

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Е. В. Марковская, А. С. Шапкин

Харьковский национальный медицинский университет

Резюме

Проведено исследование патоморфологических изменений периферической нервной системы и сосудов кожи у больных рассеянным склерозом. Отмечено, что в элементах периферической нервной системы при рассеянном склерозе возникают демиелинизация и дистрофические изменения нервных волокон в виде разволокнения, склероза, варикозного вздутия и очагового уменьшения шванновских клеток. В периневральном и периваскулярном пространстве кожи выявляются воспалительные изменения, при этом в клетках лимфоцитарного воспалительного инфильтрата экспрессируется большое количество циклооксигеназы-2 и индуцибельной фракции синтазы оксида азота. Одним из звеньев патогенеза, усиливающих демиелинизацию и дистрофические изменения нервных волокон, может служить активация в шванновских клетках индуцибельной фракции синтазы оксида азота и циклооксигеназы-2. Наличие эндотелиальной дисфункции и воспалительных изменений в компонентах периферической нервной системы при разных типах течения рассеянного склероза, в том числе и в стадии ремиссии, следует учитывать при назначении патогенетической терапии.

Ключевые слова: рассеянный склероз, морфология, эндотелиальная дисфункция.

PATHOLOGICAL CHANGES OF PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM IN MULTIPLE SCLEROSIS

E. V. Markovskaya, A. S. Shapkin

Kharkiv National Medical University

Abstract

Scientific research of pathomorphological changes of peripheral nervous system and skin vessels in patients with multiple sclerosis was done. It was marked that demyelination and dystrophic changes in nerves in form of stratification, varicose distension, sclerosis and local decreasing of Schwann cells are detected. Inflammatory changes in perineural and perivascular space of the skin were revealed, increased level of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in lymphocytic inflammatory infiltration are expressed. One of pathogenetic mechanism leading to demyelination could be activation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Schwann cells. So, endothelial dysfunction and inflammatory changes in elements of peripheral nervous system in different types of courses of multiple sclerosis, also in remission, should be taking into consideration for prescribing pathogenetic treatment.

Key words: multiple sclerosis, morphology, endothelial dysfunction.

ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ ПРИ РОЗСІЯНОМУ СКЛЕРОЗІ

О. В. Марковська, А. С. Шапкін

Харківський національний медичний університет

Резюме

Проведено дослідження патоморфологічних змін периферичної нервової системи і судин шкіри у хворих на розсіяний склероз. Відзначено, що в елементах периферичної нервової системи при розсіяному склерозі виникають демієлінізація та дистрофічні зміни нервових волокон у вигляді розволокнення, склерозу, варикозного здуття і осередкового зменшення шванновських клітин. У периневральному і периваскулярному просторах шкіри виявляються запальні зміни, при цьому в клітинах лімфоцитарного запального інфільтрату

експресується велика кількість циклооксигенази-2 і синтази індуцибельної фракції оксиду азоту. Одною з ланок патогенезу, що підсилюють демієлінізацію і дистрофічні зміни нервових волокон, може служити активація в шванновських клітинах, індуцибельної фракції синтази оксиду азоту та циклооксигенази-2. Наявність ендотеліальної дисфункції і запальних змін в компонентах периферичної нервової системи при різних типах перебігу РС, в тому числі і в стадії ремісії, слід враховувати при призначенні патогенетичної терапії.

Ключові слова: розсіяний склероз, морфологія, ендотеліальна дисфункція.

Рассеянный склероз (РС) – это прогрессирующее аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся локальной инфильтрацией Т-клеток и макрофагов в нервную ткань, локальными множественными участками воспаления в ней, активацией глии, повреждением олигодендроцитов, интенсивной демиелинизацией нервных волокон, повреждением аксонов и выраженными неврологическими нарушениями [6].

Большинство нерешенных проблем при этой патологии связано с отсутствием как четких представлений об этиологии и патогенезе РС, так и достоверных критериев его диагностики. Ранее предполагалось, что очаги демиелинизации при РС не распространяются из ЦНС на периферию через переходные зоны, где глиальные клетки уступают место шванновским клеткам и фибробластам. В последнее время появляется все больше данных, что поражение периферической нервной системы (ПНС), в виде дистальных гипотрофий, нарушения чувствительности по моно- и полиневритическому типу, нередко встречаются при РС [3, 4]. Однако, очень часто нарушения функции ПНС уходит на второй план в связи с явным доминированием в клинической картине заболевания симптоматики поражения ЦНС.

Установлено, что при РС синтезируется весьма широкий спектр цитокинов и провоспалительных факторов, среди которых – интерлейкины 1-4, 6, 10, 12, TNF- α , интерфероны и т.д. В последнее время доказана роль воспаления в повреждении нервных структур при РС [6]. К одним из ведущих маркеров воспаления относят циклооксигеназу-2 (COX-2) – индуцибельный фермент, стимулирующий продукцию провоспалительных простагландинов [1, 2, 5], роль которого в сложном каскаде патогенеза РС остается мало изученной [8, 10].

В последнее время появились данные о возможной роли эндотелиальной дисфункции и нарушения обмена оксида азота (NO) при РС [9]. NO является ключевым регулятором сосудистого, нервного и иммунного гомеостаза, поддерживает активную вазодилатацию, регулирует кровоток и контролирует артериальное давление. Вместе с тем, при высоких

концентрациях этот медиатор может оказывать цитостатическое воздействие. Синтез NO из L-аргинина осуществляется под действием трех основных изоформ фермента NO-синтазы: нейрональной (nNOS), эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS).

Цель исследования – изучение экспрессии COX-2 и экспрессии эндотелиальной и индуцибельной изоформ NO-синтазы в компонентах периферической нервной системе и сосудах кожи больных РС.

Материалы и методы. Материалом для гистологического и иммуногистохимического исследования послужили биоптаты кожи 32 больных с установленным диагнозом рассеянный склероз согласно критериям McDonald [11]. У 5 пациентов наблюдался первично-прогредиентный тип течения РС, у 7 – вторично-прогредиентный, у 13 – рецидивирующий-ремиттирующий в стадии ремиссии, у 7 – рецидивирующий-ремиттирующий в стадии обострения. В качестве контроля изучены биоптаты кожи 7 больных хирургического профиля без неврологических заболеваний.

Биоптаты кожи брали в области нижней трети внутренней поверхности лодыжки под местной анестезией 0,5% раствором новокаина. Весь материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Затем подвергали стандартной проводке через спирты увеличивающейся концентрации, жидкость Никифорова (96% спирт и диэтиловый эфир в соотношении 1:1), хлороформ, после чего заливали парафином. Из приготовленных таким образом блоков делали серийные срезы толщиной 4–5×10-6 м. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Шпильмейеру и импрегнировали азотнокислым серебром по Бильшовскому-Гросс. Экспрессию iNOS, eNOS и COX-2 исследовали непрямым иммуногистохимическим пероксидазным методом с использованием моноклональных антител (МКАТ) производства Thermo Scientific с последующей инкубацией с диаминобензидином и докрасиванием гематоксилином Майера. Гистологические и гистохимические методики выполняли по прописям, изложенным в руководствах по гистологической технике и гистохимии.

Интенсивность экспрессии NO-синтаз и COX-2 оценивали методом цитофотометрии, определяя оптическую плотность иммунопозитивных гранул в зеленой части спектра. В каждом наблюдении изучали 3–5 случайно выбранных поля зрения.

Комплекс гистологических и цитофотометрических исследований проводили на микроскопе Olympus BX-41 с использованием программ Olympus DP-Soft (Version 3:1) и Microsoft Excel.

Весь полученный в результате проведенного цитофотометрического и иммуногистохимического исследований цифровой массив данных обрабатывали методами математической статистики с использованием вариационного анализа. При использовании

методов альтернативной и вариационной статистики вычисляли среднюю арифметическую, среднее квадратическое отклонение, среднюю ошибку разницы, вероятность различия. Вероятность различия между двумя средними определяли по таблице Стьюдента [7]. При определении степени вероятности допускали точность $p \leq 0,05$, что соответствует $P \geq 95,0\%$.

Результаты исследования. При обзорном микроскопическом исследовании биоптатов кожи больных РС, окрашенных гематоксилином и эозином, выявляются признаки продуктивного васкулита, что проявляется повсеместной периваскулярной и периневральной лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 1). Сосуды всех калибров с набухшим эндотелием, периваскулярное пространство их резко расширено, в некоторых случаях отмечалась неравномерная гипертрофия мышечного слоя, гофрированность эластической мембраны и инвагинаты ее в просвет сосудов с очаговой пролиферацией эндотелия. Коллагеновые волокна дермы, в непосредственной близости с отечным периваскулярным пространством, набухшие, гомогенизированы и плохо окрашиваются эозином, а при окрашивании по ван-Гизону – пикринофильные.

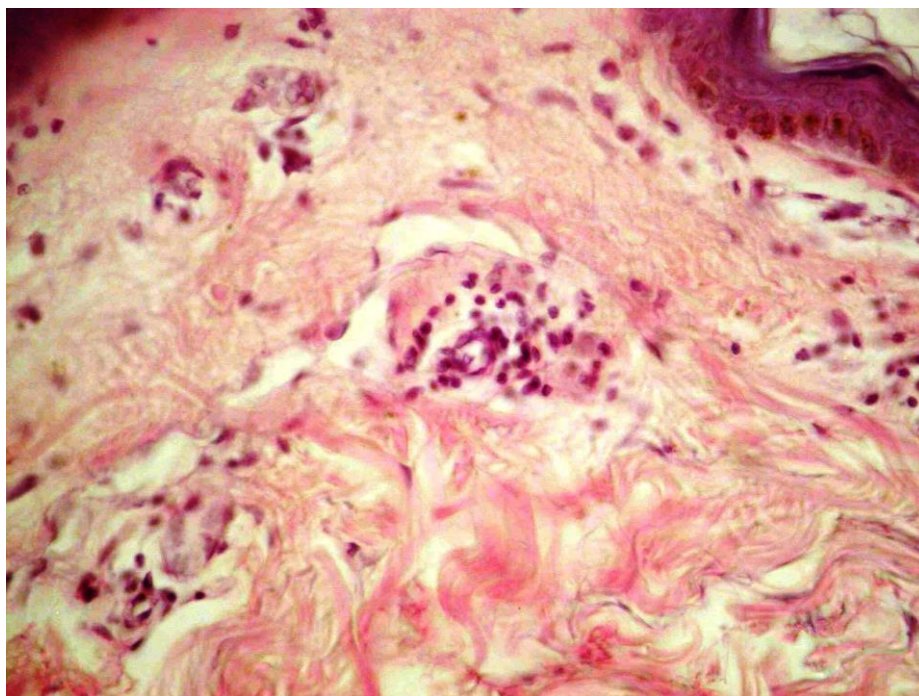


Рис. 1. Периваскулярная лимфогистиоцитарная инфильтрация в дерме. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

В большинстве случаев в биоптаты кожи, помимо эпидермиса и дермы, захватывались фрагменты подлежащей ткани – гиподерма и подкожная жировая клетчатка. При изучении сосудов в различных слоях кожи и подлежащей ткани нами не было выявлено какой-либо локализационной зависимости степени выраженности воспалительных

изменений. При детальном изучении клеточного характера воспалительного инфильтрата нами выявлено, что основную массу его составляют лимфоциты и моноциты. При проведении иммунопероксидазной реакции с моноклональными антителами к COX-2 и iNOS в клетках воспалительного инфильтрата, эндотелии сосудов и мышечной стенке выявляется выраженная экспрессия данных ферментов (рис. 2). Гранулы ферментов в основном равномерно распределены в цитоплазме клеток, однако, иногда можно видеть свободно расположенные в периваскулярной строме. Следует отметить, что наиболее выраженные морфологические проявления васкулита наблюдались в группе больных с рецидивирующе-ремиттирующим типом течения РС в стадии обострения, а также в группе с первично-прогрессирующим и вторично-прогрессирующим типами течения РС с длительностью заболевания до 5 лет.

Также обращает на себя внимание тот факт, что наиболее ранние и массивные инфильтраты появлялись вокруг сосудов и в области сосудисто-нервных пучков (рис. 3). В последующем количество клеток вокруг сосудов уменьшается, а вокруг и в основе одиночно идущих нервов – увеличивается. Однако, даже при исчезновении явлений васкулита, в эндотелии, мышечной стенке и периваскулярном пространстве определяется экспрессия гранул индуцибельной синтазы оксида азота (рис. 4)

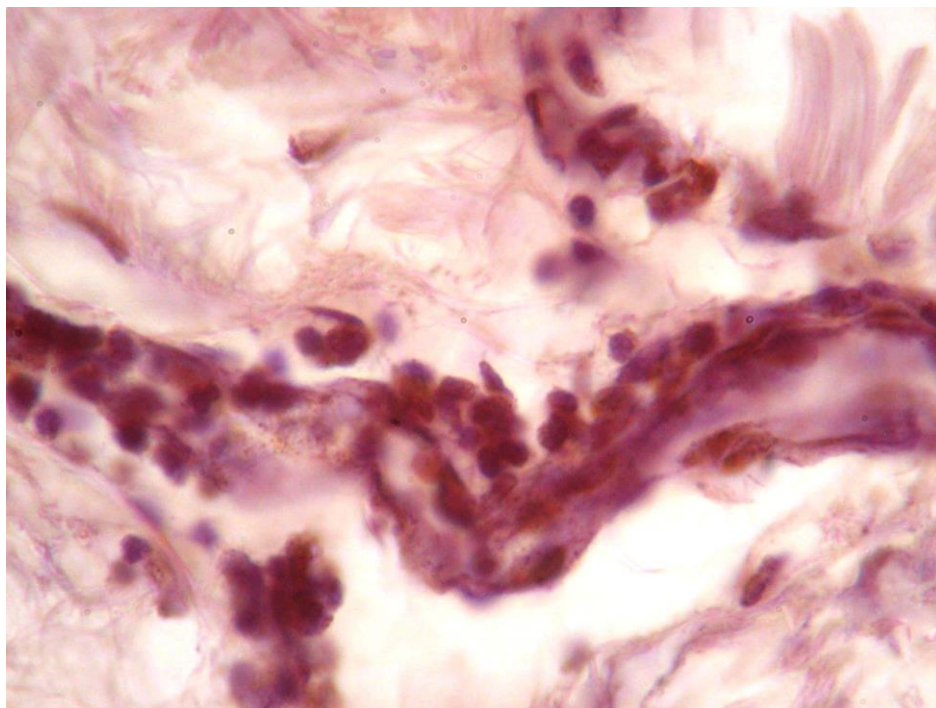


Рис. 2. Периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация. В цитоплазме лимфоцитов и эндотелиоцитов, а также в периваскулярном пространстве экспрессируется большое количество гранул iNOS коричневого цвета. Пероксидазная реакция с МКАТ к iNOS, $\times 1000$.

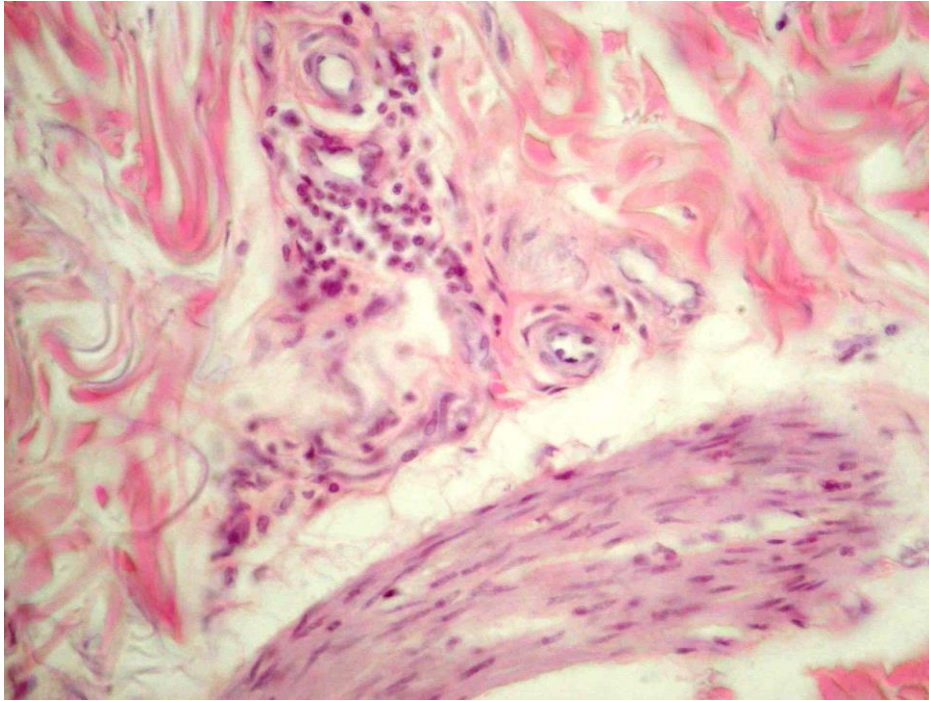


Рис. 3. Умеренно выраженная лимфоцитарная инфильтрация сосудисто-нервного пучка. Выраженный интра- и периневральный отек. В основе нерва определяются единичные лимфоциты. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

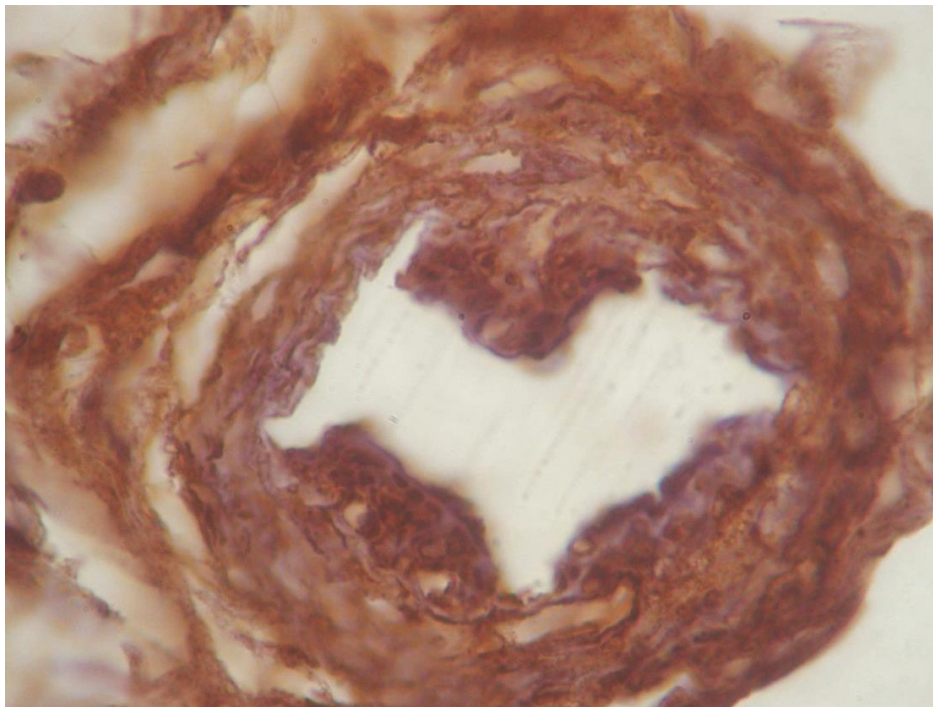


Рис. 4. Неравномерная гипертрофия мышечного слоя сосуда. Проллиферация эндотелия. В эндотелии, мышечном слое и периваскулярно экспрессируется большое количество гранул iNOS коричневого цвета. Peroксидазная реакция с МКАТ к iNOS, $\times 1000$.

При изучении компонентов ПНС, по аналогии с сосудистыми изменениями, обращает

на себя внимание лимфоцитарная инфильтрация вокруг нервных проводников. Некоторые нервные волокна (рис. 5) резко отечные, очагово бесструктурные, набухшие с разрежением основы и наличием полей полного отсутствия шванновских клеток. Периневральные пространства резко расширены. Непосредственно в нервах определяются лимфоциты, интенсивно экспрессирующие COX-2 и iNOS (рис. 6).

При импрегнации ткани азотнокислым серебром (рис. 7) отмечается утолщение и огрубение нервных волокон, неравномерность окраски с явлениями варикозноподобных вздутий нейролеммы и формированием булавовидных вздутий (кугель-феноменов) нервных окончаний (рис. 8).

При окраске методом Шпильмейера (рис. 9) – миелиновые оболочки и осевые цилиндры неравномерно окрашены, с очаговой фрагментацией, наличием аневризмоподобных расширений и прерывистостью окрашивания осевых цилиндров, что указывает на нейродегенеративные процессы.

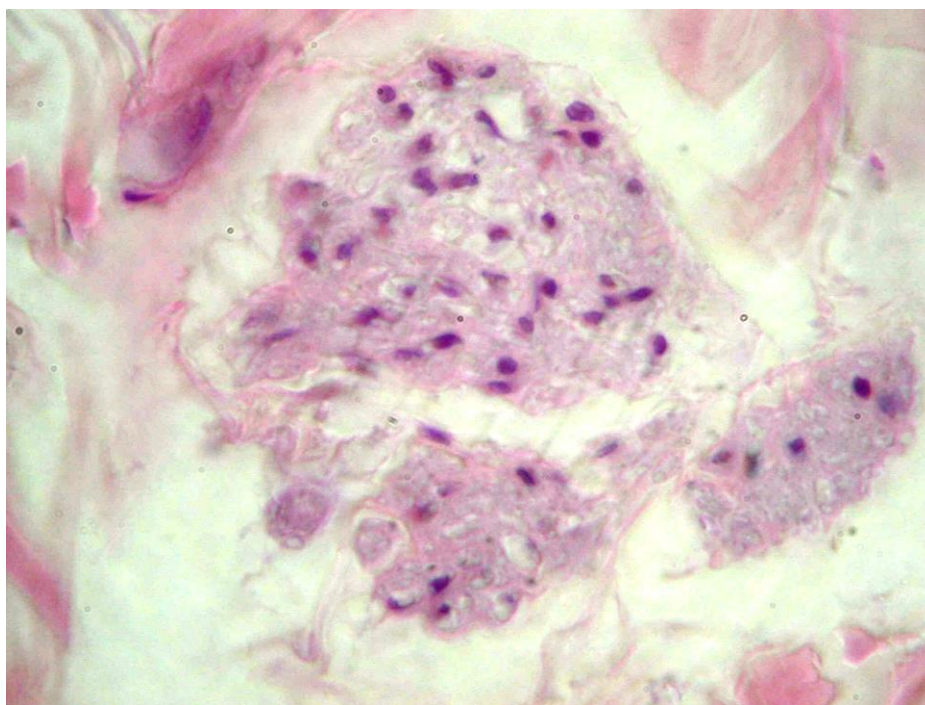


Рис. 5. Резкий отек, разрежение, гомогенизация нервного волокна с наличием полей полного отсутствия шванновских клеток. Периневральное пространство резко расширено. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$.

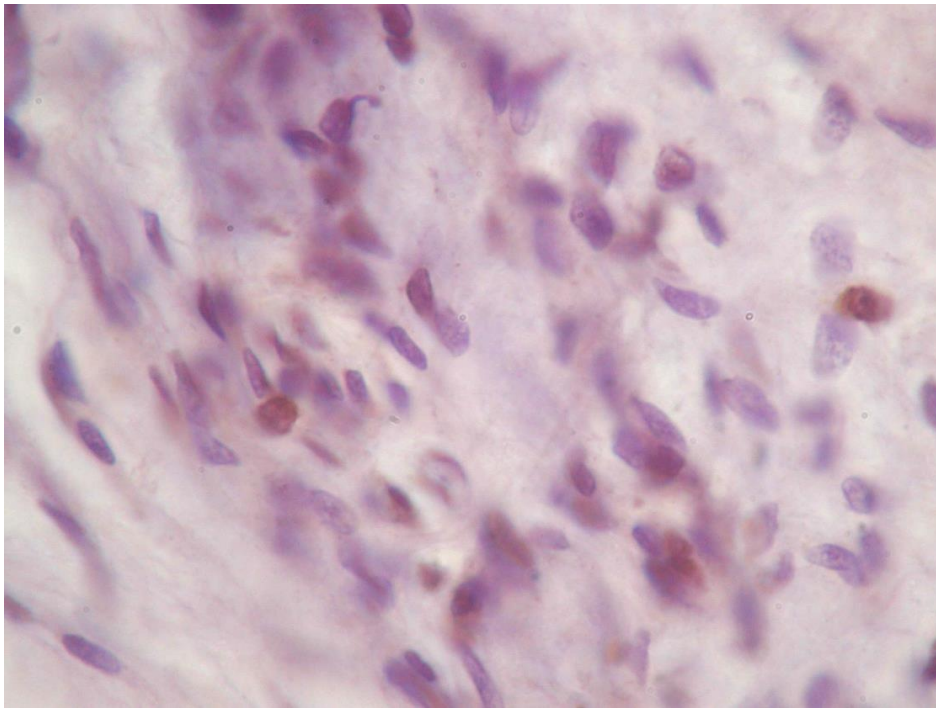


Рис. 6. Инфильтрация нервного волокна лимфоцитами, интенсивно экспрессирующими СОХ-2. Peroксидазная реакция с МКАТ к СОХ-2, $\times 1000$.

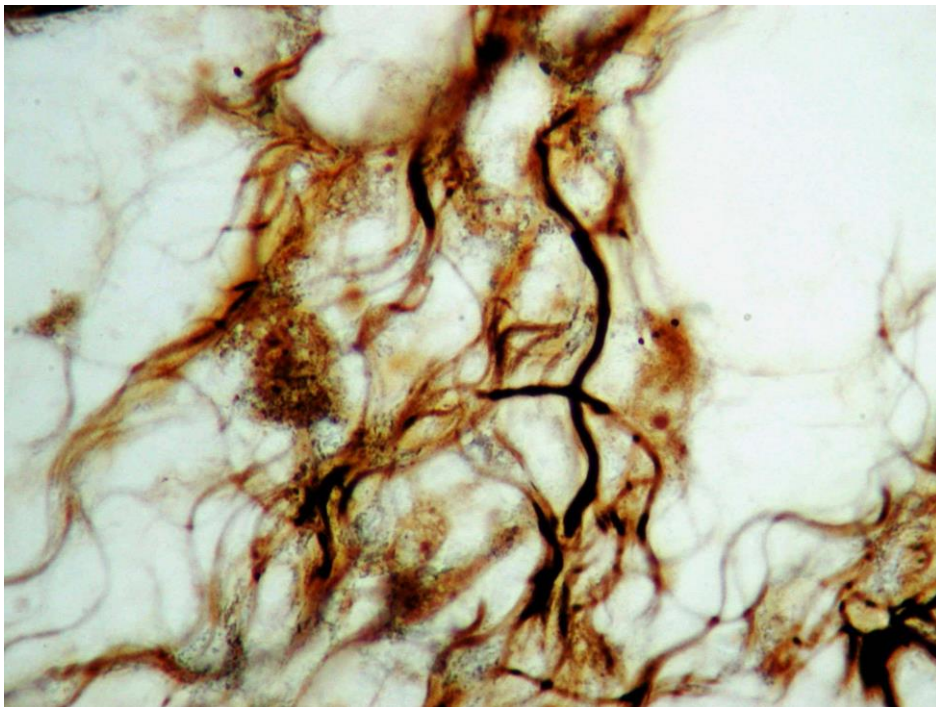


Рис. 7. Огрубение нервных волокон, варикозные утолщения, натёки нейроплазмы, очаги деструкции и фрагментации. Окраска по Бильшовскому-Гросс, $\times 1000$.

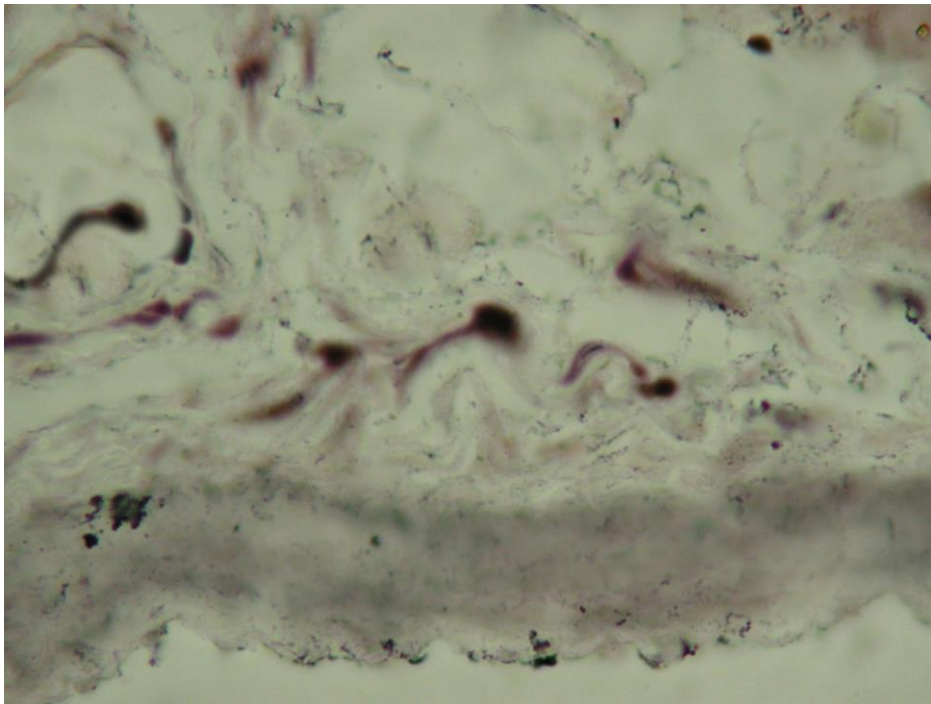


Рис. 8. Явления кугель-феномена на окончаниях нервных волокон. Окраска по Бильшовскому-Гросс, $\times 1000$.

При проведении иммунопероксидазной реакции с моноклональными антителами к COX-2 и iNOS (рис. 10) выявляется активация данных ферментов в шванновских клетках нервных волокон. Гранулы данных ферментов равномерно распределены в цитоплазме этих клеток. Следует отметить, что количество иммунопозитивных гранул iNOS во много раз

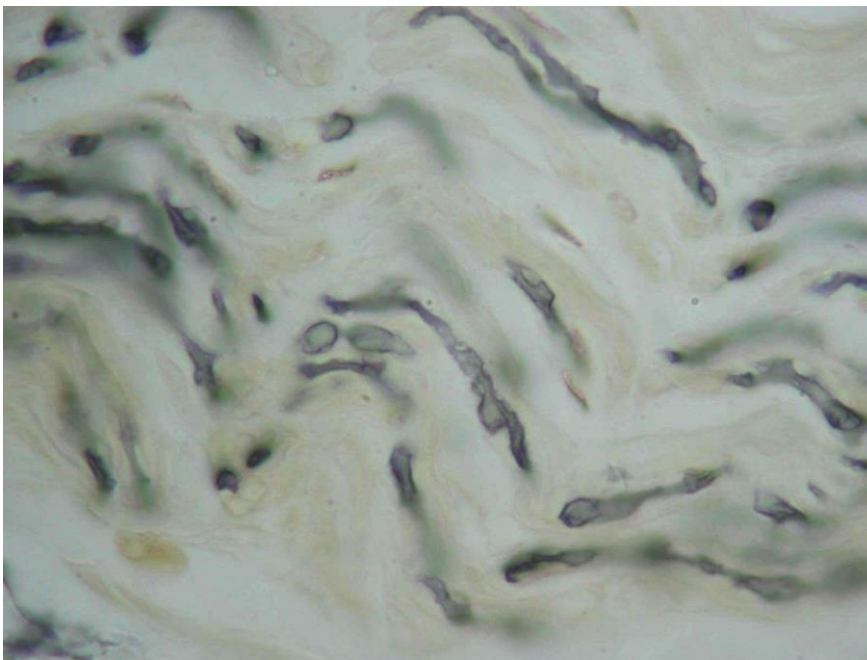


Рис. 9. Неравномерное окрашивание и варикозные расширения осевых цилиндров нервного волокна с очаговой их демиелинизацией. Окраска по Шпильмейеру, $\times 1000$.

превышает количество таковых COX-2, они, кроме нервов, выявляются в стенке сосудов, а также в межучном пространстве дермы, вдали от сосудистого русла и нервов. Гранулы iNOS равномерно распределены по всему нервному волокну, в то время как гранулы COX-2 имеют мозаичное расположение и в большей степени концентрируются по наружной поверхности нервного волокна.

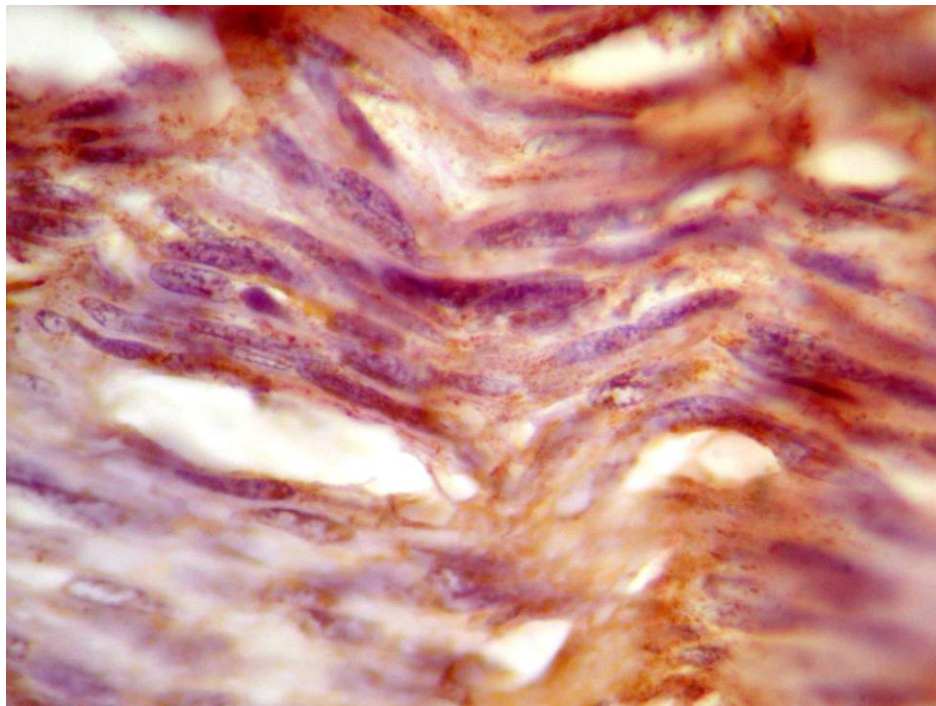


Рис. 10. Активация продукции iNOS в шванновских клетках нервного волокна. Иммунопереоксидазный метод с МКАТ к iNOS, $\times 1000$.

Наиболее выраженные и острые, с морфологической точки зрения, изменения в периферической нервной системе отмечены в группах с рецидивирующим-ремиттирующим типом течения в стадии обострения, а также в группе с первично-прогредиентным и вторично-прогредиентным типом течения РС с длительностью заболевания до 5 лет. У больных со стажем РС более 5 лет морфологическая картина в большей степени характеризуется хроническими дистрофическими и склеротическими изменениями. Нервные волокна истончаются, в их основе определяется разрастание нежнволокнистой соединительной ткани, за счет чего количество клеточных элементов уменьшается и нервы выглядят как бы пустыми (рис. 11). При этом экспрессия COX-2 и iNOS падает, что, по всей видимости, связано с гибелью нейолемоцитов, которые синтезировали эти ферменты.

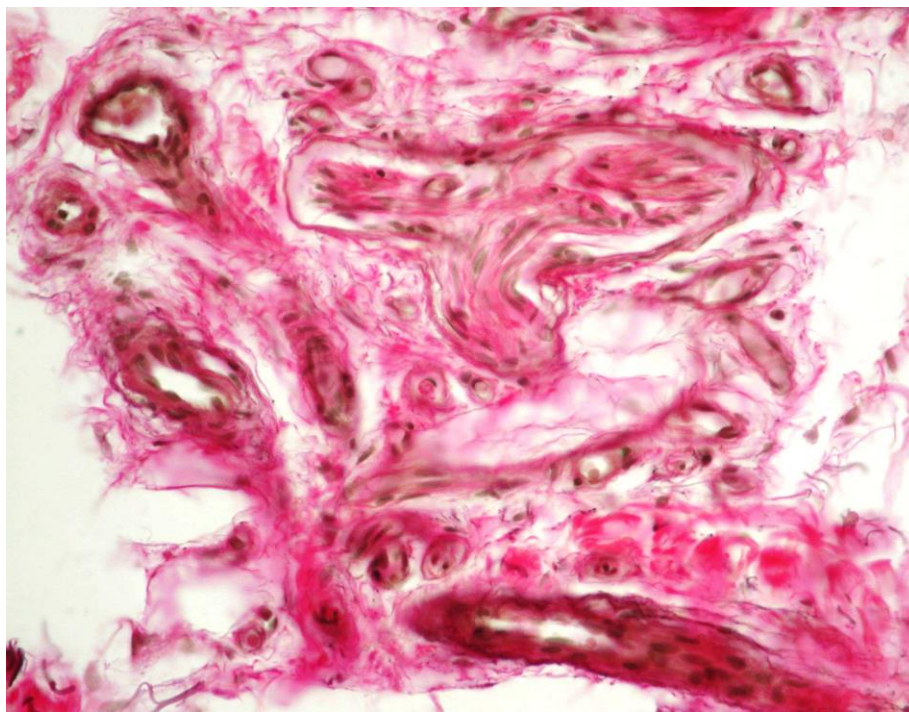


Рис. 11. Склеротические изменения по ходу нервного ствола. Окраска по ван Гизону, $\times 1000$.

Следует отметить, что склеротические и дистрофические изменения напрямую коррелируют с тяжестью стойких неврологических нарушений.

В группе с рецидивирующе-ремитирующим типом течения в стадии ремиссии морфологические изменения были минимальными. Выраженных атрофических и склеротических изменений в данной исследуемой группе нами выявлено не было.

Цитофотометрическое исследование оптической плотности COX-2 (рис. 12) показало достоверное увеличение данного показателя при РС в целом. Однако, следует отметить, что COX-2, также как и iNOS, является индуцибельным ферментом, то есть он появляется при патологических состояниях, а именно при воспалении. Оптическая плотность в данной ситуации рассматривается как количественный показатель, отражающий активность воспалительного процесса. В группе контроля экспрессия данного фермента фоновая, практически не определяется.

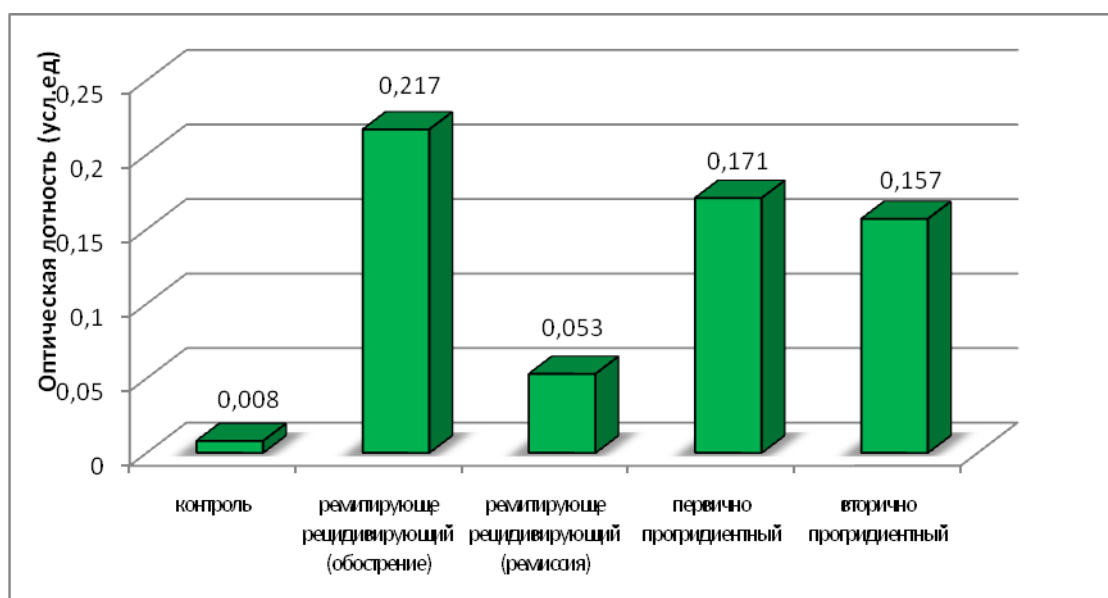


Рис. 12. Зависимость показателей оптической плотности iNOS от типа течения рассеянного склероза.

При изучении оптической плотности индуцибельной изоформы синтазы оксида азота в зависимости от типа течения РС обращает на себя внимания то, что наибольшие показатели оптической плотности определяются в группе с ремиттирующе-рецидивирующим типом течения РС в стадии обострения и составляют $0,217 \pm 0,008$ усл. ед. Несколько меньшие средние значения в группах с первично-прогрессирующим и вторично-прогрессирующими типами течения РС и составляют $0,171 \pm 0,009$ усл. ед. и $0,151 \pm 0,011$ усл. ед. соответственно. Наименьшие показатели среднего значения оптической плотности гранул iNOS в группе с ремиттирующе-рецидивирующим типом течения РС в стадии ремиссии и составляют $0,133 \pm 0,017$ усл. ед.

Параллельное изучение экспрессии COX-2 показало однотипную направленность показателей в зависимости от типа течения заболевания (рис. 13).

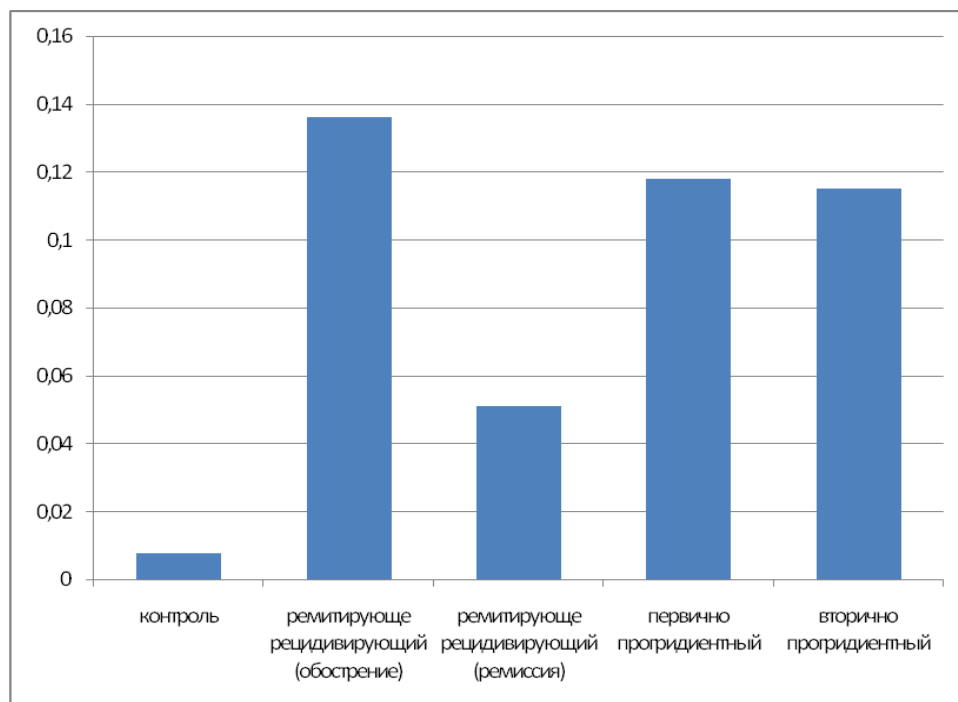


Рис. 13. Зависимость показателей оптической плотности COX-2 от типа течения рассеянного склероза.

Так, наибольшие значения оптической плотности циклооксигеназы-2 отмечаются в группе с ремиттирующе-рецидивирующим типом течения рассеянного склероза в стадии обострения и составляют $0,136 \pm 0,007$ усл. ед. Несколько меньшие, практически одинаковые показатели оптической плотности, отмечаются при первично-прогрессирующем и вторично-прогрессирующем типах течения РС и составляют $0,118 \pm 0,008$ усл. ед. и $0,151 \pm 0,01$ усл. ед. соответственно. Наименьшие показатели оптической плотности COX-2 отмечаются в группе с ремиттирующе-рецидивирующим типом течения РС в стадии ремиссии и составляют $0,051 \pm 0,014$ усл. ед.

Анализируя показатели оптической плотности циклооксигеназы-2 и индуцибельной фракции синтазы оксида азота в группе с ремиттирующе-рецидивирующим типом течения РС в стадии ремиссии, следует отметить, что, несмотря на наличие клинической ремиссии, в компонентах периферической нервной системы не прекращают протекать воспалительные и дистрофические процессы. При анализе однородности показателей оптической плотности COX-2 и iNOS в группе с ремиттирующе-рецидивирующим типом течения рассеянного склероза в стадии ремиссии обращает на себя внимание достаточно выраженная дисперсия данных показателей. Так, колебания оптической плотности внутри группы варьировали от 0,01 усл. ед. до 0,076 усл. ед., что, возможно, отображает глубину клинической ремиссии, а, возможно, и предрасположенность к обострению и дальнейшему прогрессированию заболевания.

Экспрессия эндотелиальной фракции синтазы оксида азота в целом при рассеянном склерозом и отдельно по исследуемым группам статистически достоверно не отличается от таковой в контрольной группе. Однако, следует отметить, что изучение активности eNOS показывает расширение зон положительной активности данной фракции синтазы оксида азота за счет появления позитивно окрашенных структур вдали от сосудистого русла, в тоже время интенсивность экспрессии в таких участках не достигает интенсивности, выявляемой в стенке сосудов и периваскулярном и периневральном пространствах.

Экспрессия eNOS, кроме сосудистого русла, определяется и в компонентах нервной системы, а именно в шванновских клетках и клетках периневрия. Однако, по аналогии с динамикой экспрессии в сосудистой стенке, мы не отметили статистически значимых изменений продукции данного фермента.

Таким образом, на основании вышеописанных данных можно сделать следующие выводы:

1. В элементах периферической нервной системы при рассеянном склерозе возникают демиелинизация и дистрофические изменения нервных волокон в виде разволокнения, склероза, варикозного вздутия и очагового уменьшения шванновских клеток.

2. В периневральном и периваскулярном пространстве кожи выявляются воспалительные изменения, при этом в клетках лимфоцитарного воспалительного инфильтрата экспрессируется большое количество циклооксигеназы-2 и синтазы индуцибельной фракции оксида азота.

3. Одним из звеньев патогенеза, усиливающих демиелинизацию и дистрофические изменения нервных волокон, может служить активация в шванновских клетках индуцибельной фракции синтазы оксида азота и циклооксигеназы-2.

4. Наличие эндотелиальной дисфункции и воспалительных изменений в компонентах периферической нервной системы при разных типах течения рассеянного склероза, в том числе и в стадии ремиссии, следует учитывать при назначении патогенетической терапии.

Литература

1. Актуальные проблемы патофизиологии: Избранные лекции/под ред. Б.Б. Мороза.- М.:Медицина, 2001.- 424 с

2. Ведяев Ф.П. Лимбическая система мозга, эмоциональный стресс и его эндокринно-вегетативные проявления // Вестн. АМН СССР. – 1975- № 8. - С. 57-65.

3. Клініко-нейрофізіологічна характеристика ураження периферичної нервової системи при розсіяному склерозі та хронічній запальній демієлінізуючій полінейропатії, сучасні підходи до лікування [Текст] : автореф. дис. канд. мед. наук : 14.01.15 / Ю. Д.

Карнаух, 2010. - 18 с

4. Корсунская Л.Л., Клопотий Е.В., Чонина М.Ю. Клинический случай поражения периферической нервной системы в виде нейропатии локтевого нерва у больного рассеянным склерозом // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – Т.12. - № 4(48). – С. 87-90.,

5. Крыжановский Г.И. Общая патофизиология нервной системы.– М.: Медицина, 1997. – 450 с.

6. Пивнева Т.А.. Механизмы демиелинизации при рассеянном склерозе // Нейрофизиология. – 2009. – Т.41. - № 1. – С.429-437.

7.Сергиенко В. И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева. – М. : ГЭОТАР Медицина, 2000. – 256 с.

8. Carlson N.G., Hill K.E., Tsunoda I., Fujinami R.S., Rose J.W. The pathologic role for COX-2 in apoptotic oligodendrocytes in virus induced demyelinating disease: implications for multiple sclerosis // J Neuroimmunol. 2006 May;174(1-2):21-31.

9. D'haeseleer M, Cambron M., Vanopdenbosch L., De Keyser J. Vascular aspects of multiple sclerosis // Lancet neurology. Ukrainian edition lessue – 2012. - № 8. С. 26 – 37.

10. Palumbo S, Bosetti F. Alterations of brain eicosanoid synthetic pathway in multiple sclerosis and in animal models of demyelination: role of cyclooxygenase-2 // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2013 Oct;89(5):273-278.

11. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria / Ann Neurol. – 2011 - Feb;69(2):292-302.

Literature

1. Actual problems of pathophysiology: Selected lectures / ed. BB Moroza.- М.: Medicine, 2001.- 424 with

2. Vedyayev FP The limbic system of the brain, emotional stress and endocrine and autonomic manifestations // Vestn. Academy of Medical Sciences of the USSR. - 1975- № 8. - S. 57-65.

3. Clinical and neurophysiological characteristic lesions of the peripheral nervous system in multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, current treatment approaches [text] Abstract. Dis. candidate. honey. Sciences: 14.01.15 / YD Karnaukh, 2010. - 18 s

4. LL Korsun, EV Klopoty, Chonina MY Case disorders of the peripheral nervous system in the form of neuropathy of the ulnar nerve in a patient with multiple sclerosis // Tauride Medical and Biological Bulletin. - 2009 - vol.12. - № 4 (48). - S. 87-90.,

5. GI Kryzhanovsky General pathophysiology of nervous sistemy.- М .: Medicine, 1997. -

450 p.

6. Pivneva TA .. Mechanisms of demyelination in multiple sclerosis // Neurophysiology. - 2009. - T.41. - № 1. - S.429-437.

7. Sergienko VI Mathematical Statistics in clinical trials / VI Sergienko, IB Bondarev. - M.: GEOTAR Medicine, 2000. - 256 p.

8. Carlson N.G., Hill K.E., Tsunoda I., Fujinami R.S., Rose J.W. The pathologic role for COX-2 in apoptotic oligodendrocytes in virus induced demyelinating disease: implications for multiple sclerosis // J Neuroimmunol. 2006 May;174(1-2):21-31.

9. D'haeseleer M, Cambron M., Vanopdenbosch L., De Keyser J. Vascular aspects of multiple sclerosis // Lancet neurology. Ukrainian edition lessue – 2012. - № 8. C. 26 – 37.

10. Palumbo S, Bosetti F. Alterations of brain eicosanoid synthetic pathway in multiple sclerosis and in animal models of demyelination: role of cyclooxygenase-2 // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2013 Oct;89(5):273-278.

11. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria / Ann Neurol. – 2011 - Feb;69(2):292-302.