

Снижение экспрессии гена фактора некроза опухоли в мононуклеарных клетках крови при радиологически изолированном синдроме – валидация результатов транскриптомного анализа

Козин М.С.^{1,2}, Баулина Н.М.¹, Киселев И.С.¹, Кабаева А.Р.^{1,3}, Бойко А.Н.^{1,3}, Фаворова О.О.¹, Кулакова О.Г.¹

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва; ²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва; ³ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России, Москва

¹Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1; ²Россия, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а; ³Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 10

Радиологически изолированный синдром (РИС) – нозологическая форма, при которой у индивидов при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ) обнаруживаются поражения белого вещества головного и/или спинного мозга, характерные для рассеянного склероза (РС), при отсутствии клинических симптомов заболевания. Среди исследований, посвященных РИС, число работ, направленных на изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе его формирования, весьма мало. Ранее с помощью секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) мы впервые выявили значимые различия в профилях экспрессии ряда генов в мононуклеарных клетках (МНК) периферической крови лиц с РИС и здоровых обследованных, составивших контрольную группу.

Цель исследования – провести валидационный анализ изменений экспрессии генов CCR2, CX3CR1 и TNF, которые наблюдались при NGS в МНК лиц с РИС, по сравнению со здоровыми обследуемыми.

Пациенты и методы. Анализ экспрессии генов CCR2, CX3CR1 и TNF проводили на независимых валидационных выборках (в МНК 14 человек с РИС и 14 – без РИС) методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени.

Результаты и обсуждение. В МНК обследованных с РИС значимо понижена экспрессия гена TNF по сравнению со здоровыми ($p=0,035$; $FC=0,78$). Для других генов значимых различий в уровнях экспрессии не обнаружено.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о предшествующих клиническим проявлениям РС нарушениях экспрессии гена TNF, по меньшей мере у индивидов с РИС, что может приводить к дальнейшим нарушениям регуляции ряда процессов.

Ключевые слова: радиологически изолированный синдром; рассеянный склероз; экспрессия генов; фактор некроза опухоли; ген TNF.

Контакты: Максим Сергеевич Козин; kozinmax1992@gmail.com

Для ссылки: Козин МС, Баулина НМ, Киселев ИС и др. Снижение экспрессии гена фактора некроза опухоли в мононуклеарных клетках крови при радиологически изолированном синдроме – валидация результатов транскриптомного анализа. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2022;14(Прил. 1):16–20. DOI: 10.14412/2074-2711-2022-1S-16-20

Reduced expression of the tumor necrosis factor gene in blood mononuclear cells in radiologically isolated syndrome – validation of transcriptome analysis results

Kozin M.S.^{1,2}, Baulina N.M.¹, Kiselev I.S.¹, Kabaeva A.R.^{1,3}, Boyko A.N.^{1,3}, Favorova O.O.¹, Kulakova O.G.¹

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow;

²National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of Russia, Moscow;

³Federal Center for Brain and Neurotechnologies, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow

¹1, Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia; ²15A, Third Cherepkovskaya St., Moscow 121552, Russia;

³1, Ostrovityanova St., Build. 10, Moscow 117997, Russia

Radiologically isolated syndrome (RIS) is a nosological form in which magnetic resonance imaging (MRI) reveals lesions of the white matter of the brain and/or spinal cord characteristic of multiple sclerosis (MS) in individuals in the absence of clinical symptoms of the disease. Among the studies devoted to RIS, the number of works aimed at studying the molecular mechanisms underlying its formation is very small. Previously, using next generation sequencing (NGS), we for the first time revealed significant differences in the expression profiles of several genes in peripheral blood mononuclear cells (MNCs) of individuals with RIS and healthy controls.

Objective: to conduct a validation analysis of changes in the expression of the CCR2, CX3CR1, and TNF genes that were observed during NGS in the MNCs of individuals with RIS compared with healthy individuals.

Patients and methods. Analysis of the expression of the CCR2, CX3CR1, and TNF genes was performed on independent validation cohorts (in MNCs of 14 subjects with RIS and 14 without RIS) by reverse transcription followed by real-time PCR.

Results and discussion. In MNCs of subjects with RIS, the TNF gene expression was significantly reduced compared to healthy controls ($p=0.035$; $FC=0.78$). No significant differences in expression levels were found for other genes.

Conclusion. The obtained data shows that disturbances of TNF gene expression preceding the clinical manifestations of MS, at least in individuals with RIS, which can lead to further dysregulation of several processes.

Keywords: radiologically isolated syndrome; multiple sclerosis; gene expression; tumor necrosis factor; TNF gene.

Contact: Maxim Sergeevich Kozin; kozinmax1992@gmail.com

For reference: Kozin MS, Baulina NM, Kiselev IS, et al. Reduced expression of the tumor necrosis factor gene in blood mononuclear cells in radiologically isolated syndrome – validation of transcriptome analysis results. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika* = *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2022;14(Suppl 1):16–20. DOI: 10.14412/2074-2711-2022-1S-16-20

Радиологически изолированный синдром (РИС) – нозологическая форма, при которой у индивидов при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ) мозга обнаруживаются поражения белого вещества головного и/или спинного мозга, характерные для рассеянного склероза (РС), при отсутствии клинических симптомов этого заболевания и других причин, способных объяснить изменения на МРТ [1, 2]. Как правило, у этих людей отсутствуют специфические неврологические жалобы, а МРТ проводится по другим причинам: диспансерные осмотры, незначительные травмы головы, головная боль и пр. [3]. Термин «радиологически изолированный синдром» и критерии для постановки этого диагноза впервые были введены в 2009 г. D.T. Okuda и соавт. [1]. Позднее критерии были модифицированы в согласительном докладе группы MAGNIMS и частично включены в пересмотр критериев McDonald 2017 г. [4].

К настоящему времени проведено несколько когортных исследований, в которых установлено, что лица с РИС находятся в группе высокого риска развития РС [2, 5]. Обнаружено, что РС развивается у 34% лиц с РИС в течение 5 лет с момента постановки диагноза и у 51,2% – в течение 10 лет [2, 5]. В связи с этим возникают важные вопросы о причинах возникновения РИС, вариативности его течения и причинах перехода в РС, а также принципиальный для клинической практики вопрос об использовании препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза, для индивидов с РИС [6, 7].

Исследования последних лет в основном были сосредоточены на выявлении признаков, позволяющих прогнозировать высокую вероятность перехода этого состояния в РС. По данным крупного мультицентрового исследования, включающего 451 человека с РИС, факторами риска перехода РИС в РС служат наличие очагов демиелинизации в спинном мозге, молодой возраст и мужской пол [2, 5]. Наличие олигоклональных иммуноглобулинов класса G [8] легких цепей нейрофиламентов [8], програнулина [9], интерлейкина 8 [10] и антител к сорцину [11] в цереброспинальной жидкости также ассоциировано с более высоким риском развития РС у лиц с РИС.

В то же время исследований молекулярных механизмов, лежащих в основе развития РИС, в литературе почти не представлено. Ранее с помощью секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) мы впервые выявили значимые различия в профилях экспрессии

генов в мононуклеарных клетках (МНК) периферической крови индивидов с РИС и здоровых представителей контрольной группы и провели анализ перепредставленности дифференциально экспрессированных генов в наборах генов, аннотированных в базе Gene Ontology (GO) [12]. В связи с большим количеством гипотез, одновременно проверяемых при использовании NGS, эти данные нуждаются в валидации.

Цель исследования – провести на независимой выборке пациентов с РИС и здоровых индивидов валидацию методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) результатов транскриптомного профилирования для генов, наиболее представленных в выявленных наборах генов, аннотированных в GO: генов рецепторов хемокинов – *CCR2*, *CX3CR1* и гена фактора некроза опухоли (ФНО) – *TNF*.

Пациенты и методы. В исследование включены 14 родственников индивидов с РИС (10 женщин и 4 мужчины) и 14 соответствующих им по полу и возрасту здоровых индивидов контрольной группы. Обследуемые с РИС наблюдались в «Федеральном центре мозга и нейротехнологий». Демографические и клинические характеристики исследуемых групп представлены в табл. 1. Исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им Н.И. Пирогова Минздрава России. Все участники давали информированное согласие на участие в исследовании. Диагноз РИС ставился согласно критериям D.T. Okuda и соавт. 2009 г. [1]. Все индивиды с РИС проходили МРТ-исследование на одном приборе, магнитное поле не менее 1,5 Тл, по единому протоколу, включающему последовательности FLAIR, T1, T2, SWAN, DWI и STIR.

МНК выделяли из периферической крови методом центрифугирования на градиенте фиколл-гистопак (Sigma-Aldrich, США) спустя не более 3 ч с момента забора крови. Затем клетки лизировали при помощи QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Германия) и хранили при температуре -80°C до дальнейших манипуляций. Для выделения из клеточных лизатов тотальной РНК применяли набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Анализ уровней экспрессии генов *CCR2*, *CX3CR1* и *TNF* в МНК проводили методом обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР). Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку уровней экспрессии методом

Таблица 1. Клиническая и демографическая характеристика обследованных группы РИС и контрольной группы

Table 1. Clinical and demographic characteristics of individuals with RIS and of control group

Показатель	Группа РИС (n=14)	Контрольная группа (n=14)
Мужчины/женщины	4/10	4/10
Возраст, годы, M±SD	35,3±6,4	35,2±8,4
Причина проведения МРТ, n:		—
диспансерный осмотр	3	
головная боль	6	
травма головы	2	
головокружение	2	
астения	1	
Результаты МРТ, n:		—
спинальные очаги	4	
корковые очаги	10	
очаги в стволе мозга	1	

Примечание. М — среднее значение; SD — стандартное отклонение.

ПЦР в реальном времени проводили с помощью SYBR[™] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[™]) с использованием праймеров, представленных в табл. 2.

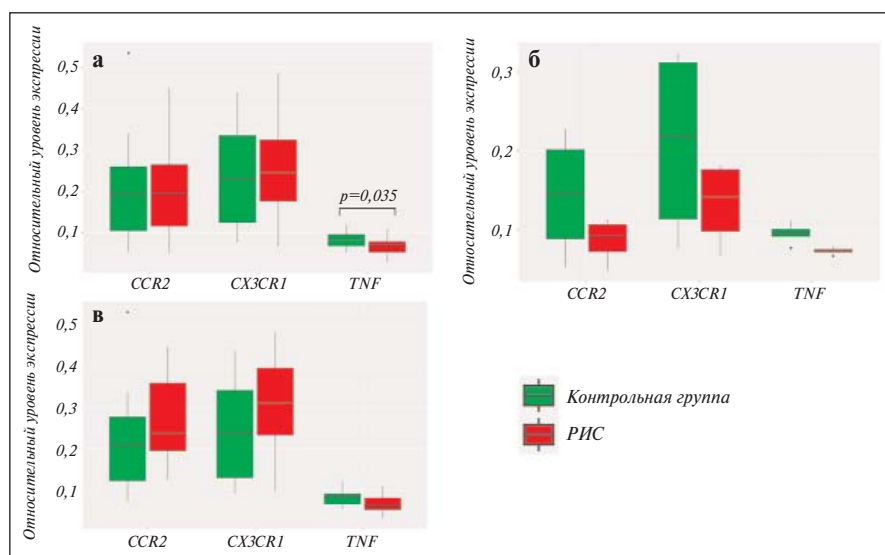
Уровень экспрессии исследуемых генов нормализовали на экспрессию гена *GAPDH*. Вычисление относительной экспрессии (fold change, FC) исследуемых генов проводили с использованием метода дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta C_t$) [13]. Значимость различий в уровнях экспрессии генов между исследуемыми группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали изменения при $p < 0,05$.

Результаты. При сравнении уровней экспрессии генов *CCR2*, *CX3CR1* и *TNF* в МНК включенных в исследование обследуемых с РИС и

Таблица 2. Праймеры, использованные для количественной ПЦР

Table 2. Primers used for quantitative PCR

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>CCR2</i>	5' GACCAGGAAAAGATGTGAAAGTGA 3'	5' GCTCTGCCAATTGACTTTCTCTT 3'
<i>CX3CR1</i>	5' GTGGTGCTGACAAAGCTTGGA 3'	5' TCACTGGGTGCCATCGTAAGAA 3'
<i>TNF</i>	5' GTCAACCTCTCTCTGCCAT 3'	5' CCAAAGTAGACCTGCCCAAGA 3'
<i>GAPDH</i>	5' GACTCATGACCACAGTCCATGC 3'	5' AGAGGCAGGGATGATGTTCT 3'



Уровни экспрессии генов *CCR2*, *CX3CR1* и *TNF* в группе РИС и в контрольной группе по результатам количественной ПЦР в реальном времени в объединенной выборке (а), у мужчин (б) и женщин (в)

Expression levels of the *CCR2*, *CX3CR1* and *TNF* genes in the RIS group and in the control group according to the results of quantitative real-time PCR in the pooled sample (a), in men (b) and women (c)

лиц контрольной группы значимые различия наблюдались для гена *TNF* (см. рисунок, а). Его экспрессия была снижена в группе РИС ($p=0,035$; $FC=0,78$), что воспроизводит результаты транскриптомного профилирования в работе [12]. При аналогичном сравнении отдельно для мужчин (см. рисунок, б) и женщин (см. рисунок, в) уровни экспрессии гена *TNF* при РИС также были ниже, чем у обследуемых контрольной группы, однако значимых различий обнаружено не было ($p=0,57$; $FC=0,77$ и $p=0,14$; $FC=0,79$ соответственно).

Для генов *CCR2* и *CX3CR1* значимых различий не выявлено ни в общей группе ($p=0,70$; $FC=1,09$ и $p=0,84$; $FC=1,09$; см. рисунок, а), ни отдельно у мужчин ($p=0,49$; $FC=0,66$ и $p=0,49$; $FC=0,69$, см. рисунок, б), ни отдельно у женщин ($p=0,35$; $FC=1,32$ и $p=0,53$; $FC=1,31$; см. рисунок, в). При этом обращает на себя внимание факт, что для этих генов наблюдаются разнонаправленные изменения в группах мужчин ($FC=0,69$) и женщин ($FC=1,31$).

Обсуждение. В нашей предыдущей работе [12] мы впервые провели сравнение методом NGS профилей транскрипции в МНК обследуемых с РИС и здоровых индивидов контрольной группы и наблюдали значимые различия в уровнях экспрессии 57 генов. Анализ перепредставленности в наборах генов, аннотированных в GO, позволил найти 16 наборов, значимо перепредставленных этими генами; оказалось, что большая часть этих наборов связаны с процессами миграции лейкоцитов, с регуляцией иммунной системы, а также с цитокиновым и хемокиновым сигналингом. Среди дифференциально экспрессирующихся генов три были представлены почти во всех найденных наборах GO: гены *TNF* и *CCR2* входили в 15 наборов, а ген *CX3CR1* — в 13 наборов. Эти гены были выбраны для последующей валидации как наиболее репрезентативные.

Проведенный нами валидационный анализ данных NGS [12] методом ОТ-ПЦР подтвердил, что в МНК индивидов с РИС значимо понижена экспрессия гена *TNF* по сравнению со здоровыми. В то же время нам не удалось подтвердить данные NGS о дифференциальной экспрессии генов хемокиновых рецепторов *CCR2* и *CX3CR1*; это может быть связано с большими разбросами в индивидуальном уровне экспрессии указанных генов, что можно преодолеть только путем увеличения размера выборок.

Ранее было показано, что одним из основных цитокинов, играющих ключевую роль в РС, является ФНО, кодируемый геном *TNF* [14]. Полученные в настоящей работе результаты показывают, что нарушение экспрессии гена *TNF* происходит еще до клинического дебюта РС, по крайней мере у пациентов с РИС. Уменьшение уровня экспрессии гена *TNF* также показано в работе [15], где сравнивали транскриптом МНК индивидов за 9 лет до развития РС с транскриптомом обследуемых, которые через 9 лет после транскрипционного профилирования оставались здоровыми. Это наблюдение согласуется с нашими данными и позволяет предположительно распространить сделанный нами вывод о предшествующем РС нарушении экспрессии гена *TNF* на любых больных РС, независимо от наличия у них

РИС, поскольку трудно представить, что все участники описываемого проспективного исследования проходили через стадию РИС.

Долгое время ФНО рассматривали исключительно в качестве одного из ключевых регуляторов воспалительных реакций. Однако в настоящее время признано, что ФНО — плейотропный цитокин; спектр его известных функций значительно расширился [14]. Показано, что ФНО участвует не только в разнонаправленной регуляции аутоиммунных реакций, включая поддержание популяции регуляторных Т-лимфоцитов [16], но и в процессах нейрональной передачи сигнала, миелинизации нейронов и регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера [17].

Система ФНО-сигналинга включает как минимум два лиганда (растворимый и трансмембранный ФНО) и два рецептора (TNFR1 и TNFR2). И лиганды, и рецепторы по-разному экспрессируются и регулируются в разных типах клеток и могут участвовать в процессах, вовлеченных в патогенез РС. Можно предположить, что выявленное нами снижение экспрессии гена *TNF* у индивидов с РИС способствует уменьшению передачи сигнала через TNFR2, который участвует в поддержании гомеостаза клеток нервной системы. Это предположение находится в соответствии с опубликованными ранее результатами анти-ФНО-терапии при лечении аутоиммунных заболеваний, при которой в качестве побочных эффектов отмечались нейровоспалительные процессы и демиелинизация в центральной нервной системе [18–21], при этом использование анти-ФНО-терапии для лечения РС не приводило к улучшению состояния больных, а в некоторых случаях вызывало ускорение прогрессирования заболевания [22–24].

Заключение. В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о предшествующих клиническим проявлениям РС нарушениях экспрессии гена *TNF*, по меньшей мере в МНК индивидов с РИС. Для других генов, рассматриваемых в настоящей работе, по-видимому, необходимы дополнительные исследования на расширенной выборке.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009 Mar 3;72(9):800–5. doi: 10.1212/01.wnl.0000335764.14513.1a. Epub 2008 Dec 10.
- Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, et al; 10-year RISC study group on behalf of SFSEP, OFSEP. Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event. *Ann Neurol*. 2020 Aug;88(2):407–17. doi: 10.1002/ana.25799. Epub 2020 Jun 29.
- Кабаева АР, Бойко АН, Кулакова ОГ, Фаворова ОО. Радиологически изолированный синдром: прогноз и предикторы трансформации в рассеянный склероз. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2020;120(7–2):7–12. doi: 10.17116/jnevro20201200727
- [Kabaeva AR, Boyko AN, Kulakova OG, Favorova OO. Radiologically isolated syndrome: prognosis and predictors of conversion to multiple sclerosis. *Zhurnal nevrologii i psikhatrii imeni S.S. Korsakova*. 2020;120(7–2):7–12. doi: 10.17116/jnevro20201200727 (In Russ.)].
- De Stefano N, Giorgio A, Tintore M, et al; MAGNIMS study group. Radiologically isolated syndrome or subclinical multiple sclerosis: MAGNIMS consensus recommendations. *Mult Scler*. 2018 Feb;24(2):214–21. doi: 10.1177/1352458517717808
- Okuda DT, Siva A, Kantarci O, et al; Radiologically Isolated Syndrome Consortium (RISC); Club Francophone de la Sclerose en Plaques (CFSEP). Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PLoS One*. 2014 Mar 5;9(3):e90509. doi: 10.1371/journal.pone.0090509. eCollection 2014.
- Labiano-Fontcuberta A, Benito-Leon J. Radiologically isolated syndrome should be treated with disease-modifying therapy — No. *Mult Scler*. 2017 Dec;23(14):1820–1. doi: 10.1177/1352458517726385. Epub 2017 Sep 14.
- Thouvenot E. Should we treat patients with radiologically isolated syndrome (RIS)? Yes. *Rev Neurol (Paris)*. 2018 Dec;174(10):689–92. doi: 10.1016/j.neurol.2018.05.001. Epub 2018 Jul 2.
- Matute-Blanch C, Villar LM, Alvarez-Cermenon JC, et al. Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. *Brain*. 2018 Apr 1;141(4):1085–93. doi: 10.1093/brain/awy021
- Pawlitzi M, Sweeney-Reed CM, Bittner D, et al. CSF-Progranulin and Neurofilament Light Chain Levels in Patients With Radiologically Isolated Syndrome — Sign of

- Inflammation. *Front Neurol*. 2018 Dec 18;9:1075. doi: 10.3389/fneur.2018.01075
10. Rossi S, Motta C, Studer V, et al. Subclinical central inflammation is risk for RIS and CIS conversion to MS. *Mult Scler*. 2015 Oct; 21(11):1443-52. doi: 10.1177/1352458514564482. Epub 2015 Jan 12.
11. Sehitoğlu E, Cavus F, Ulusoy C, et al. Sorcin antibody as a possible predictive factor in conversion from radiologically isolated syndrome to multiple sclerosis: a preliminary study. *Inflamm Res*. 2014 Oct;63(10):799-801. doi: 10.1007/s00011-014-0754-0. Epub 2014 Jul 8.
12. Kozin M, Kiselev I, Baulina N, et al. Global transcriptome profiling in peripheral blood mononuclear cells identifies dysregulation of immune processes in individuals with radiologically isolated syndrome. *Mult Scler Relat Disord*. 2022 Feb;58:103469. doi: 10.1016/j.msard.2021.103469. Epub 2021 Dec 20.
13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
14. Fresegna D, Bullitta S, Musella A, et al. Re-Examining the Role of TNF in MS Pathogenesis and Therapy. *Cells*. 2020 Oct 14;9(10):2290. doi: 10.3390/cells9102290
15. Achiron A, Grotto I, Balicer R, et al. Microarray analysis identifies altered regulation of nuclear receptor family members in the pre-disease state of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2010 May;38(2):201-9. doi: 10.1016/j.nbd.2009.12.029. Epub 2010 Jan 14.
16. Ronin E, Pouchy C, Khosravi M, et al. Tissue-restricted control of established central nervous system autoimmunity by TNF receptor 2-expressing Treg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 30;118(13):e2014043118. doi: 10.1073/pnas.2014043118
17. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 2015 Aug 27;302: 2-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.038. Epub 2015 Jun 24.
18. Kaltsonoudis E, Zikou AK, Voulgari PV, et al. Neurological adverse events in patients receiving anti-TNF therapy: a prospective imaging and electrophysiological study. *Arthritis Res Ther*. 2014 Jun 17;16(3):R125. doi: 10.1186/ar4582
19. Kunchok A, Aksamit AJ, Davis JM 3rd, et al. Association Between Tumor Necrosis Factor Inhibitor Exposure and Inflammatory Central Nervous System Events. *JAMA Neurol*. 2020 Aug 1;77(8):937-46. doi: 10.1001/jama-neurol.2020.1162
20. Cortese R, Prosperini L, Stasolla A, et al. Clinical course of central nervous system demyelinating neurological adverse events associated with anti-TNF therapy. *J Neurol*. 2021 Aug;268(8):2895-9. doi: 10.1007/s00415-021-10460-6. Epub 2021 Feb 20.
21. Kopp TI, Delcoigne B, Arkema EV, et al. Risk of neuroinflammatory events in arthritis patients treated with tumour necrosis factor alpha inhibitors: a collaborative population-based cohort study from Denmark and Sweden. *Ann Rheum Dis*. 2020 May;79(5):566-72. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216693. Epub 2020 Mar 11.
22. Skurkovich S, Boiko A, Beliaeva I, et al. Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2001 Oct;7(5):277-84. doi: 10.1177/135245850100700502
23. Van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, et al. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*. 1996 Dec;47(6):1531-4. doi: 10.1212/wnl.47.6.1531
24. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology*. 1999 Aug 11;53(3):457-65.

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

17.03.2021/20.05.2022/22.05.2022

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-015-00073. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

This work was supported by Russian Foundation for Basic Research grant № 20-015-00073. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Козин М.С. <https://orcid.org/0000-0001-6587-1243>

Баулина Н.М. <https://orcid.org/0000-0001-8767-2958>

Киселев И.С. <http://orcid.org/0000-0003-3366-4113>

Кабаева А.Р. <https://orcid.org/0000-0002-0982-8520>

Бойко А.Н. <https://orcid.org/0000-0002-2975-4151>

Фаворова О.О. <https://orcid.org/0000-0002-5271-6698>

Кулакова О.Г. <https://orcid.org/0000-0002-5321-3101>