Всего |
|--|---|--|-------|
| Имеются признаки системного воспаления | Группа 1 (n = 29) | Группа 2 (n = 37) | 66 |
| Отсутствуют признаки системного воспаления | Группа 4 (n = 17) | Группа 3 (n = 17) | 34 |
| Всего | 46 | 54 | 100 |

Одним из наиболее частых типов иммунологических изменений при аМСІ были наличие низкоуровневого системного воспаления без гуморальной недостаточности (группа 1). У этих пациентов отмечалось повышение уровня CD3+CD4+ Т-клеток (Т-хелперов) по сравнению с контрольными значениями. Уровень CD3+CD8+ Т-клеток (Т-цитотоксических лимфоцитов), напротив, имел тенденцию к снижению. Уровень CD3-CD16+CD56+ NK, CD19+ В-клеток не отличался от нормы. Имело место повышение по сравнению с нормой уровня провоспалительных ЦК IFN α , IL-1 β , TNF α , а также снижение уровня IL-2 и IFN γ – основных ЦК Тх1-звена адаптивного иммунного ответа.

Пациенты с аМСІ, имевшие повышение уровня маркеров системного воспаления и низкий уровень IgG (группа 2), характеризовались признаками

функциональной недостаточности как клеточного, так и гуморального звена адаптивного иммунного ответа: отсутствием повышения уровня CD3+CD4+ Т-хелперов и CD19+ В-клеток по сравнению с контрольной группой несмотря на наличие признаков системного воспаления, а также тенденцией к снижению уровня CD8+ Т-клеток. Уровень NK-клеток у части больных в этой подгруппе повышался по сравнению с нормой, однако признаков повышенной функциональной активации NK-клеток не было. Оценка уровня провоспалительных ЦК и их антагонистов показала, что имело место повышение уровня IFN α , IL-1 β , IL-10. В то же время уровень ЦК адаптивного иммунного ответа IL-2, IFN γ , IL-4 оставался нормальным.

У пациентов группы 3 (отсутствие низкоуровневого системного воспаления и нормальный уровень IgG) отмечалось нормальное содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток. Уровень CD19+ В-клеток и CD16+CD56+ NK-клеток также не отличался от значений контрольной группы. Содержание активированных HLA-DR+CD3-CD16+CD56 NK-клеток и HLA-DR+CD3+ Т-клеток было несколько снижено по сравнению с контролем. Таким образом, в данной подгруппе содержание субпопуляций лимфоцитов в целом было наиболее близким к норме. Также у данных пациентов повышался уровень Th2-цитокина IL-4, обладающего нейропротективными свойствами.

У пациентов группы 4, у которых отсутствовали признаки низкоуровневого системного воспаления, но имелось снижение показателей гуморального иммунитета, содержание CD4+ и CD8+ лимфоцитов, В-клеток было нормальным. Уровень CD16+CD56+ NK-клеток также не отличался от контрольных значений. Однако процентное содержание активированных HLA-DR+ NK-клеток было повышено по сравнению с контролем. Оценка уровня основных ЦК показала, что был выше нормы уровень провоспалительного цитокина IL-1 β .

Таким образом, пациенты с аМСІ, имевшие лабораторные признаки системного воспаления, характеризовались дисбалансом показателей иммунограммы, преимущественно затрагивающим противовирусные механизмы ответа и наиболее выраженным при снижении содержания IgG. При этом среди пациентов с наличием системного воспаления примерно у половины уровень IgG был низким, что может свидетельствовать об относительной недостаточности гуморального иммунного ответа. При отсутствии повышения маркеров системного воспаления показатели адаптивного иммунитета были более сбалансированными: часть пациентов этой группы также имела сниженный уровень IgG, но в данном случае он сопровождался компенсаторными изменениями: увеличением уровня В-клеток, повышением уровня активации NK-клеток.

Следует отметить, что у всех 8 обследованных в динамике пациентов, у которых в последующем в течение годового наблюдения развилась болезнь Альцгеймера или выраженная отрицательная динамика когнитивных функций, на момент первоначального обследования отмечались признаки низкоуровневого системного воспалительного ответа, с наличием или отсутствием гуморальной недостаточности. В то же время из 32 пациентов, когнитивные функции которых через 1 год наблюдения оставались стабильны, признаки низкоуровневого

системного воспалительного ответа в начальной точке наблюдения отмечались лишь у 12 ($p < 0,05$) (Рисунок 3). Таким образом, наличие системного воспалительного ответа являлось прогностически неблагоприятным при аМСІ.

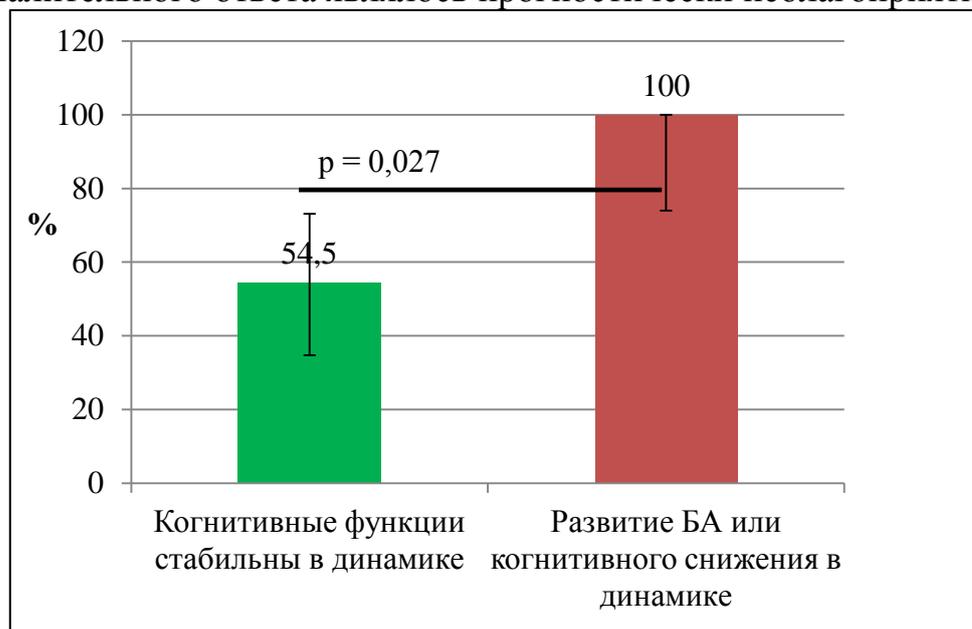


Рисунок 3 - Частота выявления низкоуровневого системного воспаления у больных с мягким когнитивным снижением (МСІ) в зависимости от клинической динамики когнитивных нарушений в течение 1 года (* - достоверные различия, $p < 0,05$)

На следующем этапе исследования была изучена динамика основных показателей иммунитета у пациентов с аМСІ, взаимосвязь между иммунологическими нарушениями и риском прогрессирования когнитивных нарушений при аМСІ.

В динамике годового наблюдения у пациентов с аМСІ, получивших курс терапии церебролизином, отмечалось заметное снижение сывороточного уровня маркеров воспаления: СРБ и TNF α . Так, в начале лечения уровень СРБ у большинства больных аМСІ был повышен (у 14 из 20 чел.) в среднем до $14,2 \pm 5,5$ мг/л (при норме от 0 до 5 мг/л), а после лечения происходило его снижение, которое было достоверным через 6 месяцев исследования ($5,5 \pm 3,6$ мг/л, $p = 0,017$). Уровень TNF α через 3 месяца имел тенденцию к повышению по сравнению с начальным уровнем, но в последующем он снижался и через 1 год наблюдения был достоверно ниже, чем в начале исследования ($1,61 \pm 0,93$ пг/мл и $0,2 \pm 0,39$ пг/мл, $p < 0,05$).

Уровень хемокина IL-8 в среднем в течение срока наблюдения достоверно не менялся. Но у пациентов, у которых через 3 месяца наблюдения клинический эффект от терапии отсутствовал, уровень IL-8 достоверно повышался в этой точке по сравнению с нормой. Пограничным значением уровня IL-8 через 3 месяца наблюдения в отношении взаимосвязи с клиническими показателями эффективности было 25 пг/мл. Так, из 10 пациентов, у которых уровень IL-8 был < 25 пг/мл, у 9 было выраженное клиническое улучшение и у 1 минимальное улучшение. Из 10 больных, имевших уровень IL-8 > 25 пг/мл, выраженное

улучшение отмечалось у 1, у 3 минимальное улучшение и у 6 клинический эффект не наблюдался (Рисунок 4). При сравнении результатов по нейропсихологической шкале МОСА в точке 3 месяца пациенты с уровнем IL-8 < 25 пг/мл показывали достоверно более высокий результат, чем при IL-8 > 25 пг/мл (Рисунок 5).

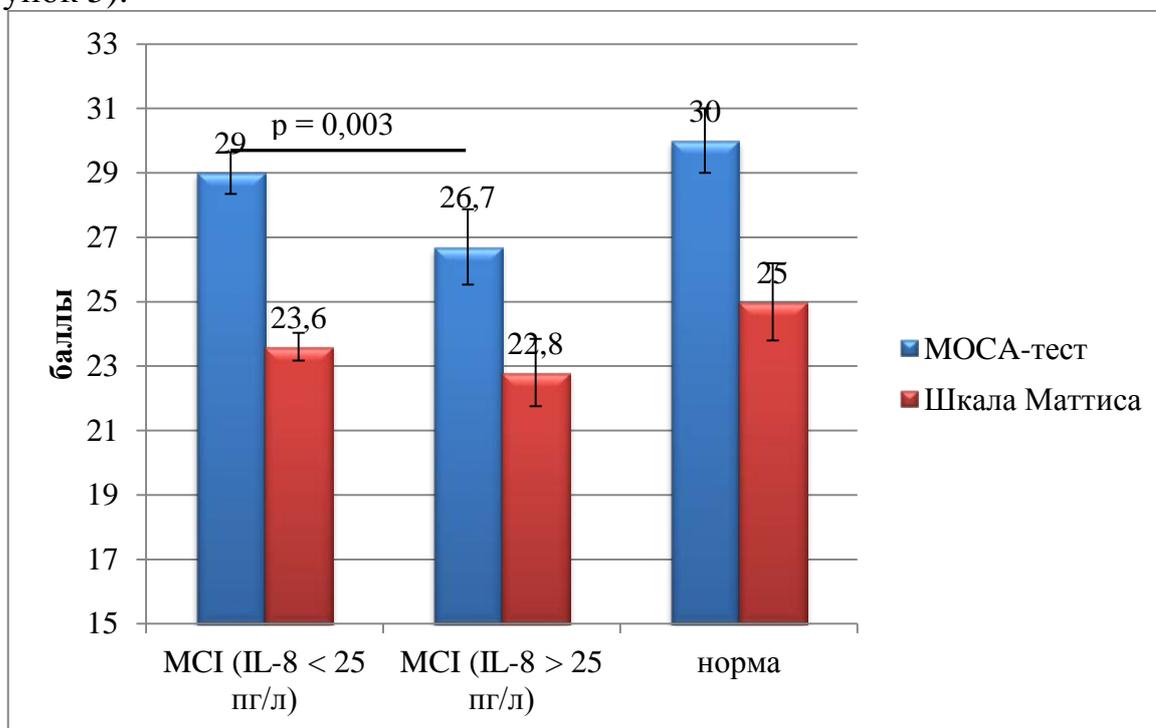


Рисунок 4 - Показатели нейропсихологических шкал у пациентов с мягким когнитивным снижением (аМСІ) на 10 неделе наблюдения в зависимости от уровня провоспалительного цитокина IL-8

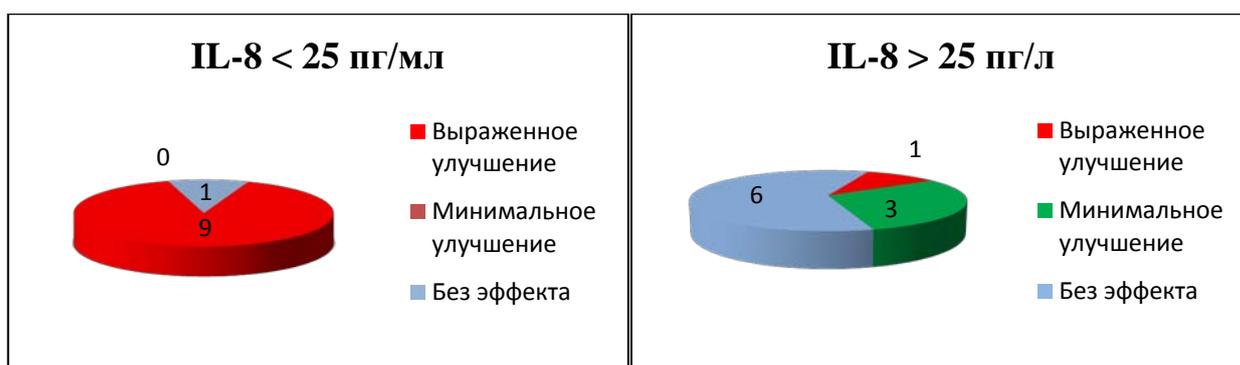
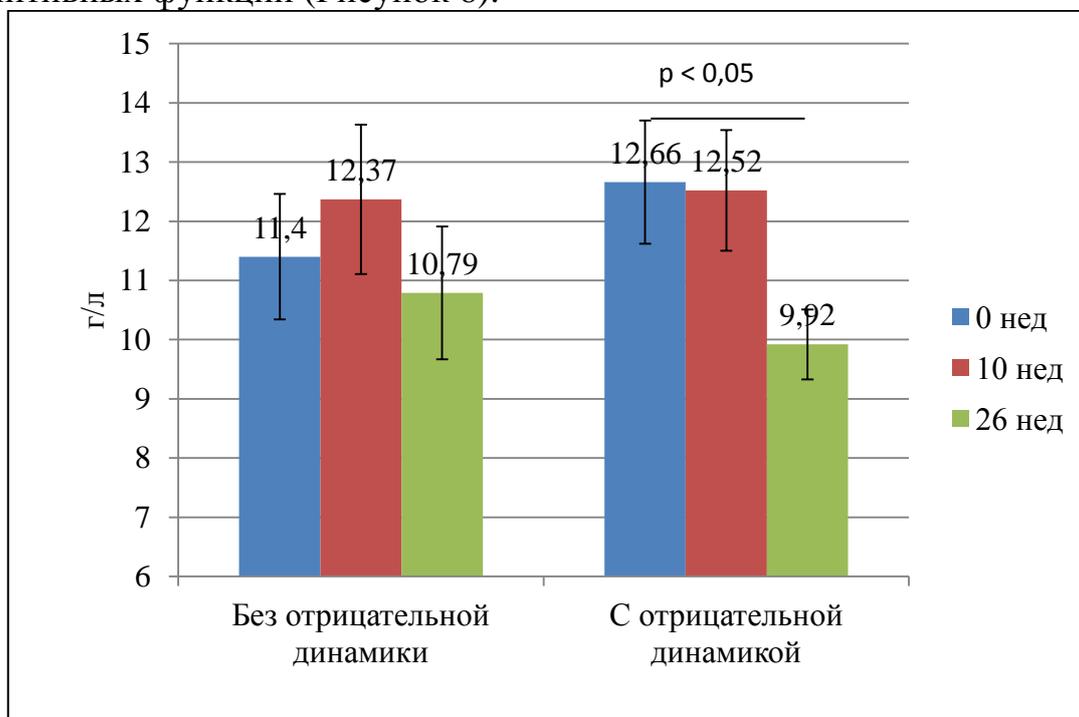


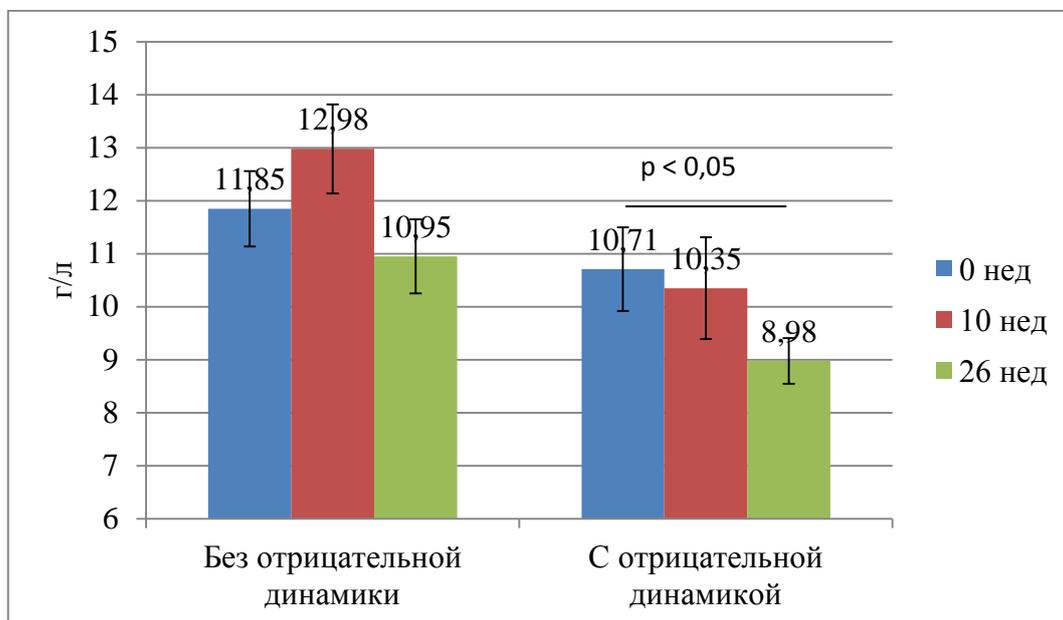
Рисунок 5 - Клинический эффект лечения на 10 неделе у пациентов с мягким когнитивным снижением (аМСІ) при уровне IL8 < 25 пг/мл (слева) и при уровне IL-8 > 25 пг/мл (справа)

Также нами изучалась динамика показателей гуморального иммунитета при различных иммунологических вариантах аМСІ. Результаты показали, что у пациентов с аМСІ, имевших признаки низкоуровневого системного воспаления в начале наблюдения, имелась связь между изменениями уровня общего иммуноглобулина G в ходе наблюдения и показателями когнитивных функций. Так, пациенты с аМСІ, у которых не отмечалось клинического эффекта от терапии

через 26 недель наблюдения, имели достоверное снижение уровня IgG в данной точке ($p < 0,05$) по сравнению с начальным уровнем, в отличие от больных с наличием клинического эффекта. Кроме того, снижение уровня IgG в точке 26 недель наблюдения было маркером дальнейшей неблагоприятной динамики когнитивных функций (Рисунок 6).



А.



Б.

Рисунок 6 - Изменения уровня общего IgG у пациентов с мягким когнитивным снижением (аМСІ) в зависимости от динамики когнитивных функций через 6 месяцев (А) и через 1 год (Б)

В четвертой главе дается оценка возможных причин выявленных изменений иммунитета, предположительной роли иммунологических расстройств в

прогрессировании аМСІ, а также обсуждается возможность использования иммунных показателей в комплексной оценке прогноза додементных когнитивных расстройств альцгеймеровского типа. Так, согласно полученным данным, повышение сывороточного уровня ІІ-8 у пациентов с аМСІ через 3 месяца исследования ассоциировалось с отсутствием оптимального клинического эффекта терапии. По данным литературы, ранее связь между изменением уровня этого хемокина в динамике и состоянием когнитивных функций у больных аМСІ не исследовалась. Повышение сывороточного уровня ІІ-8 является чувствительным маркером острого низкоуровневого системного воспаления и коррелирует со степенью активности заболеваний, сопровождаемых воспалительным ответом: хронической крапивницы, хронической инфекции мочевых путей, рака мочевого пузыря, рецидивирующего афтозного стоматита, неспецифического язвенного колита. Повышение уровня ІІ-8 в динамике наблюдения у части обследованных нами больных аМСІ, по-видимому, отражает активацию хронического воспалительного ответа на фоне терапии. Не исключено, что такая активация может быть связана с присоединением у некоторых больных субклинической вирусной или бактериальной инфекции или же с реактивацией скрытых вирусных и бактериальных инфекций, в том числе вызванных условно патогенными возбудителями. Определенную роль могут играть и нарушения кишечной микрофлоры у больных. Возникающее при этом системное воспаление может влиять на активацию микроглии ЦНС и негативно влиять на прогрессирование аМСІ.

Также в результате исследования было обнаружено, что снижение уровня ІgG в динамике наблюдения у пациентов с аМСІ, имеющих признаки системного воспалительного ответа, является маркером неблагоприятного долговременного прогноза. Ряд исследований свидетельствует о нейропротекторной роли ІgG, основного иммуноглобулина человека, при развитии БА. Кроме того, в преклинических исследованиях показано, что внутривенное введение ІgG (ВВИГ) оказывает благоприятное действие на клиренс А β из ЦНС и на иммунные показатели больных с БА. В единственном рандомизированном двойном слепом исследовании, где изучался эффект ВВИГ при аМСІ, показано, что ВВИГ в дозе 0,4 г/кг 10% раствора один раз в две недели пятикратно позволил добиться достоверного уменьшения атрофии мозга по данным МРТ в точке 12 месяцев после начала терапии, а также тенденции к уменьшению вероятности конверсии аМСІ в БА в точке через 12 месяцев после начала терапии.

Таким образом, были выявлены потенциальные иммунные биомаркеры, которые при оценке в динамике ассоциировались со среднесрочным риском прогрессирования когнитивных нарушений при аМСІ. На основе полученных данных были сформулированы практические рекомендации по иммунологическому обследованию в динамике больных аМСІ для оценки риска клинического прогрессирования.

ВЫВОДЫ

1. Маркеры низкоуровневого системного воспаления (С-реактивный белок > 5 мг/л, повышение уровня 2 и более цитокинов ІІ-1 β , ІІ-8, TNF α) встречались у

66% больных мягким когнитивным снижением (аМСІ) и у 40% пациентов с болезнью Альцгеймера. Средний уровень СРБ, ІЛ-1 β , TNF α был при аМСІ и болезни Альцгеймера повышен.

2. Уровень цитокина ІЛ-12 при аМСІ не отличался от нормы, а при болезни Альцгеймера в стадии начальной деменции был повышен, являясь потенциальным маркером прогрессирования заболевания.

3. Выделены четыре иммунологических варианта синдрома аМСІ в зависимости от наличия низкоуровневого системного воспаления и недостаточности гуморального иммунитета, отличающиеся по изменениям основных показателей врожденного и адаптивного иммунитета, особенностям клинической динамики.

4.1. Пациенты с системным воспалением без гуморальной недостаточности имели признаки дисбаланса адаптивного иммунного ответа со снижением активности его Th1-звена и сохранной функцией Th2-звена.

4.2. У больных с аМСІ, имевших системное воспаление и гуморальную недостаточность, на этом фоне отмечалась активация иммунорегуляторных механизмов, сниженная реактивность CD8⁺ цитотоксических Т-клеток и CD3-CD16+CD56⁺ NK-клеток, что указывает на угнетение противовирусной и антибактериальной иммунной защиты.

4.3. Больные без системного воспаления и гуморальной недостаточности характеризовались нормальными показателями клеточного иммунитета и уровнями продукции провоспалительных ЦК, а также повышением уровня Тх2-цитокина ІЛ-4.

4.4. Пациенты с аМСІ с недостаточностью гуморального иммунитета и без системного воспаления имели умеренные изменения показателей адаптивного и врожденного иммунитета, в основном носившие компенсаторный характер (увеличение уровня В-клеток, повышение уровня активированных CD3-CD16+CD56+HLA-DR⁺ NK-клеток, повышение уровня 1 провоспалительного цитокина ІЛ-1 β).

5. Выявление у пациентов с МСІ через 3 месяца после начала наблюдения признаков низкоуровневого системного воспаления с повышением уровня ІЛ-8 выше 25 пг/мл являлось маркером отсутствия благоприятной краткосрочной динамики когнитивных функций на фоне терапии церебролизином.

6. Прогрессирование когнитивных нарушений у пациентов с аМСІ в течение 1 года ассоциировалось с наличием низкоуровневого системного воспаления в начале наблюдения в сочетании со снижением уровня общего ІgG через 6 месяцев наблюдения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При дизайне исследований, включающих оценку иммунных показателей при аМСІ, необходимо учитывать гетерогенность иммунологических расстройств у больных и при необходимости анализировать отдельно результаты по группам пациентов, относящихся к различным иммунологическим фенотипам аМСІ. Предложенный в данной работе новый подход, основанный на выделении

фенотипов синдрома аМСІ по характеру преобладающих иммунных нарушений с учетом неоднородности больных по наличию низкоуровневого системного воспаления, гуморальной недостаточности, недостаточности Th1-ответа, может быть использован для дизайна последующих фундаментальных и клинических исследований.

2. Комплексное исследование показателей системного воспалительного ответа является информативным для оценки краткосрочного эффекта терапии у пациентов с аМСІ. Учитывая неблагоприятное влияние низкоуровневого системного воспаления на прогноз при аМСІ, рекомендуется определение маркеров острых и активных хронических вирусных и бактериальных инфекций у больных аМСІ с устойчивым комплексом признаков системного воспаления.

3. У пациентов с аМСІ, имеющих признаки низкоуровневого системного воспаления, рекомендуется оценка в динамике уровня общего IgG для прогнозирования риска прогрессирования когнитивных нарушений.

4. Является перспективным изучение эффективности терапии препаратами нормального человеческого иммуноглобулина в подгруппе пациентов с аМСІ, имеющих признаки системного воспаления и устойчивое снижение в динамике наблюдения уровня общего IgG ниже 1000 г%.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК России:

Krynskiy, S.A. The Role of Cytokines in Memory Consolidation / I.K. Malashenkova, S.A. Krynskiy, N.A. Khailov [et al.] // *Biology Bulletin Reviews*. – 2016. – V. 6, № 2. – P. 126-140 (РИНЦ, список ВАК).

Krynskiy, S.A. Levels of Proinflammatory Cytokines and Growth Factor VEGF in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment / I.K. Malashenkova, N.A. Hailov, S.A. Krynskiy [et al.] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2017. – V. 47, № 6. – P. 694-698 (Scopus).

Крынский, С.А. Влияние терапии церебролизином на нейропсихологический статус, показатели кислородтранспортной функции крови и системное воспаление при мягком когнитивном снижении амнестического типа / И.К. Малашенкова, С.А. Крынский, Н.А. Хайлов [и соавт.] // *Поликлиника*. – 2017. – Т. 4, № 2. – С. 48-55. (РИНЦ, список ВАК).

Крынский, С.А. Полиморфизм гена АРОЕ: влияние аллеля АРОЕ4 на системное воспаление и его роль в патогенезе болезни Альцгеймера / И.К. Малашенкова, С.А. Крынский, М.В. Мамошина [и соавт.] // *Медицинская иммунология*. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 301-310 (Scopus).

Крынский, С.А. Экспрессия маркеров воспаления и белков антиоксидантной защиты в гиппокампе при болезни Альцгеймера / С.А. Крынский, М.И. Сорокин, И.К. Малашенкова [и соавт.] // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. – 2017. – Т. 13, № 4. – С. 46-54 (РИНЦ, список ВАК).

Крынский, С.А. Противовоспалительные эффекты нейротрофической терапии (пилотное исследование) / И.К. Малашенкова, С.А. Крынский, Н.А.

Хайлов [и соавт.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 118, № 5. – С. 39-44 (Scopus).

Другие публикации и материалы конференций:

Malashenkova, I. Viral load and T-helper-1-cell cytokines in myalgic encephalomyelitis / I. Malashenkova, S. Krynskiy, D. Ogurtsov [et al.] // Journal of Neuroimmunology. – 2014. – V. 275, № 1-2. – P. 78-79 (Scopus).

Крынский, С.А. Факторы роста и цитокины при болезни Альцгеймера и мягком когнитивном расстройстве / С.А. Крынский, И.К. Малашенкова, Д.П. Огурцов [и соавт.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. – С. 313 (Scopus).

Malashenkova, I.K. Serum level of IL-12 and sVEGFR1/VEGF ratio in patients with cognitive disorders / I.K. Malashenkova, S.A.Krynskiy, N.A.Hailov [et al.] // Abstract Book, 4 European Congress of Immunology, 6-9 September 2015, Vienna, Austria. – С. 309.

Малашенкова, И.К. Уровень фактора роста нервов в сыворотке и эффективность церебролизина при когнитивных расстройствах / И.К. Малашенкова, Н.А. Хайлов, С.А. Крынский [и соавт.] // Сборник материалов Двенадцатого международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – М., 2016. – С. 266 – 267.

Малашенкова, И.К. Клеточный и гуморальный иммунитет у пациентов с болезнью Альцгеймера и мягким когнитивным расстройством / И.К. Малашенкова, Н.А. Хайлов, Г.В. Казанова, С.А. Крынский // Российский аллергологический журнал. – 2016. – №4-5. – С. 90-91 (РИНЦ, список ВАК).

Malashenkova, I.K. Systemic inflammation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / I.K. Malashenkova, N.A. Hailov, N.A. Didkovsky, S.A. Krynskiy [et al.] // Abstract Book, 31st International Conference of Alzheimer's Disease (ADI 2016). – 2016. - P. 303.

Малашенкова, И.К. Вирусные инфекции и нейропсихологический профиль когнитивных расстройств / И.К. Малашенкова, Н.А. Хайлов, С.А. Крынский [и соавт.] // Сборник материалов Первого Российского кристаллографического конгресса. – М., 2016. – С. 245.

Малашенкова, И.К. Эффекты нейротрофической терапии на системное воспаление, уровни BDNF, IGF-2 и NT-4 при синдроме мягкого когнитивного снижения / И.К. Малашенкова, Н.А. Хайлов, С.А. Крынский [и соавт.] // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, № SV. – С. 289 (Scopus).

Малашенкова, И.К. Программное применение церебролизина при мягком когнитивном снижении / И.К. Малашенкова, Н.А. Хайлов, С.А. Крынский [и соавт.] // Сборник материалов XIII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Россия, 30 мая - 10 июня 2017 г.). – 2017. – С. 269-270.