

УДК 612.017.11:616.832-004.2

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ  
БИОМАРКЕРОВ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

Коляда Т.И., Зеленская А.Д., Тупотилов А.В.

**Государственное учреждение «Институт  
микробиологии и иммунологии им. И.И.  
Мечникова Национальной академии медицинских  
наук Украины»**

Фенотипическая и патогенетическая гетерогенность рассеянного склероза (РС) требует привлечения современных объективных методов оценки предрасположенности к развитию заболевания, его ранней диагностики, оценки и прогнозирования течения заболевания и эффективности терапии. Развитие персонализированной медицины в Украине, применение её принципов для ведения пациентов с рассеянным склерозом наряду с использованием усовершенствованных «классических» методов исследования биомаркеров требует внедрения также и современных методов, в том числе использования биочипов нового поколения, методов и технологий системной биологии. Группа «классических» методов, применяемых для исследования биомаркеров РС, включает в себя физико-химические и иммунологические методы, направленные на выделение и идентификацию одиночных молекулярных биомаркеров, а также методы молекулярно-генетического анализа. Дополнение «классических» и microarray лабораторных методов методами биоинформатики позволяет не только находить новые биомаркеры, но и выявлять сложные паттерны биомаркеров, информативность которых поодиночке не достаточна. Технологии геномики используются для выявления генных вариантов, связанных с предрасположенностью к заболеванию, но не позволяют ответить на вопрос о причинно-следственных связях между полиморфизмом конкретных генов и патогенезом рассеянного склероза. Современные исследования биомаркеров степени тяжести заболевания, его прогрессирования, патогенетического типа, эффективности терапии основаны на технологиях транскриптомики, протеомики и метаболомики.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, биомаркер, мононуклеарные фагоциты, геномика, протеомика, метаболомика

Демиелинизирующие заболевания нервной системы, в частности рассеянный склероз (РС), являются глобальной медицинской и социально-экономической проблемой в большинстве развитых стран мира. Данная группа заболеваний занимает ведущее место среди факторов нетравматической природы, которые приводят к потере трудо- и работоспособности взрослых людей. Исследование патогенеза РС, разработка методов его лечения и

диагностики является одним из самых актуальных направлений современной медицины и биотехнологии [1].

**Ведение** (диагностика и лечение) такого сложного заболевания, как РС, требует получения сведений об основных физиологических процессах, необходимых для принятия клинических решений или для выявления, определения и оценки новых терапевтических мишеней. Визуализация активности заболевания с помощью магнитно-резонансной томографии лишь частично коррелирует с клиническими показателями прогрессирования заболевания, такими как частота рецидивов или показатели расширенной шкалы инвалидизации. Несмотря на существование клинических и нейровизуализационных признаков прогностически благоприятного и неблагоприятного РС, в ряде случаев при наличии комплекса благоприятных критериев у пациента может развиваться злокачественный прогрессивный тип течения. Довольно часто наблюдается прогрессирование заболевания без признаков активности процесса по данным магнитно-резонансной томографии и наоборот [2]. До сих пор нет никаких четких объективных клинических критериев для диагностики или прогнозирования типа клинического течения, признаков прогрессирования заболевания, прогноза злокачественности течения РС, реакции на лечение.

Развитие РС является результатом сложного взаимодействия между факторами окружающей среды, генетическими факторами, определяющими индивидуальную чувствительность, а также иммунологическими и физиологическими особенностями пациента. Формирование уникального для каждого пациента «сценария» развития РС связано с действием различных этиологических факторов и участием большого количества взаимодействий и механизмов, что порождает множество патологических «фенотипов». Накопленные на сегодняшний день данные об особенностях этиологии, патогенеза, клинического течения и терапии РС свидетельствуют о необходимости персонализированного подхода к ведению пациентов с данным заболеванием. Такими особенностями являются наличие большого числа возможных этиологических факторов и триггерных механизмов, запускающих развитие заболевания, наличие различных типов течения РС, а также существенные различия в эффективности терапии больных. Фенотипическая и патогенетическая гетерогенность данного заболевания требует, с одной стороны, стратификации пациентов на группы, лечение в которых будет различаться в зависимости от ряда критериев, в том числе генетических особенностей, типа течения болезни, стадии патологического процесса, формы заболевания. С другой стороны - привлечения современных объективных методов оценки предрасположенности к развитию РС, его ранней диагностики, оценки и прогнозирования течения заболевания и эффективности терапии. В основе этого подхода - выявление и определение биомаркеров РС,

использование методов и технологий системной биологии - геномики, протеомики, метаболомики, биоинформатики [1].

Понятие «биомаркер» предусматривает биологическую характеристику, которая может быть измерена объективно, является воспроизводимой и служит оцениваемым показателем биологических, патологических или фармакологических процессов, реакций, изменения условий. В свою очередь понятие «показатель течения заболевания» относится к биомаркеру, который способен заменить значимый клинический показатель, а также предназначен для прогнозирования терапевтического эффекта. Это значит, что биомаркер предоставляет информацию о клиническом прогнозе или эффективности терапии, а также имеет сильную и значимую корреляцию с клиническим показателем заболевания. Кроме того, биомаркер является клинически полезным в том случае, когда время его определения короче, чем время определения клинического показателя, или же он дает более объективную информацию о течении заболевания, является более чувствительным, чем клинические показатели. Классификация биомаркеров представляет собой непростую задачу. В литературе часто встречается деление на генетические, иммунологические и молекулярные (биохимические) маркеры. В то же время, при классификации биомаркеров РС целесообразно учитывать одновременно несколько критериев [3].

Во-первых, типы биомаркеров можно рассматривать с точки зрения решаемой задачи. При этом можно выделить: биомаркеры риска развития заболевания, в т.ч. маркеры наследственной (семейной) предрасположенности; диагностические биомаркеры, служащие для постановки диагноза заболевания, определения стадии и формы заболевания, типа его течения; прогностические биомаркеры, позволяющие как выявлять скрытые признаки прогрессирования заболевания, так и прогнозировать эффективность терапии [4].

Во-вторых, биомаркеры РС можно разделить по локализации относительно физиологических компартментов и сред организма. Патогенетические механизмы РС сосредоточены в двух основных физиологических компартментах: периферической крови, в которой происходят основные иммунные процессы, и собственно мозге, повреждения тканей которого сопровождается формированием очагов острого воспаления и приводит к развитию характерных симптомов и инвалидности. Отдельно можно выделить патогенетические механизмы, связанные с нарушениями проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) – например, патологическое проникновение некоторых иммунных клеток в мозг. В каждом из этих компартментов, а также структур, входящих в состав ГЭБ, изменения в экспрессии генов, определенный набор белков и типов клеток, физиологических реакций являются характерными патологическими признаками при РС - как начала заболевания, так и рецидивов, ремиссии, а также переключения типа течения заболевания и изменения типа протекающих патологических

процессов. Таким образом, можно говорить о биомаркерах, отражающих процессы в ЦНС, периферической крови и ГЭБ. Кроме того, можно говорить о растворимых биомаркерах в ликворе и сыворотке крови, биомаркерах, определяемых в культуральной среде *in vitro*, внутриклеточных биомаркерах и поверхностных клеточных маркерах. Очевидную практическую ценность имеют, прежде всего, биомаркеры периферической крови, что обусловлено доступностью соответствующего биоматериала [3-5].

Наконец, тип биомаркеров зависит от их природы. В этом случае можно говорить о молекулярных биомаркерах, например, нуклеиновых кислотах, белках, липидах, различных низкомолекулярных метаболитах. Кроме того, в качестве биомаркера можно рассматривать функциональное состояние некоторых типов клеток, таких как клетки микроглии, моноклеарные фагоциты периферической крови, лимфоциты. Так, моноклеарные фагоциты, которые являются одними из наиболее чувствительных клеток иммунной системы, способны на самых ранних этапах реагировать даже на незначительные патологические процессы в организме. Предполагается, что оценка их функционального состояния может быть важной и информативной как для диагностики и оценки течения РС, так и прогнозирования эффективности терапии [3, 6].

Исследование и практическое использование биомаркеров РС в клинической и лабораторной практике требует привлечения широкого спектра современных медико-биологических, математических и физико-химических методов. Выбор конкретных методов исследования зависит как от типа биомаркеров, так и от этапа исследования. При этом можно выделить три основных этапа исследования биомаркеров РС: поиск новых маркеров-кандидатов; верификация и клинические испытания выявленных маркеров-кандидатов; собственно лабораторная диагностика с использованием верифицированных маркеров заболевания. Наибольшее количество «классических» и «новых» лабораторных и инструментальных методов, а также методов системной биологии используется на этапе поиска новых маркеров-кандидатов [3, 4].

Группа «классических» методов, применяемых для исследования биомаркеров РС, включает в себя физико-химические и иммунологические методы, направленные на выделение и идентификацию одиночных молекулярных биомаркеров, а также методы молекулярно-генетического анализа. К ним можно отнести иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, изоэлектрическое фокусирование, иммуногистохимические методы, проточную цитометрию, спектрофотометрические и нефелометрические методы. Данные методы позволяют проводить как качественное, так и количественное определение молекулярных биомаркеров [3, 5].

Иммуноферментный анализ - распространенный метод определения растворимых белков, в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. Недостатком метода является относительно низкая чувствительность. С использованием данного метода исследовались: роль ряда цитокинов в развитии и течении РС [7], содержание нейрофиламентов в ликворе, отражающее повреждение аксонов в ходе прогрессии заболевания [8, 9], а также маркеры, указывающие на нарушение проницаемости ГЭБ, к которым относят такие растворимые адгезионные молекулы, как PECAM-1, VCAM-1, P-selectin, E-selectin [10].

Вестерн-блоттинг (Western Blotting) - метод определения специфических белков в образце, в основе которого лежит электрофорез образца в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием белка-мишени с использованием специфического антитела на нитроцеллюлозной или PVDF-мембране и дальнейшей колориметрической или флуоресцентной детекцией. С помощью данного метода у пациентов с РС анализируют содержание антител к основному белку миелина и к миелоидному олигодендроцитарному гликопротеину; олигоклональные комплексы IgG и IgM;  $\alpha$ B-кристаллин [7].

Изоэлектрическое фокусирование - электрофоретический метод разделения молекул (чаще всего белков) по разнице в их изоэлектрических точках. Для этого используются акриламидные гели с градиентом pH. С помощью этого метода было показано, что олигоклональные комплексы IgG и IgM в ликворе коррелируют с переходом от клинически изолированного синдрома к клинически достоверному РС [3].

Проточная цитометрия применяется при изучении клеточных субпопуляций и биомаркеров в виде поверхностных антигенов, ДНК и РНК, вариаций экспрессии белков, ферментов и внутриклеточных антигенов. Метод использовался для определения содержания в сыворотке антител к основному белку миелина, миелоидному олигодендроцитарному гликопротеину; хемокина CXCR3 в ликворе; изучения ответа на терапию со стороны разных субпопуляций иммунокомпетентных клеток по экспрессии ряда поверхностных молекул (CD40, CD80, CD86, HLA-DR и др.) [3, 11, 12].

Нефелометрические методы позволяют определить концентрацию белка в различных жидкостях организма по интенсивности светового потока, рассеиваемого взвешенными частицами анализируемого образца. Нефелометрически измеряемыми биомаркерами активности РС являются альбумин в ликворе, содержание NO в ликворе и сыворотке крови [3].

К группе «классических методов» можно также отнести методы, основанные на полимеразной цепной реакции (в т.ч. мультипраймерная и аллель-специфическая ПЦР), а также методы секвенирования

генома пациентов (в т.ч. полное повторное секвенирование генома, направленное секвенирование участков генома). Эти методы применяются для определения предиктивных генетических биомаркеров путем выявления полиморфных вариантов генов, ассоциированных с риском развития РС.

Перечисленные «классические» методы используются на всех трех этапах исследования биомаркеров. Результаты, полученные с их помощью, стали основой для дальнейшего развития технологий скрининга. Недостатки «классических» методов связаны не только с их разрешающей способностью или другими техническими ограничениями, но и с тем, что при РС спектр патологических процессов может существенно отличаться от пациента к пациенту, и выявляемые одиночные биомаркеры, которые подходят для одной группы больных, могут быть неподходящими для других пациентов. Из-за сложности РС для отражения патологических изменений требуется определение не единичных биомаркеров, а панели биомаркеров различных типов, выделенных в различных компартментах [3].

Решение этой проблемы стало возможным в связи с разработкой семейства microarray-методов, позволивших создать технологию биочипов. Биочипы представляют собой матрицу с нанесенными молекулами ДНК, РНК, белков и других макромолекул, а также клеток, и позволяют осуществлять одновременный анализ большого числа маркеров в одном образце. В основе метода лежит молекулярное распознавание анализируемых маркеров нанесенными на матрицу биополимерами, основанное на гибридизации комплементарных цепей нуклеиновой кислоты, либо взаимодействии рецепторов с лигандами. Биочипы, основанные на технологиях нерадиоизотопного гибридного, амплификационного анализа, применяются преимущественно для исследования однонуклеотидных полиморфизмов и экспрессии генов. Метод гибридного анализа позволяет идентифицировать специфические нуклеотидные полиморфизмы (Single nucleotide polymorphism, SNP) в сложных смесях с использованием меченой ДНК-зонда. Так, при исследовании биомаркеров РС биочипы применяются для определения однонуклеотидных полиморфизмов. Усовершенствованный иммуночип Illumina Infinium ImmunoArray-24 v2.0 BeadChip позволяет определять более 250 тысяч генетических биомаркеров аутоиммунных заболеваний. Он может применяться для скрининга пациентов с РС и позволяет определять редко встречающиеся генные варианты, ассоциированные с РС, имеющие значительное влияние на развитие заболевания [13].

Появление microarray-методов, в сочетании с «классическими» методами, послужило основой для использования в изучении биомаркеров РС подходов системной биологии, т.н. «-omics»-технологий. Этот термин относится к быстро развивающейся отрасли исследований и технологий, которые дают возможность широкомасштабного определения

биомаркеров на разных уровнях реализации генетической информации. К основным «-omics»-технологиям относятся геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика, эпигеномика. Фактически, «-omics»-подход сочетает «классические» и microarray лабораторные методы с методами биоинформатики, что позволяет не только находить новые биомаркеры, но и выявлять сложные паттерны биомаркеров, информативность которых поодиночке не достаточна. Значительный прогресс, достигнутый за последние 10 лет в понимании биологии и патогенеза РС, в значительной мере связан с именно с успехами геномики. Геномный скрининг имеет ряд преимуществ, которые делают его идеальным биомаркерным методом исследования при РС. Он относительно недорог, не требует больших затрат времени и проведения спинномозговой (или люмбальной) пункции для отбора ликвора, позволяя работать лишь с небольшим количеством крови [13].

На сегодняшний день применение полногеномного поиска ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS) позволило выявить больше сотни генетических вариантов, ассоциированных с развитием РС, а общее количество исследуемых генетических вариантов, включая кандидатные, превысило двести [14, 15].

GWAS представляет собой исследование ассоциаций между генными вариантами, например, однонуклеотидными полиморфизмами, и фенотипическими признаками заболевания, что позволяет идентифицировать генетические факторы риска развития заболевания и оценить предрасположенность к развитию РС. Данный метод используется для выявления корреляций генных вариантов с заболеванием, но не позволяет ответить на вопрос о причинно-следственных связях между полиморфизмом конкретных генов и патогенезом РС. В отличие от других генетических методов, в GWAS исследуется полная последовательность ДНК [16, 17].

Применение GWAS позволило установить, что геномные варианты, общие для РС и других аутоиммунных заболеваний, как правило, оказывают незначительное влияние на развитие заболевания, а выявление корреляций между развитием РС и большинством найденных генных вариантов, требует обследования значительного количества групп пациентов. Другой проблемой, с которой сталкиваются исследователи при использовании GWAS, является явление неравновесного сцепления генов (linkage disequilibrium, LD) в локусах, ассоциированных с РС, что затрудняет выявление генного варианта, являющегося наиболее вероятным причинным фактором («казуального» варианта, casual variant). Многие из этих локусов входят в блоки гаплотипов, содержащие несколько генов. В связи с этим, предпринимаются попытки определить во многих из этих регионов «казуальные» SNP на основе высокоточного картирования полиморфизмов, например методом вероятностной идентификации «каузальных» SNP (Probabilistic Identification of Causal SNPs, PICS) с использованием биочипов Illumina (США). Из-за внутригеномного рассеяния вариантов,

определяемых с помощью GWAS-биочипов, выявление индивидуальных вариантов внутри региона представляет собой сложную задачу [13]. По сравнению с оригинальными GWAS-биочипами, у иммуночипа Illumina увеличена плотность скопления SNP вариантов, что позволяет определять практически все известные локусы, ассоциированные с аутоиммунными заболеваниями. Применение первой версии иммуночипа позволило не только уточнить результаты, полученные с помощью GWAS для больных с различными группами аутоиммунных заболеваний, включая РС, но и выявить 48 новых локусов [15]. Данные типирования, полученные с использованием иммуночипа, применяются в модели PICS, разработанной на основе Байесовского алгоритма. PICS позволяет установить вероятность «каузальности» SNP в GWAS локусах на основании силы ассоциации РС и структуры гаплотипов [13].

Использование большинства генных вариантов в качестве самостоятельных биомаркеров РС нецелесообразно, так как они имеют частоту встречаемости аллелей менее одного процента. Каждый из описанных аллельных вариантов по отдельности увеличивает риск заболевания незначительно, но совокупность нескольких вариантов способна его потенцировать [18].

Обращает внимание распространенность вариантов генов, связанных с сигнальными каскадами иммунных реакций - например, цитокин-опосредованной сигнализацией [19]. Это позволяет предположить, что среди многообразия генетических биомаркеров РС в первую очередь целесообразно определять такие, которые связаны с определенными, критическими для развития заболевания, сигнальными каскадами - STAT, NFkB и др. [20].

Применение GWAS позволяет выявить варианты, связанные с предрасположенностью к заболеванию, и, в меньшей степени, с прогрессированием, степенью тяжести и ответом на лечение. Очевидно, что такие исследования намного сложнее, чем исследования ассоциаций, они требуют сравнительно объективных биомаркеров с непрерывным распределением вероятностей, что требует большой выборки когорт пациентов, организации единообразных сетевых исследований в различных лечебно-профилактических учреждениях и др. [13].

Современные исследования биомаркеров степени тяжести заболевания, его прогрессирования, патогенетического типа, эффективности терапии основаны на таких «-omics»-технологиях, как транскриптомика, протеомика и метаболомика. Транскриптомика включает в себя полногеномные исследования последовательностей РНК, основанные на результатах, полученных с помощью сравнительной геномной гибридизации на биочипах, высокопроизводительного параллельного секвенирования РНК, измерения количества мРНК с помощью ПЦР в реальном времени. Данная технология активно применяется при изучении профиля экспрессии генов мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с РС, направленном

на выявление удобных для клинического применения молекулярных маркеров статуса заболевания [21-23]. Благодаря успехам транскриптомики получены доказательства того, что нарушение регуляции мРНК может способствовать аутоиммунной патологии. В настоящее время анализируются профили экспрессии множества мРНК, и эти данные (полученные данные) могут улучшить текущее понимание механизмов развития РС и оценить эту группу молекул в качестве потенциальных прогностических и диагностических биомаркеров [24].

Протеомика представляет собой «-omics»-технологии, включающую широкомасштабные исследования экспрессии и распределения белков у пациентов с РС, основанные на результатах, полученных с помощью биочипов, а также масс-спектрометрии, жидкостной и газовой хроматографии. Белковые биочипы, состоящие из сотен или тысяч белков, пептидов или антител, нанесенных на стеклянную подложку, позволяют анализировать способность сложных смесей (сыворотки, белковые лизаты) связывать определенные белки, лиганды, антитела и т.д. В последнее время всё большее количество протеомных исследований РС использует метод 2DE-MS (двухмерный электрофорез в сочетании с масс-спектрометрией) [25]. С помощью протеомики получены данные о снижении экспрессии нейрофиламентов в ЦНС у пациентов с РС и повышение их уровня в ликворе, повышенных уровнях глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), а также ряда белков с ферментативными свойствами, в частности, металлопротеиназы. Эти данные свидетельствуют о том, что нарушение гомеостаза ЦНС, вероятно, является результатом воспалительного процесса, приводящего к демиелинизации и нейродегенерации [26].

Метаболомика изучает низкомолекулярные метаболитические профили, основываясь на результатах, полученных методами масс-спектрометрии, жидкостной и газовой хроматографии, ядерного магнитного резонанса. Однако в отличие от других «-omics»-технологий, в метаболомике не используются microarray-методы. Метаболомные исследования позволяют исследовать специфические метаболомные профили разных типов терапии РС и метаболиты, которые могут быть связаны с прогрессией заболевания. Эти исследования потенциально могли бы помочь в определении биомаркеров эффективности терапии, а также её побочных эффектов [27].

### Заключение

Поиск, верификация и клиническое применение биомаркеров рассеянного склероза представляет собой сложнейшую медико-биологическую задачу, решение которой требует междисциплинарного подхода, организации масштабных исследований и привлечения новейших методов исследования. За последние годы получено значительное количество данных, позволивших выявить сотни биомаркеров-кандидатов. Некоторые

из этих биомаркеров обладают значительным потенциалом для мониторинга активности течения заболевания и оценки эффективности терапии. Однако их верификация, необходимая для широкого клинического применения, предполагает проведение дальнейших масштабных исследований в разных странах. Развитие персонализированной медицины в Украине, применение её принципов для ведения пациентов с рассеянным склерозом наряду с использованием усовершенствованных «классических» методов исследования биомаркеров требует внедрения также и современных методов, в том числе использования биочипов нового поколения, технологий геномики, протеомики и метаболомики.

### References

1. Goodin DS. (Ed.) Multiple Sclerosis and Related Disorders, Volume 122 (Handbook of Clinical Neurology). Elsevier Science. 2014. 736 p.
2. Chernenko MY, Vovk VI. Current approaches to pathogenetic therapy of multiple sclerosis // International medical journal. 2015. N 1. P. 58-62.
3. Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview // Multiple Sclerosis International. 2013. Vol. 2013 (2013). URL: <http://www.hindawi.com/journals/msi/2013/340508/> (request date 18.09.2016)
4. D'Ambrosio A, Pontecorvo S, Colasanti T. [et al.] Peripheral blood biomarkers in multiple sclerosis // Autoimmunity reviews. 2015. Vol. 14. N 12. P. 1097-1110. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997215001639> (request date 10.08.2016)
5. Paap BK, Hecker M, Koczan D, Zettl UK. Molecular biomarkers of multiple sclerosis // J. Clin. Cell. Immunol. 2013. S. 10:009. URL: <http://www.omicsonline.org/molecular-biomarkers-in-multiple-sclerosis-2155-9899.S10-009.php?aid=11679> (request date 12.09.2016)
6. Schmitz G, Leuthäuser-Jaschinski K, Orsó E. Are Circulating Monocytes as Microglia Orthologues Appropriate Biomarker Targets for Neuronal Diseases? // Cent. Nerv. Syst. Agents in Med. Chem. 2009. Vol. 9. P. 307-330.
7. Harris VK, Sadiq SA. Disease Biomarkers in multiple sclerosis: potential for use in therapeutic decision making // Molecular Diagnosis and Therapy. 2009. Vol. 13. N 4. P. 225-244.
8. Kuhle J, Plattner K, Bestwick JP. [et al.] A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS // Multiple Sclerosis Journal. 2013. Vol. 19. P. 1597-1603.
9. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis // Multiple Sclerosis Journal. 2012. Vol. 18. N 5. P. 552-556.
10. Lutterotti A, Berger T, Reindl M. Biological markers of multiple sclerosis // Current Medical Chemistry. 2007. Vol. 14. P. 1956-1965.
11. Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis // Brain. 2004. Vol. 127. P. 1463-1478.
12. Alvermann S, Hennig C, Stüve O. [et al.] Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in

multiple sclerosis: in search of biomarkers // *JAMA Neurol.* 2014. Vol. 71. P. 905-912.

13. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA. Biomarkers in multiple sclerosis // *Clinical Immunology.* 2015. Vol. 161. N 1. P. 51-58.

14. Johnson AD, O'Donnell CJ. An Open Access Database of Genome-wide Association Results // *BMC Medical Genetics.* 2009. Vol. 10. N 1. URL: <http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-10-6> (request date 05.07.2016)

15. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA. [et al.] Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis // *Nature Genetics.* 2013. Vol. 45(11). P. 1353-1360. URL: <http://www.nature.com/ng/journal/v45/n11/full/ng.2770.html> (request date 20.08.2016)

16. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies // *PLoS Computational Biology.* 2012. Vol. 8(12):e1002822. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531285/> (request date 09.07.2016)

17. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA. [et al.] Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009. Vol. 106(23). P. 9362-9367. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2687147/> (request date 06.08.2016)

18. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium [et al.] Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study // *The New England journal of medicine.* 2007. Vol. 357. N 9. P. 851-862. URL: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa073493> (request date 10.07.2016)

19. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), Sawcer S. [et al.] Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis // *Nature.* 2011. Vol. 476(7359). P. 214-219. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182531/> (request date 14.09.2016)

20. Housley WJ, Fernandez SD, Vera K. [et al.] Genetic variants associated with autoimmunity drive NFκB signaling and responses to inflammatory stimuli // *Science translational medicine.* 2015. Vol. 7(291):291ra93. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574294/> (request date 12.09.2016)

21. Achiron A, Gurevich M, Friedman N. [et al.] Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: Unique gene expression of disease activity // *Ann Neurol.* 2004. Vol. 55. P. 410-417.

22. Bomprezzi R, Ringner M, Kim S. [et al.] Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease // *Hum. Mol. Genet.* 2003. Vol. 12. N 17. P. 2191-2199.

23. Tajouri L, Fernandez F, Griffiths LR. Gene Expression Studies in Multiple Sclerosis // *Current Genomics.* 2007. Vol. 8. N 3. P. 181-189.

24. Raphael I, Webb J, Stuve O. [et al.] Body fluid biomarkers in multiple sclerosis: how far we have come and how they could affect the clinic now and in the future // *Expert Review of Clinical Immunology.* 2015. Vol. 11, N 1. P. 69-91.

25. Oliveira BM, Coorsen JR, Martins-de-Souza D. 2DE: the Phoenix of Proteomics // *Journal of Proteomics.* 2014. Vol. 104. P. 140-150.

26. Farias AS, Pradella F, Schmitt A. [et al.] Ten years of proteomics in multiple sclerosis // *Proteomics.* 2014. Vol. 14. P. 467-480.

27. Bhargava P, Calabresi A. Metabolomics in multiple sclerosis // *Multiple Sclerosis Journal.* 2016. Vol. 22. P. 451-460.

**UDC 612.017.11:616.832-004.2**

### **CURRENT APPROACHES FOR RESEARCH OF MULTIPLE SCLEROSIS BIOMARKERS**

**Kolyada T.I., Zelenskaya A.D., Tupotilov O.V.**

Current data concerning features of multiple sclerosis (MS) etiology, pathogenesis, clinical course and treatment of disease indicate the necessity of personalized approach to the management of MS patients. These features are the variety of possible etiological factors and mechanisms that trigger the development of MS, different courses of disease, and significant differences in treatment efficiency. Phenotypic and pathogenetic heterogeneity of MS requires, on the one hand, the stratification of patients into groups with different treatment depending on a number of criteria including genetic characteristics, disease course, stage of the pathological process, and forms of the disease. On the other hand, it requires the use of modern methods for assessment of individual risk of developing MS, its early diagnosis, evaluation and prognosis of the disease course and the treatment efficiency. This approach is based on the identification and determination of biomarkers of MS including the use of systems biology technology platforms such as genomics, proteomics, metabolomics and bioinformatics. Research and practical use of biomarkers of MS in clinical and laboratory practice requires the use of a wide range of modern medical and biological, mathematical and physicochemical methods. The group of "classical" methods used to study MS biomarkers includes physicochemical and immunological methods aimed at the selection and identification of single molecular biomarkers, as well as methods of molecular genetic analysis. This group of methods includes ELISA, western blotting, isoelectric focusing, immunohistochemical methods, flow cytometry, spectrophotometric and nephelometric methods. These techniques make it possible to carry out both qualitative and quantitative assay of molecular biomarkers. The group of "classical methods" can also include methods based on polymerase chain reaction (including multiplex and allele-specific PCR) and genome sequencing techniques (including full genome resequencing, targeted resequencing of the genome). The results obtained with these techniques became the basis for the further development of screening technologies. Disadvantages of the "classical" methods are associated not only with their resolution or other

technical limitations but also to the fact that the range of pathological processes in MS may vary significantly from patient to patient and single biomarkers suitable for one group of patients may be inappropriate for another group of patients. Due to the complexity of MS the reflection of pathological changes may be determined not by single biomarkers but by isolated biomarkers panel from different compartments. The solution of this problem seems to be possible due to the development of microarray methods including biochips technology. Biochips are used for screening of MS patients and allow determining the rare MS-associated gene variants that have a significant impact on the development of the disease. In conjunction with the "classical" methods, microarrays allowed to apply systems biology approaches (i.e. genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, epigenomics) in the study of MS biomarkers. Addition of bioinformatics methods to "classical" and microarray laboratory methods allows not only to find new biomarkers but to identify complex patterns of biomarkers while single biomarkers informative value is not sufficient. To date, the use of genome-wide association study (GWAS) revealed more than a hundred genetic variants associated with the development of MS, while the total number of investigated genetic variants including the candidate ones exceeded two hundred. GWAS is used to identify correlations of genetic variants with the disease, including the identification of variants associated with a risk of developing MS, but cannot answer the question of the causal links between specific genes polymorphism and the pathogenesis of MS. Current studies of biomarkers of disease severity, progression, pathogenetic type and treatment efficacy are based on transcriptomics, proteomics and metabolomics technologies. Transcriptomics includes genome-wide research of RNA sequences based on the results obtained with comparative genomic hybridization on biochips, massive parallel RNA sequencing, and measuring the amount of mRNA by real-time PCR. This technology is actively used in studies of gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells from MS patients aimed at identifying molecular markers of disease status suitable for clinical use. Proteomics is a large-scale expression and protein distribution studies in patients with MS based on the results obtained via microarray and mass spectrometry, liquid and gas chromatography methods. In recent years, a growing number of MS proteomic studies using 2DE-MS method (two-dimensional electrophoresis coupled with mass spectrometry). Metabolomics studies of low-molecular-weight metabolic profiles based on the results obtained by mass spectrometry, liquid and gas chromatography, nuclear magnetic resonance. However, unlike other «-omics»-technologies, in metabolomics microarray-techniques are not used. **Conclusion.** Search, verification and clinical application of biomarkers for multiple sclerosis are one of the most challenging medical and biological problems. Its solution requires an interdisciplinary approach, organization of large-scale research and engagement of new research methods. In recent years, a significant amount of data received allowed to reveal hundreds of candidate biomarkers.

Some of these biomarkers have significant potential for the monitoring of disease activity and assessment of therapy efficiency. However, the verification is required for a widespread clinical application; it implies further large-scale studies in different countries. The development of personalized medicine in Ukraine, the application of its principles to the management of multiple sclerosis patients, along with the use of advanced "classic" biomarker research methods requires the introduction of modern methods including the use of new-generation biochips, genomics technologies, proteomics and metabolomics.

**Keywords:** multiple sclerosis, biological markers, mononuclear phagocytes, genomics, proteomics, metabolomics