

**Zánětlivé a degenerativní markery v mozkomíšním moku
pacientů s roztroušenou sklerózou mozkomíšní**

Dizertační práce

obor Neurologie

MUDr. Vladimíra Sládková

Olomouc 2012

Autorské prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne 25.4.2012

MUDr. Vladimíra Sládková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svým školitelitelům, doc. MUDr. Janu Marešovi, Ph.D. za erudované vedení při zpracování zadaného tématu a cenné připomínky a prof. Ing. MUDr. Petru Hlušítkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování dat k publikacím a jazykovou korekturu. Mé díky patří i Mgr. Janě Zapletalové, Dr. a Mgr. Kateřině Langové, Ph.D. za statistické zpracování dat a pomoc při interpretaci výsledků. V neposlední řadě jsem vděčná prof. MUDr. Petru Kaňovskému, CSc. za iniciaci a vytvoření podmínek k vytvoření této práce.

Obsah

1 Úvod.....	8
1.1 Úvod do problematiky RS.....	9
1.2 Epidemiologie RS.....	9
1.3 Etiopatogeneza RS.....	11
1.3.1 Autoimunitní teorie.....	11
1.3.1.1 Vývoj plaky v čase.....	13
1.3.1.2 Mechanismus tkáňové destrukce.....	13
1.3.1.3 Reparace.....	14
1.3.2 Vztah matrixových metaloproteináz k etiopatogenezi RS.....	15
1.3.3 Úloha chronické cerebrospinální žilní insuficience v patogenezi RS.....	16
1.4 Formy a klinické příznaky.....	17
1.4.2 Klinické příznaky.....	19
1.4.3 Kurtzkeho škála Expanded Disability Status Scale (EDSS).....	21
1.5.1 Diagnostická kritéria.....	23
1.5.2 Pomocná vyšetření.....	25
1.5.2.1 MR.....	26
1.5.2.2 Vyšetření mozkomíšního moku.....	26
1.5.2.3 Evokované potenciály.....	31
1.5.2.4 Oftalmologické vyšetření.....	31
1.6 Diferenciální diagnóza.....	32
1.6.1 Neuromyelitis optica Devic (NMO).....	32
1.6.2 Akutní demyelinizační encefalomyelitida (ADEM).....	32
1.6.3 Neuroborrelióza.....	33
1.6.4 Neurosarkoidóza.....	33
1.6.5 Behçetova choroba.....	33
1.6.6 Sjögrenův syndrom.....	34
1.6.7 SLE.....	34
1.6.8 Vzácné příčiny.....	35
1.7 Terapie.....	35
1.7.1 Léčba ataky.....	35
1.7.2 Dlouhodobá terapie ke snížení počtu atak a zpomalení progresu onemocnění.....	36

1.7.3 Intenzivní imunomodulační léčba v případě agresivního průběhu nemoci	39
1.7.4 Léčba CIS.....	40
1.7.5 Symptomatická terapie.....	40
2.1 Soubor.....	43
2.2 Metodika.....	45
2.3 Statistické zpracování	46
2.4 Výsledky.....	46
2.4.1 Výsledky 1.....	46
2.4.2 Výsledky 2.....	51
2.4.3 Výsledky 3.....	55
2.5 Diskuse	60
2.5.1 Diskuse 1.....	61
2.5.2 Diskuse.....	61
2.5.3 Diskuse 3.....	67
3 Závěr.....	69
4 Souhrn	70
4.1 Souhrn český	70
4.2. Summary	72
5 Literatura	74
6 Publikace	81
6.1 Práce související s dizertační prací.....	81
6.1.1 Původní vědecké publikace uveřejněné in extenso v recenzovaných vědeckých časopisech s IF	81
6.1.2 Původní vědecké publikace uveřejněné in extenso v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech	81
6.1.3 Přehledné/souborné vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech	82
6.1.4 Publikovaná abstrakta	82
6.2 Ostatní publikace	85
6.2.1 Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v recenzovaných vědeckých časopisech s IF	85
6.2.2 Přehledné/souborné vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech	86
6.2.3 Publikovaná abstrakta	86
7 Přílohy.....	88

Seznam použitých zkratk

AAT	alfa-1-antitrypsin
ACE	angiotensin-konvertující enzym
ADEM	akutní diseminovaná encefalomyelitida
APO-A-I	apolipoprotein A-I
APO-B	apolipoprotein B
APP	amyloidový prekurzorový protein
CCSVI	chronická cerebrospinální žilní insuficience
CDMS	clinical definated multiple sclerosis
CIS	klinický izolovaný syndrom
CNS	centrální nervový systém
CSF	cerebrospinal fluid
DIS	dissemination in space
DIT	dissemination in time
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EP	evokované potenciály
HEB	hemato-encefalická bariéra
HLA	hlavní histokompatibilní komplex
HLB	hemato-likvorová bariéra
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
MEP	motorické evokované potenciály
MHC	major histocompatibility complex
MMP	matrixové metaloproteinázy
MR	magnetická rezonance

MSFC	Multiple Sclerosis Functional Composite
NS	nervový systém
NSE	neuron-specifická enoláza
OCB	oligoclonal bands
OCT	optická počítačová tomografie
PASAT	Paced Auditory Serial Addition Test
PML	progresivní multifokální leukoencefalopatie
PP	primárně progredientní forma RS
RS	roztroušená skleróza
RR	relaps-remitentní forma RS
SLE	systémový lupus erythematoses
SP	sekundárně progredientní forma RS
SSEP	somato-senzorické evokované potenciály
TCR	receptor T-lymfocytu
TNF	tumor-nekrotizující faktor
VEP	vizuální evokované potenciály
9-HPT	9 hole peg test

1 Úvod

Tématem dizertační práce je zhodnocení likvorových markerů u pacientů s roztroušenou sklerózou mozkomíšní (RS). Je známo, že RS je onemocnění, u kterého probíhají současně zánětlivé i neurodegenerativní procesy. Odrazem tohoto dění je přítomnost a určité množství specifických látek v mozkomíšním moku.

Práce má teoreticko-empirický charakter. V teoretické části je analyzována problematika RS, její epidemiologické a etiopatogenetické aspekty, je podán přehled forem a klinických příznaků onemocnění, výčet diagnostických a pomocných vyšetření, diferenciálně diagnostická charakteristika a také nastíněny současné možnosti terapeutického ovlivnění průběhu RS.

Empirická část je zaměřená na analýzu likvorových markerů a možnosti jejich využití v diagnostice RS. Základní výzkumný problém byl definován na základě našeho předpokladu, že některý z likvorových markerů může být typickým ukazatelem pro konkrétní formu RS a může být tudíž ukazatelem intenzity zánětu nebo míry neurodegenerace, a tak predikovat průběh onemocnění.

Vyšetřovaný soubor tvořili pacienti hospitalizovaní na Neurologické klinice FN a LF UP Olomouc v letech 2005 až 2009 s diagnózou roztroušené sklerózy mozkomíšní. Kontrolní soubor tvořili nemocní, kterým byla provedena lumbální punkce z diferenciálně diagnostických důvodů k vyloučení neuroinfekce či krvácení do CNS.

Výsledky našeho empirického šetření mohou posloužit jako podklad pro další základní výzkum, tedy hledání souvislostí mezi likvorologickým obrazem pacienta a klinickými projevy onemocnění.

1.1 Úvod do problematiky RS

Roztroušená skleróza mozkomíšní je chronické zánětlivé demyelinizační onemocnění CNS vedoucí k demyelinizaci nervových vláken a jejich následné ztrátě. Patří mezi autoimunitní onemocnění, kde cílovými antigeny jsou antigeny myelinové pochvy nervových vláken v CNS (1).

1.2 Epidemiologie RS

Roztroušená skleróza mozkomíšní je onemocnění, na jehož rozvoji se patrně podílí celá řada environmentálních a genetických vlivů. Prevalence výskytu RS se liší v závislosti na etnickém původu a zeměpisné poloze. Nejčastěji postihuje indoevropskou rasu v mírném geografickém pásmu (2). Nejvyšší prevalence onemocnění je na Islandu, ve Skandinávii, Velké Británii a v zemích osídlených lidmi pocházejícími z těchto území: v USA, Kanadě, Austrálii a Novém Zélandu. Tato skutečnost podporuje hypotézu, že gen vnímavosti k onemocnění RS rozšířili v Evropské populaci Vikingové a následně migrací obyvatelstva, vlivem obchodu či křížáckých válek expandoval do dalších oblastí, např. východní Evropy či Asie (3). V Asii místo RS dominuje onemocnění neuromyelitis optica Devic, v oblasti rovníku je téměř neznámá. Výskyt RS u Afroameričanů je vyšší vzhledem k jejich asimilaci s bílou rasou (2). Prevalence onemocnění RS u nás je udávána 80–130 nemocných na 100 000 obyvatel (4).

Metaanalýza prevalenčních studií Simpsona a kol., která zpracovala data z 321 studií z 59 zemí a z období let 1923 až 2009, potvrzuje silný statisticky signifikantní gradient výskytu RS v závislosti na zeměpisné šířce. Tento gradient platí pro ženy i muže, nemění se poměr výskytu ženy:muži 2:1 a nedochází ani k jeho změně v čase. Existují i výjimky z tohoto pravidla, které upozorňují na možnou interakci mezi geny vnímavosti (např. HLA-DRB1*1501 či HLA DQ0601) a environmentálními rizikovými faktory (např. expozicí UV záření). Takovou výjimkou je např. opačný gradient výskytu RS mezi jižní a severní částí Itálie (5). Genetický podklad onemocnění RS potvrzuje i to, že v oblastech s vysokou prevalencí RS žijí etnické skupiny, u kterých je RS vzácností (např. Eskymáci, Japonci, Laponci) (1).

Řada studií prokazuje nepřímou úměru mezi intenzitou UVB záření a prevalencí RS, kdy s přibývajícím intenzitou UVB záření klesá výskyt onemocnění RS. Tato skutečnost se

vysvětluje schopností UVB záření indukovat v kůži tvorbu vitamínu D, který je považován za protektivní faktor v souvislosti s rozvojem RS. Jednou ze studií je práce Ortona a kol. zabývající se rodinami francouzských farmářů, u kterých je tato nepřímá úměra nejmarkantnější v zimních měsících a to především u žen (6). Práce Meiera a kol. potvrzuje vyšší subklinickou aktivitu onemocnění s výskytem nových lézí při MRI vyšetření na T2-vážených řezech v období od března do srpna ve srovnání se zbytkem roku (7).

Již v roce 1972 se objevily první zmínky o geneticky podmíněné vnímavosti k rozvoji onemocnění RS. Podezřelými jsou určité alely HLA systému, geny pro TCR, geny pro některé složky komplementu, geny pro určité komponenty myelinu či geny pro tumor-nekrotizující faktor. Dědičnost vnímavosti k RS je pravděpodobně polygenní. Předpokládá se i existence genů pro prognózu onemocnění (1). V současnosti je nejvíce podezřelá alela HLA DRB1*1501. Goodin a kol. ve své studii uvádějí, že vnímavost k rozvoji RS je dána kombinací pouze malého počtu genetických lokusů na „alele vnímavosti“. Tudíž význam alely HLA DRB1*1501 není tak velký, jak se dosud předpokládalo. Dle jeho práce pouze 5,2 % jedinců s touto alelou je vnímavých k vývoji RS (8). Ze studií rodin nemocných s RS vyplývá, že v populaci s prevalencí onemocnění 1/1 000 obyvatel je pravděpodobnost rozvoje nemoci u příbuzných 1. stupně 3–4 % a u jednovaječného dvojčete 34 % (4).

Vzhledem k tomu, že prevalence onemocnění RS se u některých populací stejného etnického původu liší v závislosti na tom, v jakém geografickém pásmu žijí, předpokládá se vliv určitých virů na etiopatogenezi RS. Byla zkoumána celá řada virů, ovšem u žádného nebyla zjištěna přímá souvislost mezi jeho seropozitivitou a rozvojem RS (1). Mezi nejvíce podezřelé viry patří Epstein-Barrové virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) a herpes simplex typ I (HSV). Waubant a kol. provedli retrospektivní analýzu seropozitivity EBV, CMV a HSV I a přítomnosti alely HLA DRB1*1501 u dětí do 18 let. Zjistili pouze nízkou vnímavost k rozvoji RS při infekci těmito viry, přičemž nejvýraznější interakci zaznamenali u jedinců s protilátkami proti HSV I a současně s alelou HLA DRB1*1501 (9). Rovněž reaktivace latentní infekce EBV nevedla k exacerbaci RRMS u statisticky signifikantního počtu nemocných (10).

Velmi zajímavé je zjištění, že kouření cigaret je důležitý faktor ovlivňující vnímavost k rozvoji RS, ale jeho efekt na progresi již stávajícího onemocnění je sporný (11).

1.3 Etiopatogeneza RS

Patogeneza RS je charakterizována procesem zánětu a neurodegenerace. Typický je nález mnohočetných infiltrátů v bílé hmotě mozkové, ve kterých se nacházejí aktivované T-lymfocyty a makrofágy, v menší míře B-lymfocyty (2). Onemocnění je patrně spouštěno imunitní reakcí na myelinu podobný epitop na periférii, což vede k tvorbě a aktivaci T-lymfocytů cílených na neidentifikovaný antigen (12).

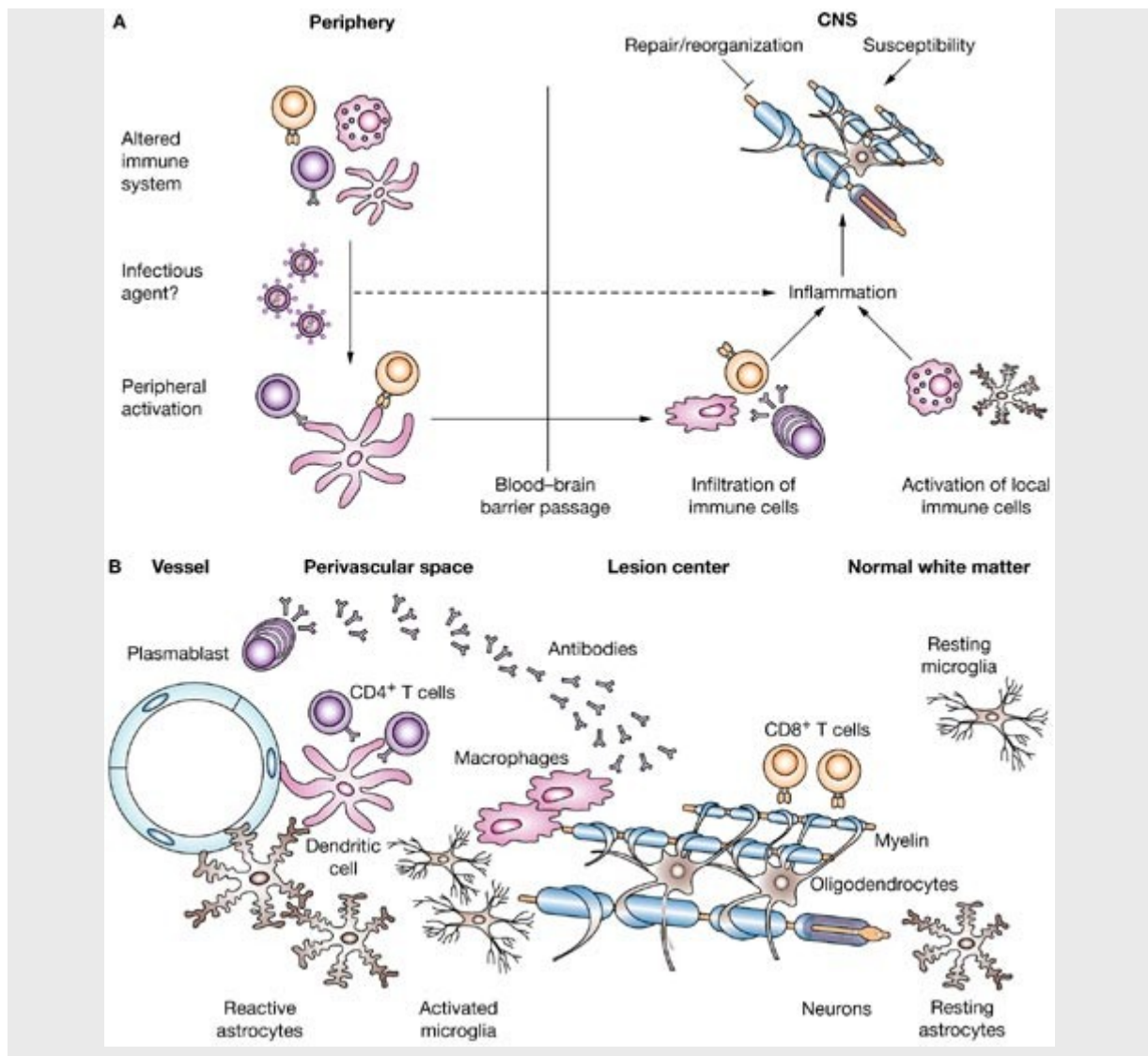
1.3.1 Autoimunitní teorie

Mozek byl dříve považován na imunoprivilegovaný orgán, tj. orgán podléhající jen velmi omezenému dohledu imunitního systému. Toto tvrzení ovšem nyní vyvracejí mnohé studie. Při poškození mozkové tkáně dochází k aktivaci mikroglie, která ovlivňuje HLA systém a kostimulační molekuly. Aktivovaná mikroglie produkuje cytokiny a chemokiny umožňující vstup lymfocytů, monocytů a dendrocytům podobným buňkám do léze. Současně s tím se antigeny z CNS dostávají do periferie. Bývají nalézány v krčních a paraspinalních lymfatických uzlinách, přičemž není známo, zda jsou zde drénovány spontánně nebo jsou aktivně vychytávány fagocyty. Imunitní reakce se spouští v lymfatických uzlinách, kde dochází k vazbě antigenu na antigen-prezentující buňku prostřednictvím MHC II. třídy a současně k navázání CD4+ T-lymfocytu přes receptor T-lymfocytu (TCR) za účasti kostimulačních a adhezivních molekul. Tato vazba iniciuje klonální expanzi CD4+ T-lymfocytů, které přecházejí přes hemato-encefalickou bariéru (HEB) a nacházejí se především perivaskulárně a v meningách. Naproti tomu CD8+ T-lymfocyty rozeznávají molekuly MHC I. třídy a kumulují se tedy uvnitř zánětem postižené tkáně. Aktivované CD4+ T-lymfocyty stimulují makrofágy k produkci interleukinu (IL)-1, IL-6 a tumor nekrotizujícího faktoru (TNF)- α . CD8+ T-lymfocyty díky své schopnosti vázat se na MHC I. třídy mohou atakovat oligodendrocyty a neurony.

B-lymfocyty jsou aktivovány rovněž v lymfatických uzlinách prostřednictvím dendritických buněk. Jejich klonální expanzi spouští vazba na aktivovaný antigen-specifický T-lymfocyt. Takto aktivované B-lymfocyty přecházejí rovněž přes HEB, infiltrují perivaskulární prostory a meningy a produkují antigen-specifické protilátky. Otázka, zda

k aktivaci T a B-lymfocytů dochází v lymfatických uzlinách či v CNS, zůstává dosud předmětem diskuzí (13). Viz obrázek 1.

Obrázek 1. Imunopatogeneza RS (12).



1.3.1.1 Vývoj plaky v čase

Zánětlivé ložisko (plaka) podléhá vývoji v čase. U relaps-remitentní formy dochází během prvních dnů k aktivaci mikroglie a makrofágů, které exprimují na svém povrchu molekuly MHC II. třídy a receptor pro C3d složku komplementu. HEB zůstává intaktní, takže zánětlivé infiltráty v CNS jsou vzácné, demyelinizace a astroglióza chybí. Šestý až dvacátý týden od počátku onemocnění vlivem poruchy HEB je léze zaplněna buněčnými infiltráty, aktivovanými astrocyty s proliferujícími oligodendrocyty na okraji. Toto je nejaktivnější období nemoci. Po 20. týdnu počet zánětlivých elementů klesá, a to ze středu k okraji léze. K poškození axonů a demyelinizaci dochází již od počátku onemocnění a jeho rozsah odpovídá intenzitě zánětu. Proces demyelinizace, proliferace oligodendroglie a remyelinizace, která bývá obvykle inkompletní, probíhá u všech pacientů, ale v rozdílné míře (13).

U primárně či sekundárně progresivní formy RS je tento obraz odlišný. Ačkoli se zde stále vyskytují demyelinizační léze bílé hmoty, klasické demyelinizační plaky jsou vzácné. Je patrné pomalé rozšiřování plaky v marginální oblasti, kde se nacházejí zánětlivé infiltráty tvořené převážně T-lymfocyty a aktivovanou mikroglíí. Jen některé z mikroglíálních buněk obsahují degradační produkty myelinu, což ukazuje na velmi malou intenzitu demyelinizace. Současně okolní bílá hmota CNS, která při MR vyšetření vypadá intaktní, je vysoce abnormní. Je postižena difúzním zánětem a generalizovanou aktivací mikroglie, což je provázeno rozsáhlým poškozením a destrukcí axonů a následnou sekundární demyelinizací. Kromě již zmíněné bílé hmoty mozkové je výrazně postižen i kortex, v extrémních případech až 60 % veškerého kortexu. Aktivní kortikální léze jsou spojeny se zánětlivými infiltráty v oblasti leptomening (14).

Z prací zabývajících se MR zobrazením a histologií chronických RS lézí vyplývá, že s nárůstem chronicity procesu se vlastní zánětlivá reakce lokalizuje do CNS za intaktní HEB, tedy mimo kontrolu periferního imunitního systému. Tato skutečnost by mohla vysvětlit inefektivitu systémové imunoterapie v pokročilých stádiích RS (14).

1.3.1.2 Mechanismus tkáňové destrukce

Mechanismus tkáňového poškození se u jednotlivých forem RS liší. U relaps-remitentní formy v klasických aktivních demyelinizačních lézích jsou mediátory axonálního poškození

cytotoxické T-lymfocyty, specifické autoprotilátky a mechanismy vrozené imunity, jako je geneticky podmíněná vnímavost cílové tkáně. Histologickým vyšetřením mozkových autopsií a biopsií byly nalezeny rozdíly i mezi jednotlivými pacienty. U některých dominovaly aktivované T-lymfocyty a makrofágy, u jiných byla nalezena akumulace autoprotilátek a komplementu. Jinou variantou jsou léze imitující postižení bílé hmoty mozkové ischemickým iktem, kdy vlivem kyslíkových a NO radikálů dochází k alteraci funkce mitochondrií a následné histotoxické hypoxii. V dalších autopsiích byla nalezena jen mírná zánětlivá reakce s výraznější degenerací oligodendroglie na okrajích lézí, která by mohla svědčit pro geneticky podmíněnou zvýšenou vnímavost cílové tkáně k autoimunitnímu poškození. Zde je patrně základ individuální odpovědi na terapii, např. plazmaferéza by měla být neúčinnější u pacientů s protilátkou či komplementem navozenou tkáňovou destrukcí (14). Práce Barnetta a Prinease dokonce popisují různé druhy lézí u jednoho pacienta, ale tento nálezn je patrně způsoben rozdílnou metodikou obou prací (15).

U primárně či sekundárně progresivní formy RS se histologický obraz lézí v mnohém liší. Makrofágy s produkty degradace myelinu jsou velmi vzácné nebo úplně chybí. Na okraji léze se nachází aktivovaná mikroglie obsahující jen malé množství degradovaného myelinu a perivaskulárně aktivované T-lymfocyty. Bylo zaznamenáno jen malé množství komplementu, kterému chybí aktivní terminální lytická část. Kortikální léze bývají drobné, perivaskulární nebo navazují na subkortikální léze a nacházejí se převážně v sulcích nebo hlubších částech kortexu, např. v inzule, cingulu, frontobazálně, temporobazálně a cerebelu. Demyelinizace u chronických subpiálních lézí je patrně způsobena zánětlivými buňkami v meningách, které svými působky aktivují mikroglie (14).

1.3.1.3 Reparace

Reparace poškozených myelinových pochev je možná pouze na počátku onemocnění, kdy není ještě poškozeno velké množství oligodendrocytů, které jediné jsou schopny vytvářet centrální myelin. Nově vytvořený myelin není plnohodnotný, je tenší a kratší. Vedení vzruchu jeho prostřednictvím je tedy pomalejší. Po opakovaných vzplanutích zánětu v určité lokalizaci dochází k poškození i oligodendroglie, což způsobuje výrazné omezení regenerační schopnosti myelinu a následné poškození axonu (4). Obrazem remyelinizace jsou tzv. stínové plaky, což jsou oblasti s méně denzním myelinem a nestejnou tloušťkou myelinové pochvy.

Makroskopicky se jeví bledší než okolní nervová tkáň. Jsou častější v akutním stádiu onemocnění než v období chronické progresy (1).

1.3.2 Vztah matrixových metaloproteináz k etiopatogenezi RS

V posledních letech byla publikována celá řada prací zabývajících se vztahem matrixových metaloproteináz (MMP) k patogenezi onemocnění CNS. MMP byly poprvé popsány J. Grosse a CH. Lapierem v roce 1962, v současnosti je známo 26 enzymů (16). MMP jsou Zn-dependentní endopeptidázy, jejichž proteolytická aktivita je zaměřena na extracelulární matrix. Významně se podílejí na zánětlivých procesech, způsobují rozsáhlé poškození tkáně a výraznou remodelaci tkáně, proto je jejich aktivita velmi přísně kontrolována. Aktivita MMP v organismu je velice nízká, jsou aktivovány jen v malé míře a pouze lokálně, např. při ovulaci, menstruaci, při remodelaci kostí, embryogenezi, angiogenezi a reparaci. Zvýšení hladiny MMP je většinou spojeno s patologickým procesem. V CNS jsou secernovány astrocyty, mikroglíí, endotelem, T-lymfocyty i makrofágy. Koncentrace MMP stoupá např. u RS, amyotrofické laterální sklerózy (ALS), chronické zánětlivé demyelinizační polyneuropatie (CIDP), Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby, po ischemickém iktu či intracerebrálním krvácení. U RS se MMP podílejí na porušení hemato-likvorové bariéry (HLB), perivaskulární infiltraci lymfocyty, na ložiskovém poškození myelinu a axonů. Nejvíce zkoumanou je MMP-9, jejíž zvýšenou hladinu lze detekovat v séru i likvoru pacientů s RS na rozdíl od zdravých kontrol, kde je její hladina neměřitelná. Bylo prokázáno, že hladina MMP-9 pozitivně koreluje s aktivitou onemocnění, tedy i s nárůstem počtu lézí při MR vyšetření (16).

Byly testovány účinky synteticky vyrobených inhibitorů MMP na zvířecích modelech nebo např. u onkologických pacientů či pacientů s revmatoidní artritidou. Výsledky nejsou zatím přesvědčivé pro nízkou účinnost a výrazné nežádoucí účinky. Přínosnější se jeví stanovení hladiny MMP-9 pro posouzení aktivity onemocnění, stanovení prognózy konverze CIS do klinicky definované RS nebo objektivizaci ataky při psychickém či fyzickém vypětí nebo infektu, kdy je subjektivní zhoršení těžko odlišitelné. Další možností je stanovení hladiny MMP-3, jejíž elevace je přítomna v době ataky a měsíc po ní, ne v době remise (16).

1.3.3 Úloha chronické cerebrospinální žilní insuficience v patogenezi RS

Vedle všeobecně uznávané a efektem imunomodulační terapie podporované autoimunitní teorie etiopatogeneze RS se v posledních letech „vynořil“ velice kontroverzní, staronový koncept vlivu chronické cerebrospinální žilní insuficience (CCSVI) na rozvoj onemocnění RS. První zmínky o souvislosti žilní insuficience s RS se objevily již v roce 1839 v Cruveilhierově práci. V roce 1863 popsal Rindfleisch a následně Charcot vaskulární obstrukci a přeplněné cévy v centru RS plak (17). Následně v průběhu 19. a 20. století vznikla řada prací zabývajících se touto teorií, např. práce Putnama ve 30. a Foga v 60. letech 20. století. Všechny se opíraly o hypotézu, že porucha žilní drenáže vede k poruše hemato-likvorové bariéry a vzniku zánětlivých ložisek v CNS. Novější, imunologické modely hovoří o tom, že stázou krve v žilním systému se prodlužuje doba kontaktu imunitních elementů, především T-lymfocytů, ale i virů či volných radikálů s endotelem, což usnadňuje jejich přestup přes hemato-encefalickou bariéru (18). Tuto teorii podporuje publikace Adamse z roku 1988 o průkazu přítomnosti hemosiderinu v 30 % RS plak při vyšetření kadaverózních mozků nemocných s RS (19). Podobné výsledky přineslo měření množství hemosiderinu prostřednictvím MR, nejvyšší hodnoty byly nalezeny v oblasti bazálních ganglií, především striata, talamu a hipocampu (17).

Posledním, kdo znovu vzkřísil tento kontroverzní koncept CCSVI, byl v roce 2006 Zamboni, který uveřejnil článek s názvem: *The big idea: Iron-dependent inflammation in venous disease and proposed parallels in multiple sclerosis*. V něm rozvíjí teorii, že RS je způsobena imunitní či zánětlivou reakcí na železo akumulované v CNS v důsledku insuficience žilního cerebrospinálního řečiště (20). V následujících sděleních z roku 2009 popsal přítomnost alespoň 2 ze 4 kritérií žilní insuficience u 100 % pacientů s RS na rozdíl od nulového výskytu u zdravých kontrol či pacientů s jinými neurologickými chorobami. K verifikaci bylo použito ultrazvukové vyšetření (UZ), včetně transkraniálního zobrazení. UZ kritéria obsahovala: 1. morfologickou anomálii v B modu (atypicky umístěné chlopně, septa, stenózy); 2. přítomnost žilního refluxu; 3. paradoxní kolaps žíly v horizontální poloze; 4. nepřítomnost toku v některé ze žil (18). Výsledky studií dalších autorů nejsou již tak přesvědčivé nebo naopak popírají Zamboniho teze, jako např. práce Wattjese a kol., který pomocí magnetické rezonanční venografie žádnou poruchu žilního toku neprokázal (20).

Teorii o podílu CCSVI na etiopatogenezi RS vyvrací i další klinická a paraklinická vyšetření. Při vyšetření biopsií či autopsií tkáně CNS pacientů s RS nebyl nalezen edém ani

hemoragické infarkty, které jsou příznačné pro těžkou žilní insuficienci. Postižení optického nervu a míchy (nejčastěji postižené struktury u RS) nelze vysvětlit hypotézou o CCSVI. Stejně tak pokles aktivity onemocnění RS ve 2. a 3. trimestru těhotenství, vyšší prevalence RS u mladých jedinců nebo geografické variace výskytu RS (20). V neposlední řadě nepopíratelný efekt imunomodulační a imunosupresivní terapie opět nekoresponduje s teorií o CCSVI.

Pomineme-li tuto hypotézu, u nemocných s RS byly popsány 3 typy vaskulární dysfunkce. 1. Epidemiologické studie prokázaly u nemocných s RS vyšší pravděpodobnost rozvoje ischemického iktu. Důvodem je patrně zánětem způsobená dysfunkce endotelu se vzestupem hladiny homocysteinu v séru. 2. Nemocní s RS mají globální cerebrální hypoperfúzi, která může být predispozicí k rozvoji ischemie. Difúzní pokles perfúze je pravděpodobně způsoben redukcí axonální aktivity a poklesem energetického metabolismu astrocytů. Zdá se, že některé fokální léze jsou ischemického původu, což by mohlo mít vztah ke kognitivní dysfunkci u nemocných s RS. 3. V důsledku redukce cerebrální perfúze je zpomalena i venózní drenáž (21).

1.4 Formy a klinické příznaky

Akutní vznik neurologických příznaků je dán demyelinizací centrálních drah, tedy kondukčním blokem, který způsobí výpadek funkce.

1.4.1 Formy RS

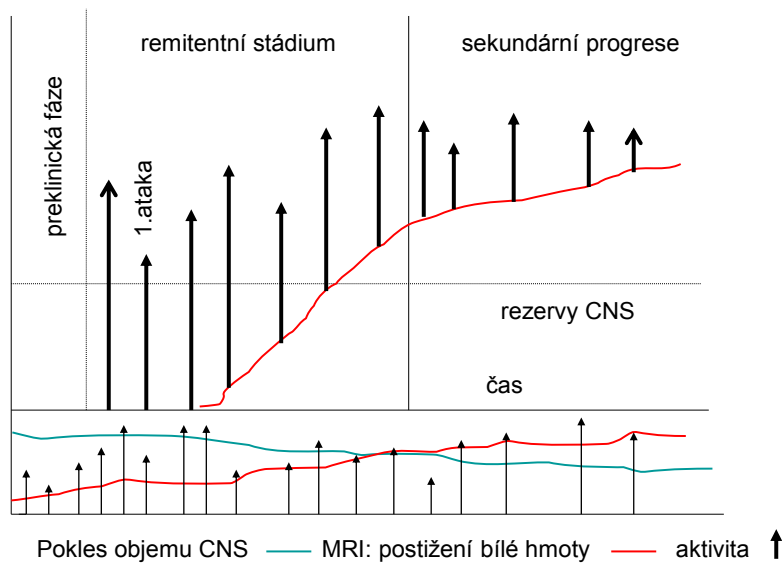
První klinický příznak onemocnění RS se nazývá *klinicky izolovaný syndrom (CIS)*. Pokud se vyvine další ataka onemocnění, hovoříme o *klinicky definované RS (CDMS)* (4). Ataku definujeme vznikem nových nebo zhoršením již stávajících neurologických příznaků, které přetrvávají alespoň 24 hodin a nejsou provázeny horečkou. Progresí rozumíme zhoršení objektivního neurologického nálezu trvající 3–6 měsíců (2).

Nejčastějším typem průběhu onemocnění je *relabující remitující*, kterým trpí 85 % pacientů v prvních 10–15 letech. Je charakterizován atakami s různě dlouhými obdobími remisí a různou mírou úpravy klinického nálezu po jednotlivých atakách. V tomto období je na MR patrná vysoká zánětlivá aktivita. Během let míra zánětu klesá a RS přechází do *stádia*

sekundární chronické progresse, kdy ataky již nejsou tak nápadné a dochází spíše k postupnému nárůstu neurologického deficitu. Přechod do stádia sekundární progresse je dán převahou neurodegenerace a vyčerpáním rezerv CNS, úroveň neurologického deficitu odpovídá stupni 4-5 Kurtzkeho škály (EDSS). Viz obrázek 2. Typ RS s vysokou zánětlivou aktivitou a současně s velkou mírou neurodegenerace se nazývá **relabující-progredující**. Kromě neúplné úzdravy po atakách je tento typ charakterizován postupným nárůstem neurologického deficitu a během několika málo let nemocného těžce invalidizuje. Postihuje asi 3 % pacientů. U 15 % nemocných dochází od počátku choroby k pozvolnému nárůstu invalidity, především spastické paraparézy DKK. Tento typ se nazývá **primární progresse**. Je patogeneticky poněkud odlišný, převládá neurodegenerace a ztráta oligodendrocytů i axonů. Proto je terapeuticky velmi málo ovlivnitelný (1,2,4).

Termín **benigní RS** je někdy užíván po mnoha letech trvání onemocnění, kdy nedochází k atakám ani k progresi invalidity. Tento průběh nelze ovšem dosud predikovat. Nikdy, ani po mnoha letech remise, nelze vyloučit aktivaci či maligní zvrát choroby (4). Velmi zákeřná a bohudíky i velmi vzácná je **maligní, Marburgská forma** RS, která během týdnů až měsíců vede nezávisle na terapii k těžké invalidizaci až smrti jedince.

Obrázek 2. Klinická aktivita RS a postižení CNS v čase (2).



1.4.2 Klinické příznaky

Klinické příznaky onemocnění jsou různorodé. Jejich charakter závisí na lokalizaci zánětlivého infiltrátu. Pokud je v místě průběhu většího počtu důležitých drah (např. mozkový kmen) vyvine se polysymptomatická ataka, naopak ložisko v oblasti kolem komor může zůstat asymptomatické (4).

Nejčastějším a většinou prvním příznakem RS je zánět očního nervu, **retrobulbární neuritida**. Projevuje se zhoršením vizu, od zamlžení, přes skotomy (nejčastěji centrální) a poruchu barevného vidění až po kompletní ztrátu vizu. Dochází při něm k demyelinizaci optiku provázené lokálním otokem, který se může projevovat prominencí papily očního nervu na očním pozadí. Často je ovšem nález na očním fundu při optické neuritidě negativní („nic nevidí pacient ani lékař“). Po odeznění zánětu obvykle zůstává parciální nablednutí, event. až atrofie papily očního nervu. Úprava zraku může být úplná, ale může přetrvávat porucha zraku různého stupně. Reziduem může být i tzv. **Uhthoffův fenomén**, kdy po větší zátěži (fyzické, psychické, ale např. i v horku) dochází k přechodnému zhoršení vizu, které po odeznění vyvolávající příčiny ustupuje. Příčinou tohoto jevu je insuficientní vedení v minulosti poškozeným nervem při náročnějších situacích (4).

Dalším velice častým počátečním příznakem jsou **poruchy čítí** (hypestézie, parestézie, hyperestézie) bez typické periferní distribuce. Bývají často bagatelizovány nebo přičítány k vertebrogenním potížím a po několika dnech až týdnech spontánně mizí (4).

K velice závažným symptomům patří centrální **poruchy hybnosti**, které bývají provázeny **spasticitou**. Jedná se o zvýšení svalového tonu v důsledku přerušení tlumivých drah z vyšších etází a míšních interneuronů. Parézy mohou být hlavně zpočátku reverzibilní, během let se ovšem podílejí na progredující invaliditě pacientů. Rovněž spasticita výrazně omezuje mobilitu nemocných. Naopak např. u těžších paréz dolních končetin může výraznější spasticita pomoci zachovat schopnost chůze (1,4).

Dalším závažným příznakem jsou **mozečkové poruchy**. Již velmi malé léze mozečkových drah mohou způsobit těžký defekt. Například při poruše debato-rubro-talamického traktu se vyvine výrazný intenční tremor, který je velmi rezistentní k terapii. Objevení se mozečkových příznaků je většinou nepříznivým prognostickým znamením. Kromě tremoru bývá přítomna ataxie končetin, trupu i chůze, která může pacienta invalidizovat i bez současných paréz,

adiadochokinéza a cerebelární dysartrie. Typická je nejistota v prostoru a porucha posturálních reflexů (1,4).

Poruchy okulomotoriky a nystagmus bývají způsobeny postižením mozkových nervů a jejich drah. Projevují se diplopií eventuálně oscilopsií, které jsou provázeny nejistotou v prostoru či závratí. Velmi častou poruchou je internukleární oftalmoplegie způsobená lézí fasciculus longitudinalis medialis v mezencefalu. Postihne v určitém období nemoci až 34 % pacientů s RS. Projevuje se poruchou motility bulbů, kdy je možný pohyb jen do abdukce a addukující bulbus zůstává ve středním postavení, a monokulárním nystagmem na abdukujícím bulbu (1,4).

Kromě okohybných nervů bývají postiženy i jiné **mozkové nervy**. Nemocní mohou trpět neuralgií trigeminu, která bývá způsobena zánětlivým infiltrátem v oblasti odstupe trigeminu z mozkového kmene. Méně častá je neuralgie nervus glossopharyngeus, paréza nervus facialis nebo porucha sluchu. Dysartrie a dysfagie bývají spíše pseudobulbární z léze centrálních motorických drah než navozené postižením nervů postranního smíšeného systému či nervus hypoglossus. Obvykle postihují pacienty až v pozdějších stádiích onemocnění (1).

Sfinkterické potíže jsou velmi obtěžující, ojediněle mohou být i prvním příznakem onemocnění RS. Patří k nim urgence, opožděný start močení, retence moči s recidivujícími uroinfekty, inkontinence moči, event. kombinace těchto potíží, obstipace či inkontinence stolice. Intenzita těchto potíží často koreluje s mírou postižení dolních končetin (4). Velice častou poruchou jsou **sexuální dysfunkce**, které postihují obě pohlaví, ačkoli jejich prevalence u žen je méně zmapována. Jejich výskyt bývá často podhodnocen. Jsou popisovány u 50-90 % mužů a 40-80 % žen. Patří k nim pokles libida, erektilní dysfunkce, problémy s ejakulací a dosažením orgasmu. Mohou být způsobeny lokální demyelinizační lézí v oblasti NS (primární dysfunkce) neboporuchou mobility, např. parézou, spasticitou (sekundární dysfunkce), ale také vlivem psychických potíží či deprese (22).

Kromě výše uvedených neurologických potíží trpí většina pacientů s RS celou řadou psychiatrických poruch postihujících oblast afektivity, osobnosti i kognice (23). Více než polovina pacientů trpí v některé fázi onemocnění **depresemi** (24). Deprese může vzniknout jako reakce na sdělení diagnózy chronického onemocnění, ale také přímo vlivem chorobného procesu, a to prostřednictvím cytokinů (TNF-alfa, IL-6, IL-1, IL-2) nebo účinkem zánětu na serotoninergní transmissi (23,24). Důležitým spouštěcím faktorem depresí je i podávání vysokých dávek kortikoidů nebo léčba interferonem beta. Nebyla prokázána korelace mezi

tíží deprese a délkou trvání onemocnění, stupněm postižení vyjádřeného pomocí Kurtzkeho škály (EDSS), rozsahem postižení bílé hmoty mozkové měřeného prostřednictvím MR ani stupněm kognitivního deficitu. K dalším psychiatrickým potížím nemocných s RS patří **bipolární afektivní porucha, euforie, emoční inkontinence, spastický pláč a smích** (23). Jak ukazují četné práce, významným problémem, a to už od počátku onemocnění, je **kognitivní deficit**, který se projevuje poruchou všípivosti a výbavnosti paměti nebo učení nové látce, poruchou pozornosti, zpomalením myšlení a chápání, pomalejším psychomotorickým tempem a poruchou exekutivních funkcí (25).

Velice častým nspecifickým příznakem RS je **únava**, postihuje až 85 % nemocných. Jde o příznak, který nelze nijak objektivně kvantifikovat, ale svojí intenzitou je schopna invalidizovat. Její příčiny jsou multifaktoriální. Podílí se na ní patrně vyšší únavnost demyelinizovaných nervových vláken, menší počet axonů v nervových drahách a přítomnost zánětlivých působků v nervové tkáni. Velkou měrou je únava i projevem deprese (1,2).

Závažným a velice obtěžujícím doprovodným symptomem RS je **bolest**. Nejčastějším fenoménem je neuralgie trigeminu. Dalším zdrojem bolesti může být spasticita, muskuloskeletární aparát u imobilních pacientů či změněná kvalita cití.

Nemocní mohou také trpět různými paroxysmálními příznaky, ke kterým lze řadit Lhermittův příznak. Asi u 5 % nemocných s RS se mohou vyvinout epileptické paroxysmy (1,2).

1.4.3 Kurtzkeho škála Expanded Disability Status Scale (EDSS)

K posouzení klinického stavu pacientů a hodnocení jeho vývoje v čase se nejčastěji používá Kurtzkeho škála Expanded Disability Status Scale (EDSS), která byla publikována v roce 1983 a prošla během let mnoha změnami (26). Tato škála hodnotí 8 funkčních systémů: vizus, mozkový kmen, pyramidový, mozečkový a senzitivní systém, sfinktery a mentální status. Její nevýhodou je, že zohledňuje hlavně schopnost chůze, ne dovednosti dominantní ruky a stav kognice. Proto se někdy doplňuje o škálu Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC), kterou tvoří 3 testy: Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT), což je orientační test paměti a koncentrace; 9 hole peg test (9-HPT) k posouzení jemné motoriky horních končetin a test rychlosti chůze na 25 stop (7,6m). Obě tyto škály jsou

schopny podat komplexní obraz klinického statu a skutečných schopností pacienta s RS (2).
Viz tabulka 1.

Tabulka 1. Kurtzkeho rozšířená škála disability (EDSS) (26).

0	normální neurologický nále z (všechny FS stupeň 0)
1	žádná disabilita, minimální neurologický nále z v 1 FS (stupeň 1)
1,5	žádná disabilita, minimální neurologický nále z ve více než 1 FS (stupeň 1)
2	minimální disabilita v 1 FS (1 FS stupeň 2, ostatní 0 nebo 1)
2,5	minimální disabilita ve 2 FS (2 FS stupeň 2, ostatní 0 nebo 1)
3	lehká disabilita v 1 FS (1 FS stupeň 3, ostatní 0 nebo 1) nebo mírná disabilita ve 3-4 FS (3-4 FS stupeň 2, ostatní 0 nebo 1) a zároveň chůze bez omezení
3,5	chodící, ale s lehkou disabilitou v 1 FS (1 FS stupeň 3) a 1-2 FS stupně 2 nebo 2 FS stupně 3 nebo 5 FS stupně 2 (ostatní 0 nebo 1)
4	schopnost chůze bez pomůcky a odpočinku na alespoň 500m, činnost 12 h deně navzdory relativně těžké disabilitě sestávající z 1 FS stupně 4 (ostatní 0 nebo 1) nebo kombinace nižších stupňů přesahující limity předchozích stupňů
4,5	schopnost chůze bez pomůcky a odpočinku na alespoň 300m, činnost po většinu dne, těžká invalidita sestávající z 1 FS stupně 4 (ostatní 0 nebo 1) nebo kombinace nižších stupňů přesahující limity předchozích stupňů
5	schopnost chůze bez pomůcky a odpočinku na alespoň 200m (ekvivalentem FS je 1x stupeň 5 a ostatní 0 nebo 1 nebo kombinace nižších stupňů přesahující definici pro stupeň 4,5)
5,5	schopnost ujít bez pomoci a odpočinku 100m
6	nutná jednostranná opora (hůl, berle) k ujití alespoň 100m bez přestávky nebo s přestávkou
6,5	chůze s oboustrannou oporou (hole, berle) na alespoň 20m bez přestávky
7	pacient není schopen ujít ani 20m s oporou, převážně odkázán na vozík, na kterém se přepravuje sám, tráví na vozíku bděle alespoň 12h
7,5	pacient není schopen ujít s pomocí více než několik kroků, omezen pouze na vozík, potřebuje pomoc při transportu na vozík a jízdě na něm
8	pacient převážně odkázán na lůžko nebo vozík, ale většinu dne tráví mimo lůžko, jsou zachovány některé sebeobslužné schopnosti – obecně možnost užitečného použití horních končetin
8,5	pacient většinu dne upoutaný na lůžko, má určitou schopnost užívat horních končetin, zachovány některé sebeobslužné schopnosti
9	bezmocnost, pacient upoutaný na lůžko, schopný jíst a komunikovat
9,5	zcela bezmocný, ležící pacient, neschopný efektivně komunikovat a jíst/polykat
10	smrt v důsledku RS

1.5 Diagnóza a pomocná vyšetření

Diagnostická kritéria pro stanovení diagnózy RS se vyvíjela ruku v ruce s rozvojem pomocných vyšetřovacích metod.

1.5.1 Diagnostická kritéria

Prvními obecně uznávanými kritérii pro diagnostiku RS byla *Schumacherova kritéria* z roku 1965 (27) :

- Neurologické vyšetření vykazuje objektivní abnormality ve funkci CNS.
- V minulosti byly postiženy 2 nebo více oblastí CNS.
- Charakter onemocnění ukazuje na postižení bílé hmoty.
- Postižení CNS probíhá podle jednoho nebo druhého vzorce:
 - 2 nebo více atak, každá v trvání alespoň 24 hodin a méně než 1 měsíc,
 - Pomalá nebo atakovitá progresse symptomů trvajících déle než 6 měsíců.
- Věk pacienta 10–50 let na začátku onemocnění.
- Příznaky nemohou být vysvětleny jiným chorobným procesem.

S nástupem nových technických možností byla výše uvedená kritéria revidována a v roce 1983 vešla v platnost nová, *Poserova kritéria*. Kromě klinického obrazu se opírala o vyšetření magnetickou rezonancí a vyšetření mozkomíšního moku (28).

Poserova kritéria:

- Klinicky definovaná RS:
 - 2 ataky a klinický důkaz 2 separátních lézí,
 - 2 ataky, klinický důkaz 1 a paraklinický důkaz další separátní léze.
- Laboratorně podporovaná definovaná RS:
 - 2 ataky, klinický nebo paraklinický důkaz 1 léze, imunologické abnormality v CSF,
 - 1 ataka, klinický důkaz 2 separátních lézí a současně abnormality v CSF,
 - 1 ataka, klinický důkaz 1 léze a paraklinický důkaz jiné separátní léze, abnormality v CSF.
- Klinicky možná RS

- 2 ataky a klinický důkaz 1 léze,
 - 1 ataka a klinický důkaz 2 separátních lézí,
 - 1 ataka, klinický důkaz 1 léze a paraklinický důkaz jiné separátní léze.
- Laboratorně podporovaná možná RS:
 - 2 ataky a abnormity v CSF.

Poslední změnou prošla diagnostická kritéria v minulém desetiletí. V roce 2001 byla přijata tzv. **McDonaldova kritéria**, podle kterých je k diagnostice RS nutné prokázat diseminaci procesu v čase a prostoru (29). Současně bylo akceptováno, že nové léze na MR mohou nahradit klinickou ataku (30). K jejich revizi došlo v roce 2005, nyní platí nová verze z roku 2010. *Viz tabulka 2* (31). Nová kritéria umožňují diagnostikovat RS už po první atace z prvního MR skenu, pokud splňuje podmínky diseminace v prostoru a čase. Diseminace v prostoru (DIS) znamená přítomnost alespoň 1 T2-hyperintenzivní léze ve 2 ze 4 lokalizací typických pro RS (periventrikulárně, juxtakortikálně, infratentoriálně nebo v míše). Diseminaci v čase (DIT) představuje současná přítomnost asymptomatičtých gadolinium (Gd)-enhancujících a neenhancujících lézí na jediném skenu. Pokud tato kritéria nejsou splněna, je nutné provést kontrolní MR vyšetření s časovým odstupem. Vyšetření mozkomíšního moku je považováno za doplňující, sloužící k diferenciaci diagnostice. Tato nová kritéria pro CIS lze použít jen tehdy, pokud jsou vyloučena jiná onemocnění (30).

Tabulka 2. Revidovaná McDonaldova kritéria pro diagnostiku RS (2010) (31).

Klinická prezentace	Další data nutná k diagnóze RS
≥ 2 ataky; objektivní klinický průkaz ≥ 2 lézí nebo objektivní klinický průkaz 1 léze s prokázanou atakou v minulosti	Žádná
≥2 ataky; objektivní klinický průkaz 1 léze	Diseminace v prostoru (DIS): ≥ 1 T2-léze v alespoň 2 ze 4 lokalizací typických pro RS (periventrikulárně, juxtakortikálně, infratentoriálně nebo v míše); nebo další klinická ataka z jiné lokalizace v CNS
1 ataka; objektivní klinický průkaz ≥ 2 lézí	Diseminace v čase (DIT): současná přítomnost asymptomatických Gd-enhancujících a neenhancujících lézí v jakoukoli dobu; nebo nová T2 a/nebo Gd-enhancující léze na následujícím MR proti prvnímu MR skenu bez ohledu na načasování prvního MR; nebo očekávaná 2. klinická ataka
1 ataka; objektivní klinický průkaz 1 léze (CIS)	Diseminace v prostoru a čase: Pro DIS: ≥ 1 T2-léze v alespoň 2 ze 4 lokalizací typických pro RS (periventrikulárně, juxtakortikálně, infratentoriálně nebo v míše); nebo očekávaná 2. klinická ataka z jiné lokalizace v CNS Pro DIT: současná přítomnost asymptomatických Gd-enhancujících a neenhancujících lézí v jakoukoli dobu; nebo nová T2 a/nebo Gd-enhancující léze na následujícím MR proti prvnímu MR skenu bez ohledu na načasování prvního MR; nebo očekávaná 2. klinická ataka
Od počátku progresse neurologického nálezu susp. z RS (PP)	1 rok progresse nemoci (retrospektivně nebo prospektivně) a 2 ze 3 následujících kritérií: 1. průkaz DIS v mozku na základě ≥ 1 T2-léze v lokalizaci typické pro RS (periventrikulárně, juxtakortikálně, infratentoriálně) 2. průkaz DIS v míše na základě ≥ 2 T2-lézí na MR míchy 3. pozitivní CSF (průkaz oligoklonálních pásů při izoelektrické fokusaci a/nebo elevace indexu IgG

1.5.2 Pomocná vyšetření

Základní pomocnou vyšetřovací metodou pro diagnostiku roztroušené sklerózy je vyšetření *magnetickou rezonancí* (MR). Vyšetření mozkomíšního moku, evokovaných

potenciálů, oftalmologické vyšetření a optická koherentní tomografie (OCT) napomáhají v diferenciatně diagnostické rozvaze.

1.5.2.1 MR

MR má zde dvě základní role: 1. podporu diagnózy RS a vyloučení jiných chorob v rámci diferenciatní diagnózy a 2. monitoraci průběhu onemocnění a predikci možného klinického zhoršení (32). Pro RS jsou typická hyperintenzivní ložiska v bílé hmotě mozkové periventrikulárně, juxtakortikálně a infratentoriálně na T2-vážených řezech a ve FLAIR (fluid-attenuated-inversion-recovery) sekvencích. Jejich počet ovšem nekorresponduje s klinickým obrazem (1,4). Akutní zánětlivá ložiska se zobrazují jako hyperintenzivní ložiska na T1-vážených řezech po nitrožilním podání gadolinia, které přestupuje přes porušenou HEB. Během trvání onemocnění dochází k postupné atrofii CNS a plaky, kde po recidivujících vzplanutích zánětu došlo k zániku axonů, se v T1- vážených řezech jeví jako hypointenzivní ložiska, tzv. „black holes“ (4). V oblasti výzkumu se používají moderní MR techniky, které jsou schopny rozpoznat patogenetické mechanismy RS, které nebyly dříve detekovatelné. Patří k nim magnetizační transfer (MRT), relaxometrie, funkční magnetická rezonance (fMRI) a magneticko-rezonanční spektroskopie (MRS). Prostřednictvím počítačového softwaru je možné měřit objem mozkové tkáně a tak posuzovat stupeň, event. progresi mozkové atrofie, lze stanovit objem demyelinizačních ložisek (32), depozita železa nebo abnormality perfúze (33).

1.5.2.2 Vyšetření mozkomíšního moku

Podle McDonaldových diagnostických kritérií publikovaných v roce 2001 a jejich revidované verze z roku 2005 byla **analýza mozkomíšního moku** spolu s MR základní vyšetřovací metodou sloužící k diagnostice RS. Vzhledem k tomu byl světově uznávanými odborníky na problematiku RS vytvořen panel laboratorních likvorových vyšetření nezbytných k diagnostice či diferenciatní diagnostice RS. Cílem bylo sjednotit spektrum dosud vyšetřovaných parametrů a používaných metod, a tak minimalizovat pravděpodobnost falešně pozitivní diagnózy RS. Jak už bylo řečeno, nyní je likvorové vyšetření pouze metodou doplňkovou, sloužící k diferenciatní diagnostice. Zahrnuje kvantitativní a kvalitativní

cytologii, základní biochemické vyšetření, posouzení stavu HLB, vyšetření intratekální syntézy imunoglobulinů (Ig)G a stanovení počtu oligoklonálních IgG pásů (OCB) (34). Spektrum vyšetření doplňuje tzv. MRZ reakce neboli stanovení intratekální syntézy specifických IgG protilátek proti neurotrofním virům (viru spalniček, rubeola-zoster a zarděnek), ke kterým se někdy řadí i herpes virus I, a stanovení hladin některých zánětlivých či neurodegenerativních markerů (35).

Při **kvantitativním cytologickém vyšetření** u nemocných s RS obvykle nacházíme mírnou pleiocytózu, tj. 20–30 buněčných elementů/mm³, asi 2 % nemocných s RS vykazuje počet elementů vyšší než 40/mm³. Hodnota přesahující 90 elementů/mm³ diagnózu RS prakticky vylučuje (36). **Kvalitativně** bývá **cytologický obraz** zcela normální. V období ataky může být přítomen obraz serózního zánětu s lymfomonocytární pleiocytózou. Nacházíme aktivované formy lymfocytární i monocytární řady: plasmocyty, lymfocyty nebo buňky tvaru „pečetního prstenu“ (37). Pro RS jsou typické především plazmatické buňky s excentricky uloženým jádrem, kondenzovaným chromatinem, perinukleárním projasněním a bazofilní cytoplazmou (36).

Při **základním biochemickém vyšetření** nacházíme normální či lehce zvýšenou proteinorachii, která může mít původ v poruše HLB nebo v intratekální syntéze (1,36). Glykorachie a koncentrace chloridů zůstává v normě (1).

Hemato-likvorovou bariéru tvoří endotel kapilár pia mater a chorioideálních plexů. Jedná se o dynamický systém umožňující transport celé řady látek. Ionty či nízkomolekulární látky procházejí za pomoci iontové pumpy, pro určité látky (např. aminokyseliny) existují specifické transportní proteiny (1). Přenos proteinů probíhá prostřednictvím difúze. Zvýšení koncentrace určitého proteinu v séru tedy vede k jeho elevaci i v likvoru, přičemž poměr koncentrace tohoto proteinu v CSF a séru zůstává konstantní (36). Funkci HLB posuzujeme pomocí tzv. albuminového kvocientu (Q_{alb}), který je poměrem hodnoty albuminu v likvoru k albuminu v séru. Kvocient albuminu je hodnota věkově závislá. Do 15 let věku je jeho hodnota menší než 5×10^{-3} , do 40 let $\leq 6,5 \times 10^{-3}$ a do 60 let $\leq 8 \times 10^{-3}$. Albumin se do CSF dostává vždy ze séra přestupem přes HLB, takže každé zvýšení koncentrace albuminu, a tedy i kvocientu albuminu znamená poruchu HLB (36). U RS zůstává funkce HLB zachována, v době ataky může být lehce porušená, hodnota Q_{alb} je potom $7-10 \times 10^{-3}$ (37).

Rozhodující pro stanovení diagnózy RS je **průkaz intratekální syntézy IgG** a přítomnost **oligoklonálních IgG pásů** (OCB) metodou izoelektrické fokusace na agarovém gelu

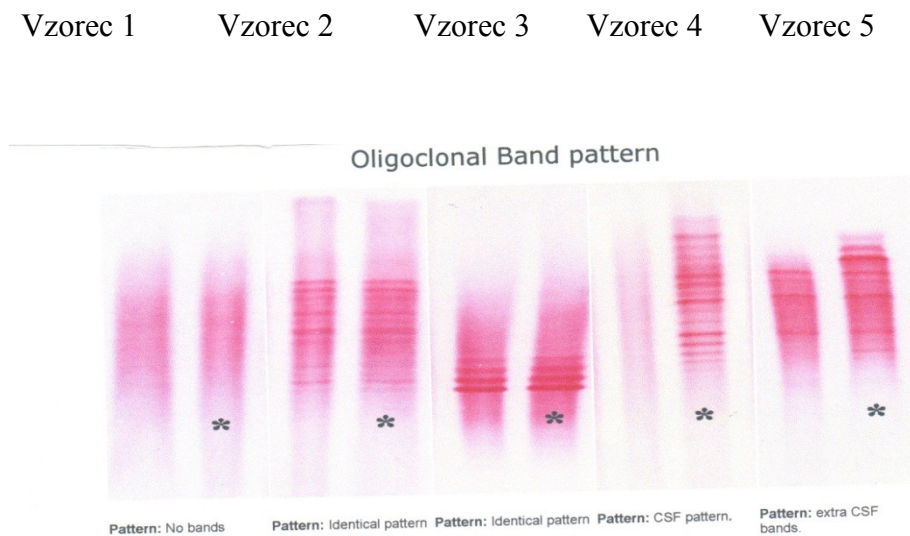
s následným stříbřením, imunofixací či imunoblottingem. **Intratekální syntéza** IgG v CNS pochází z perivaskulárních infiltrátů lymfocytů B, které vyžívají v plazmocyty a produkují specifické Ig. Na rozdíl od séra, kde během imunitní odpovědi dochází k přechodu ze syntézy IgM na IgG v subakutní či chronické fázi reakce, intratekálně není tato reakce patrná. Poměry hodnot v třídách IgG/IgM/IgA zůstávají od počátku onemocnění konstantní, protože jsou nejspíše vyvolány určitým specifickým agens. Tato jistá heterogenita imunitní odpovědi je vysvětlována teorií imunitní sítě, kdy imunitní reakce na určité agens vyvolá změny v celé imunitní síti. Po aktivaci imunitního systému CNS pak intratekální syntéza přetrvává i bez přítomnosti vyvolávajícího agens (37). V minulosti se k výpočtu intratekální syntézy používal Linkův index nebo Tourtellotova formule s lineární závislostí mezi Q_{alb} , který charakterizuje funkci HLB, a Q_{IgG} udávajícím intratekální syntézu IgG. Byly ovšem zatíženy falešnou pozitivitou při střední a vyšší poruše HLB (36). Proto se nyní všeobecně užívá Reiberova diagramu popisujícího hyperbolickou závislost mezi Q_{IgG} a Q_{alb} (38,39). Obdobně se stanovují i indexy IgM a IgA. Intratekální syntézu potvrzují hodnoty $IgG > 0,7$, $IgM > 2,4$ a $IgA > 1,2$ (37). U různých chorob se procentuální zastoupení jednotlivých tříd imunoglobulinů liší, např. IgG dominují kromě RS také v časně fázi bakteriální a virové meningitidy, u polyradikuloneuritidy Guillain-Barré, neurosyfylis a chronické HIV encefalitidy, IgA převažují u neurotuberkulózy, mozkového abscesu a adrenoleukodystrofie, IgM u neuroborreliózy a non-Hodgkinského lymfomu. Ke zvýšení všech tříd Ig dochází u oportunních infekcí (CMV, toxoplazmózy) (38).

Metodou IEF je kromě oligoklonální produkce imunoglobulinů možné stanovit přítomnost volných řetězců kappa a lambda, což je velmi důležité v diferenciálně diagnostické rozvaze. Senzitivita průkazu oligoklonálních IgG u pacientů s RS je 95 % (36). Průkaz lehkých řetězců je méně senzitivní (92 %), je ovšem velmi důležitý, protože u některých nemocných nedochází k syntéze oligoklonálních IgG, ale pouze lehkých řetězců kappa (34). Naproti tomu izolovaný nález lehkých řetězců lambda bez přítomnosti OCB IgG je nespecifický a může spíše hovořit proti diagnóze RS (34). U RS je vyskytuje intratekální syntéza IgG u 72 % nemocných, syntéza IgM u 20 % a IgA u 9 % nemocných (36).

Pokud je prokázána intratekální syntéza kvantitativně, vyšetření pokračuje kvalitativním stanovením oligoklonálních subtraktů γ -globulinů, neboli **OCB** v likvoru i séru. Za pozitivní nález prokazující intratekální syntézu je nález 2 a více OCB, které se u RS nacházejí většinou v alkalické frakci elektroforetického pole (36). V roce 1994 bylo na základě mezinárodního konsenzu stanoveno 5 základních vzorců OCB (35,36,37). Viz obrázek 3. U pacientů s RS

nacházíme převážně OCB vzorec 2, méně často vzorec 3. Přítomnost OCB v likvoru a séru lze prokázat i u jiných chorob, např. u infekcí, autoimunitních či systémových onemocnění (36).

Obrázek 3. Oligoklonální IgG pásy – vzorce (39).



- Vzorec 1: normální likvor (bez průkazu OCB v likvoru a v séru).
- Vzorec 2: OCB v likvoru, které nejsou v séru (RS).
- Vzorec 3: OCB v obou kompartmentech a navíc OCB v likvoru (neuroborrelióza, event. RS).
- Vzorec 4: identické OCB v likvoru i v séru (paraneoplastické syndromy, systémový lupus erythematoses).
- Vzorec 5: monoklonální pásy v likvoru i v séru (monoklonální gamapatie – např. mnohotný myelom).

MRZ reakce je doplňkovým likvorovým vyšetřením k časné diagnostice autoimunitních onemocnění. Jedná se o detekci specifických IgG protilátek proti neurotropním virům spalniček (morbilli), zarděnek (rubeola) a planých neštovic (varicela zoster virus) metodou ELISA. K odlišení protilátek, které přestoupily ze séra přes porušenou hemato-likvorovou bariéru, se stanovuje protilátkový index (AI), který je poměrem koncentrace dané protilátky v likvoru ku koncentraci této protilátky v séru. Jeho normální hodnota je 1,0 a referenční rozmezí 0,7–1,3. Hodnota $AI > 1,4$ je známkou intratekální syntézy dané protilátky (37). Pozitivita kombinované MRZ reakce, tj. přítomnost intratekální syntézy protilátek proti jednomu, dvěma nebo všem třem neurotropním virům, podporuje především diagnózu RS, kde je popisována u 84–94 % pacientů. Literatura uvádí pozitivitu protilátek proti spalničkám u 78 % nemocných s RS, protilátky proti zarděnkám u 60 % a proti varicela-zoster viru u 55 % nemocných. Vysoká pozitivita reakce je uváděna i u dalších autoimunit, např. u Sjögrenova syndromu, systémového lupusu či Wegenerovy granulomatózy. Naproti tomu u jiných zánětlivých afekcí, např. neuroborreliózy, neurosyfilis nebo neurotuberkulózy, je kombinovaná MRZ reakce pozitivní pouze v 0,1 % případů (37,38). Kromě výše uvedených protilátek se u pacientů s RS udává vyšší koncentrace protilátek proti herpes viru I (u 28 % nemocných) (38).

Ve specializovaných laboratořích lze provádět **vyšetření specifických likvorových markerů**, pomocí kterých lze posoudit aktivitu onemocnění, stupeň neurodegenerace nebo predikovat průběh onemocnění.

Patří sem:

- neuronální protilátky,
 - protilátky proti myelinu - protilátky proti myelin-bazickému proteinu (anti-MBP), protilátky proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu (anti-MOG), proteolipidový protein, glykoprotein sdružený s myelinem, 2', 3'-cyklická nukleotid 3'-fosfodiesteráza,
 - protilátky proti axonům – protilátky proti neurofilamentům : lehkým (light-NFL), středním (medium-NFM) a těžkým (heavy-NFH),
- zánětlivé markery – transferin, ferritin, prealbumin, orosomucoid, C-reaktivní protein, C3 a C4 složky komplementu, beta-2-mikroglobulin,
- markery destrukce – apolipoproteiny A (APO-A-I) a B (APO-B), cystatin C,
- cytokiny – interleukin 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12,

- strukturální proteiny CNS – protein 14-3-3, neuron-specifická enoláza (NSE), protein S-100b, tau-protein, fosforylovaný tau-protein, beta-amyloid (35,36), gliální fibrilární kyselý protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP), N-acetylaspartát (40,41).

1.5.2.3 Evokované potenciály

Vyšetření *evokovaných potenciálů* bylo významnou vyšetřovací metodou v 80. letech minulého století. Proměřením vedení zrakových (visual evoked potentials, VEP), somatosenzorických (somatosensory evoked potentials, SSEP), sluchových (brainstem auditory evoked potentials, BAEP) a motorických (motor evoked potentials, MEP) drah bylo možné prokázat současné postižení více etází CNS a tím přispět k potvrzení diagnózy RS. Nyní ovšem díky výraznému pokroku v oblasti MRI se od jejich širokého využití upouští. Svou pozici si zatím zachovaly pouze VEP, které mohou odhalit lézi optiku u asymptomatického pacienta po CIS (1). Mohou též přispět k diferenciální diagnostice v případě atypických symptomů při normálním neurologickém nález (42).

1.5.2.4 Oftalomologické vyšetření

Standardem i nyní zůstává *oční vyšetření*. Na očním pozadí můžeme pozorovat edém papily optiku v případě retrobulbární neuritidy. Mnohem častějším nálezem bývá temporální nablednutí papily očního nervu či její atrofie jako reziduum po retrobulbární neuritidě. Další patologií mohou být defekty zorného pole či porucha barevného vidění (1).

1.5.2.5 Optická koherentní tomografie (OCT)

Novou moderní vyšetřovací metodou je *optická koherentní tomografie* (OCT), která využívá odrazu infračerveného světla v oblasti sítnice k vytvoření jejího dvojrozměrného a trojrozměrného obrazu. To umožní měření tloušťky sítnice a makuly (30,42). Zrakový nerv je tvořen axony gangliových buněk retiny, které vedou vizuální informace do corpus geniculatum laterale, a není chráněn myelinovou pochvou. Kromě roztroušené sklerózy bývá postižen i u neurodegenerativních onemocnění. Vyšetření OCT u nemocných s RS prokazuje,

že k axonální ztrátě dochází již na počátku onemocnění i po každé epizodě optické neuritidy a stupeň axonální ztráty koreluje s poškozením vizu. Úbytek nervových vláken je patrný dokonce bez přítomnosti zánětu, jeho míra pak odpovídá době trvání onemocnění. Pro její velkou přesnost může být tato metoda použita k monitoraci účinnosti terapie, proto nachází široké uplatnění v klinických studiích ověřujících účinnost a bezpečnost nových léků (43).

1.6 Diferenciální diagnóza

Diferenciální diagnostika RS je vzhledem k rozmanitosti klinických příznaků velmi široká. Základním zobrazovacím vyšetřením je MR mozku a míchy, kterým vyloučíme především chirurgicky řešitelná onemocnění, tj. nádory, výhřezy intervertebrálních disků, fraktury obratlů či cévní malformace (2). Dalším, zato klíčovým vyšetřením k odlišení především zánětlivých afekcí CNS je vyšetření mozkomíšního moku. K těmto onemocněním patří neuromyelitis optica Devic, akutní diseminovaná encefalomyelitida (ADEM), neuroborrelióza, neurosarkoidóza, Behçetova choroba, Sjögrenův syndrom a systémový lupus erythematodes (SLE) (44).

1.6.1 Neuromyelitis optica Devic (NMO)

NMO patří k autoimunitním demyelinizačním chorobám stejně jako RS a vyznačuje se izolovaným postižením zřetelného nervu a myelitidou postihující alespoň 3 míšní segmenty. Stěžejním pro stanovení diagnózy NMO je průkaz protilátek proti aquaporinu-4 v séru, oligoklonální IgG pásy většinou chybí (45).

1.6.2 Akutní demyelinizační encefalomyelitida (ADEM)

ADEM je akutní horečnaté onemocnění rozvíjející se po infektu horních dýchacích cest nebo vakcinaci. Může být provázeno křečemi až komatem, ve 20 % případů končí úmrtím pacienta. Probíhá jednorázově. Pokud dojde k recidivě, je nutné pomýšlet na RS. Likvorový nález je shodný s RS, pouze chybí OCB (1,2).

1.6.3 Neuroborrelióza

Pro neuroborreliózu je příznačný průkaz antiborreliových protilátek v likvoru metodou ELISA či western blot, nález živých borrelií v elektronovém mikroskopu či průkaz borreliové DNA v CSF prostřednictvím PCR. Neuroborrelióza může způsobit meningoencefalitidu, mono- či polyneuropatii, myelitidu event. subakutní encefalitidu.

1.6.4 Neurosarkoidóza

Neurosarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie s prevalencí 20-50/100 000 obyvatel. Podobně jako RS postihuje častěji ženy ve věku 20–40 let. Projevuje se především lymfadenopatií a později fibrózou plicní, dále postižením jater, dermis s erytema nodosum, artropatií, uveitidou a iridocyklitidou. U 10–30 % nemocných dochází k postižení CNS. Běžnými příznaky jsou cefalea, bazilární meningitida, bilaterální optická neuritida, senzitivní a motorický deficit, záchvaty nebo neuropsychiatrické symptomy. Vzácnou komplikací je ischemie či intracerebrální hemoragie. Laboratorně prokazujeme hyperkalcémii, hypergamaglobulinémii, elevaci angiotensin-konvertujícího enzymu (ACE), lysozymu a solubilní formy receptoru pro IL-2. V likvoru nacházíme středně těžkou lymfomonocytární pleiocytózu se vzestupem poměru lymfocytů CD4:CD8, vyšší proteinorachii, normální či lehce zvýšený IgG index a u 30–50 % nemocných přítomnost OCB. Více než 30 % případů mívá elevaci ACE, lysozymu a beta2-mikroglobulinu (44).

1.6.5 Behçetova choroba

Behçetova choroba je vaskulitida nejasné etiologie s prevalencí 300/100 000 obyvatel především západní Evropy a středomoří, ve východní Evropě je vzácná. Charakteristické pro ni jsou ulcerace v ústech a na genitálu, kožní léze, iritida a uveitida, neerozivní artritidy, postižení GIT a plic. Neurologické příznaky mívají remitentní či progresivní průběh. Patří k nim cefalea, parézy, pyramidové jevy, kognitivní poruchy, sfinkterické dysfunkce, fatická porucha, hemianopsie či kmenové symptomy, např. internukleární oftalmoparéza. V likvoru nacházíme lehkou granulocytární pleiocytózu a zvýšenou proteinorachii, poruchu HLB a

intratekální syntézu IgG, IgM i IgA, přičemž hodnoty IgM a IgA korelují s aktivitou onemocnění. 55 % nemocných vykazuje intratekální syntézu OCB IgG (44).

1.6.6 Sjögrenův syndrom

Sjögrenův syndrom je autoimunitní onemocnění s 2% prevalencí postihující především ženy středního věku. K typickým příznakům patří sicca syndrom – keratokonjunktivida a xerostomie, dále únava, teploty, artralgie, myalgie, postižení plic, jater, ledvin a srdce. Z neurologických symptomů pozorujeme senzitivní či motorický deficit, afázii, dysfagii, dysartrii, závratě, mozečkové či kmenové syndromy, bolesti hlavy, křeče, kognitivní dysfunkci, demenci a další neuropsychiatrické symptomy. Příznačná pro něj je lymfomonocytární pleiocytóza v mozkomíšním moku s přítomností plazmatických buněk a lehce vyšší proteinorachie. V období aktivity nemoci dochází ke zvýšení IgG indexu a elevaci hladin IgA i IgM. Až u 80 % nemocných lze prokázat intratekální syntézu IgM a u 90 % přítomnost OCB, které ovšem v průběhu onemocnění, zvláště po terapii kortikoidy, zcela mizí (44).

1.6.7 SLE

Velice závažnou jednotkou, na kterou musíme v diferenciální diagnostice pomyslet, je SLE. Jde opět o onemocnění převážně žen středního věku s prevalencí 50:100 000 obyvatel.

Postihuje klouby, kůži, sliznice, ledviny a nervový systém, který bývá zasažen v 50–70 % případů (44). Hlavním symptomem jsou deprese a psychózy, dále bolesti hlavy, záchvaty, myozitidy, myastenický syndrom, myelopatie, cervikální či lumbální plexopatie a akutní ischemické ikty. V důsledku postižení cévní stěny se mohou vytvářet fuziformní aneurysmata, jejichž ruptura hrozí subarachnoideálním krvácením. Jinou manifestací jsou embolizace či trombózy způsobené koagulopatií v rámci sekundárního antifosfolipidového syndromu. V mozkomíšním moku nacházíme lymfocytární pleiocytózu a syntézu 2-3 tříd imunoglobulinů. U 25–80 % pacientů nacházíme OCB, které mohou po léčbě kortikoidy vymizet. Bývá přítomna lehká porucha hemato-likvorové bariéry (44).

1.6.8 Vzácné příčiny

V neposlední řadě musíme v diferenciální diagnostice odlišit vzácnější jednotky jako je funikulární mykóza způsobená deficitem vitamínu B12, myelopatii asociovanou s HTLV-1 či AIDS, adultní formu adrenoleukodystrofie, spinocerebelární degenerace nebo mitochondriální choroby (1).

1.7 Terapie

Roztroušená skleróza zatím patří mezi nevléčitelné choroby, ale při včasné diagnostice a dostatečně razantní terapii jsme v současnosti schopni výrazně snížit aktivitu onemocnění a zpomalit progresi neurologického deficitu. V posledních desetiletích vlivem nových vědeckých poznatků o patogenezi RS zaznamenal přístup k její terapii výrazné změny. Vzhledem k odlišnosti imunopatologických dějů u jednotlivých forem RS, lze terapeutický přístup rozdělit na:

- léčbu akutní ataky,
- dlouhodobou terapii ke snížení počtu atak a zpomalení progresu onemocnění,
- intenzivní imunomodulační léčbu v případě agresivního průběhu nemoci,
- léčbu CIS (4).

1.7.1 Léčba ataky

Zlatým standardem je podání pulzu *metylprednisolonu* v dávce 3-5g intravenózně, po kterém lze následně podat metylprednisolon či prednisolon ve snižující se dávce perorálně. S ohledem na jeho nežádoucí účinky je nutné chránit zažívací trakt (antacida, blokátory protonové pumpy a H2 receptorů), myslet na prevenci osteoporózy (podávání vápníku, magnesia, vitamínu D, pohybový režim, hormonální substituce), kontrolovat krevní tlak a glykémii, zvláště u diabetiků (4). Variantou je podání *intravenózních imunoglobulinů* (IVIg) pacientkám v poporodním období ke snížení počtu relapsů, což potvrzuje práce Hellwiga a kol. (46). V případě těžké ataky nereagující na terapii vysokými dávkami kortikoidů je metodou volby provedení *plazmaferézy*, která má dle literatury až 85% efekt na regresi neurologického deficitu (47).

1.7.2 Dlouhodobá terapie ke snížení počtu atak a zpomalení progresu onemocnění

Stěžejní v terapii RS je dlouhodobá imunomodulace či imunosuprese ke snížení aktivity onemocnění, tedy snížení počtu atak a zpomalení progresu klinického deficitu. Doslova revolucí v terapii RS bylo v polovině 90. let minulého století zavedení tzv. *disease modifying drugs* (DMD), což byly první léky schopné ovlivnit přirozený průběh choroby. Již v roce 1993 byly zveřejněny výsledky klinické studie potvrzující účinnost *interferonu beta-1b* na snížení počtu atak u relaps-remitentní formy RS. Interferon (IFN) beta-1b (preparát Betaferon inj.) a IFN beta-1a (Rebif 22 a 44 inj., Avonex inj.) snižují aktivaci a proliferaci již aktivovaných T-lymfocytů, snižují permeabilitu HLB a snižují tvorbu a účinnost IFN gama. K DMD dále patří *glatiramer acetát* (preparát Copaxone inj.), který je jedinou antigeně specifickou účinnou terapií RS. Jde o směs 4 aminokyselin (L-glutamin, L-lysin, L-alanin a L-tyrosin) vyskytujících se v myelin bazickém proteinu, což je jeden z nejdůležitějších autoantigenů u RS. Glatiramer acetát stimuluje tvorbu populace tlumivých lymfocytů snižujících zánětlivou aktivitu v CNS. Byly prokázány i jeho neuroprotektivní vlastnosti. Preparáty DMD jsou nyní terapií první volby, jejich efektivita je udávána kolem 30 %, a to pouze v počátečních stádiích choroby vzhledem k jejich převážně protizánětlivému účinku (4,48).

Lékem druhé volby, v případě inefektivity léků první volby a vysoké aktivitě onemocnění s velkým počtem relapsů a rychlou progresí klinického deficitu, je *natalizumab* (preparát Tysabri). Byl zaregistrován v roce 2006 jako první monoklonální protilátka používaná v neurologii. Je selektivním antagonistou $\alpha 4$ -integrinu. Inhibuje jeho vazbu na adhezivní molekuly cévního endotelu, čímž zhoršuje leukocyto–endoteliální adhezi a následně migraci aktivovaných leukocytů přes HLB. Podle klinické studie AFFIRM (roky 2004–5) sledující pacienty v průběhu dvouletého podávání natalizumabu došlo k 68% snížení počtu relapsů, 92% redukcii počtu nových Gd-enhancujících lézí a 83% snížení počtu či objemu T2-hyperintenzivních lézí na MR. Kromě toho byl zaznamenán o 42 % nižší nárůst neurologického deficitu vyjádřeného škálou EDSS ve srovnání s placebem (49). Vysoká účinnost natalizumabu je ovšem vykoupena rizikem rozvoje progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML). PML vzniká reaktivací a mutací endogenně přítomného polioma DNA viru (48). První případ byl zaznamenán v roce 2005 v rámci studie SENTINEL, kdy byl natalizumab podáván současně s IFN beta-1a. Následně byla účinnost a bezpečnost

natalizumabu ověřována řadou klinických sledování. V červnu 2011 bylo natalizumabem léčeno 88 100 pacientů. Riziko rozvoje PML bylo stanoveno přibližně 1,66 : 1 000 nemocných tímto preparátem léčených. Jeho výše je závislá na počtu podaných infúzí. Do 24 infúzí je riziko relativně nízké (0,3 : 1 000), nejvyšší je v rozmezí 25–36 infúzí (1,5 : 1 000) a pak klesá. Předchozí terapie imunosupresívy se jeví jako nezávislý rizikový faktor zvyšující riziko PML 2- až 4krát, přítomnost DNA JCV viru v séru pacienta pak představuje další dvojnásobný nárůst rizika (49). Proto v rámci farmakovigilance se před začátkem terapie natalizumabem provádí MR mozku a vyšetření séra na přítomnost DNA JC viru. Pokud je potvrzena diagnóza PML, je nutné podávání natalizumabu ihned ukončit a provést plazmaferézu. V případě klinického zhoršení spojeného s restaurací imunitního systému je třeba podat kortikoidy (48).

Dalším novým lékem určeným pro relaps-remitentní formu RS je ***fingolimod (preparát Gilenya)***, který byl schválen k použití v USA v září 2010 jako lék první volby. Pro státy Evropské unie je fingolimod lékem druhé volby pro nemocné s rychle progredující RS. Váže se na sfingosin-1-fosfátový receptor (S1P) lymfocytů, čímž brání jejich vstupu do cirkulace a zadržuje je v uzlinách. Vazbou na S1P receptor v nervové tkáni je pravděpodobně zprostředkován jeho neuroprotektivní efekt. V důsledku výskytu velkého počtu S1P receptorů v myokardu vyvolávají jeho první dávky bradykardii až AV blok. Dle klinické studie FREEDOMS došlo v důsledku jeho podávání ke snížení počtu relapsů o 55 %, klesl počet nových či objem již existujících T2-hyperintenzivních lézí o 75 % a Gd-enhancujících lézí na MR o 82 % oproti placebo (48).

V současnosti probíhá celá řada klinických studií s perorálními léky schopnými ovlivnit aktivitu onemocnění RS. Patří sem ***cladribin***, což je purinový analog cytotoxicky působící na lymfocyty a způsobující tak dlouhodobou lymfopenii. Jeho účinnost je srovnatelná s fingolimodem a podává se jen v jednom léčebném cyklu za rok. Jeho registrace byla zatím odložena pro vedlejší účinky, kterými je výše zmiňovaná dlouhodobá lymfopenie bránila dostatečné obraně organismu proti infekcím a vyšší počet malignit u léčených pacientů ve srovnání s placebem. ***Laquinimod*** je imunomodulans, které brání vstupu T- lymfocytů se znakem CD4+ a makrofágů do CNS a omezuje prezentaci antigenu na buňkách exprimujících na svém povrchu antigen HLA II. třídy. Je velice dobře tolerován s minimem nežádoucích účinků. ***Fumarát*** (BG-12) je ester kyseliny fumarové a jeho efekt je podobný efektu laquinimodu. Působí imunomodulačně a neuroprotektivně aktivací nukleárního faktoru 2, který brání oxidačnímu stresu při zánětlivém poškození tkáně. ***Teriflunomid*** je odvozený od

antirevmatika leflunomidu. Je inhibitorem syntézy pirimidinu, čímž blokuje rychle se dělící buňky, tedy i T-lymfocyty. Je velmi dobře tolerován a jeví se jako vhodný do kombinace s DMD (48,50).

Velkou skupinu nově zkoušených léků tvoří monoklonální protilátky. **Alentuzumab** je protilátka proti znaku CD52 exprimovanému na T a B-lymfocytech, NK buňkách a monocytech a je používán k léčbě chronické B-lymfocytární leukémie. Jeho podání způsobuje lýzu těchto buněk, která je ovšem provázena výraznou celkovou reakcí organismu (48). Problematickým nežádoucím účinkem je možnost navození autoimunitní tyreoiditidy (7x vyšší než u placeba) a idiopatické trombocytopenické purpury (3x vyšší než u placeba). **Rituximab** je protilátkou proti znaku CD20 na B-lymfocytech a používá se k léčbě non-Hodgkinského lymfomu a revmatoidní artritidy (50). **Daclizumab** je protilátka proti znaku CD25, což je alfa podjednotka receptoru pro IL-2. Jeho vyřazením se omezí aktivace autoagresivních lymfocytů bez poškození funkce imunitního systému. Aktivuje rovněž NK buňky, což by mělo mít vliv na regulaci zánětu v CNS (48). V současnosti se používá k potlačení rejekční reakce po orgánových transplantacích (51).

V případě inefektivit či intolerance léků první volby nebo v přítomnosti imunodeficitu je lékem volby podání **intravenózních imunoglobulinů**. IVIg obsahují přirozené protilátky proti autoantigenům, blokují Fc receptory na makrofázích a mikroglia, neutralizují prozánětlivé cytokiny a jejich receptory, čímž je dán jejich mnohostranný protizánětlivý efekt.

Podání léků první volby vzhledem k jejich finanční náročnosti podléhá přísným kritériím. Proto pacienti, kteří tato kritéria nespĺňujú, jsou odkázáni na léčbu **klasickými imunosupresívy**, mezi které patří azatioprin, metotrexát či mofetil mykofenolát. **Azatioprin** je purinový analog s lymfostatickým efektem, je cytotoxický i pro prekurzory hematopoetických buněk. Před zahájením terapie je vhodné vyšetřit genomovou DNA na přítomnost alelických variant enzymu tiopurinmetyltransferázy (TPMT) nebo stanovit jeho aktivitu v erytrocytech. Homozygoti pro nefunkční alelu mají kompletní deficit aktivity tohoto enzymu s vysokou pravděpodobností rozvoje dřevného útlumu po nasazení azatioprinu. **Metotrexát** je antagonist kyseliny listové. Inhibicí syntézy DNA způsobuje snížení počtu B a T-lymfocytů, proliferace makrofágů, narušení antigenní prezentace a snížení sekrece některých prozánětlivých působků, např. tumor-nekrotizujícího faktoru či IL-2. **Mofetil mykofenolát** zpomaluje lymfocytární proliferaci a expresi povrchových antigenů T-lymfocytů. Má ovšem

významné nežádoucí účinky, kterými jsou pancytopenie, sklon k infekcím a karcinogeneze (52).

1.7.3 Intenzivní imunomodulační léčba v případě agresivního průběhu nemoci

V případě agresivního průběhu onemocnění, kdy výše uvedená terapie ztrácí na účinnosti, je nutné přistoupit k **eskalaci léčby**. Zpočátku je možné k lékům první volby přidat klasická imunosupresiva či podávat pulzy metylprednisolonu intravenózně (Zivadinovo schéma: IFN beta + 5x1g metylprednisolonu každé 4 měsíce). Další, agresivnější možností je podávání **pulzů metylprednisolonu s cyklofosfamidem** (Harvardské schéma: 1g metylprednisolonu + 800mg/m² cyklofosfamidu první rok 1x měsíčně, druhý rok po 6 týdnech a další 2 roky po 2 měsících) nebo pulzů metylprednisolonu **s mitoxantronem** (Edanovo schéma: 1g metylprednisolonu + 20mg mitoxantronu nebo Hartungovo schéma: 1g metylprednisolonu + 5 nebo 12mg mitoxantronu co 2 měsíce). Cílem této terapie je stabilizace onemocnění se zastavením progresu deficitu. Vzhledem k mnohdy výrazné leukopenii navozené touto terapií jsou nutné kontroly krevního obrazu, pátrání po infektech a jejich přeléčování. Pro kardiotoxicitu mitoxantronu se musí provést transtorakální echokardiografie s určením ejekční frakce levé komory před zahájením i v průběhu terapie (1,2).

Pokud ani tato terapie není efektivní, lze přistoupit k u nás dosud experimentální léčbě: **autologní transplantaci hematopoetických kmenových buněk** (HSCT). Tato metoda je založena na imunoablacii vysokými dávkami imunosupresiv následované restaurací imunitního a hematopoetického systému autologní HSCT, čímž by mělo dojít k tzv. „resetu“ imunitního systému (52). Od roku 1995 dosud bylo touto metodou ve světě léčeno přes 400 pacientů. Dle publikovaných studií po ní dochází ke snížení aktivity onemocnění o 33–64 % a 36–95 % pacientů je zcela bez progresu deficitu (53). Indikací k HSCT je vysoce aktivní RS s délkou trvání choroby do 5 let a zachovalou schopností chůze bez opory alespoň 100m (54). Myšlenka allogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk byla inspirována pacienty s RS, kteří podstoupili HSCT z důvodu hematologické malignity a následně došlo k výraznému snížení aktivity onemocnění. Allogenní HSCT je schopna nahradit autoagresivní imunitní systém zdravými allogenními imunitními buňkami, ale za cenu možné reakce štěpu proti hostiteli a vyšší mortality. I přes veškerá rizika, včetně 2,3 % mortality u autologní HSCT, je tato metoda nadějí pro pacienty s maligní RS (55).

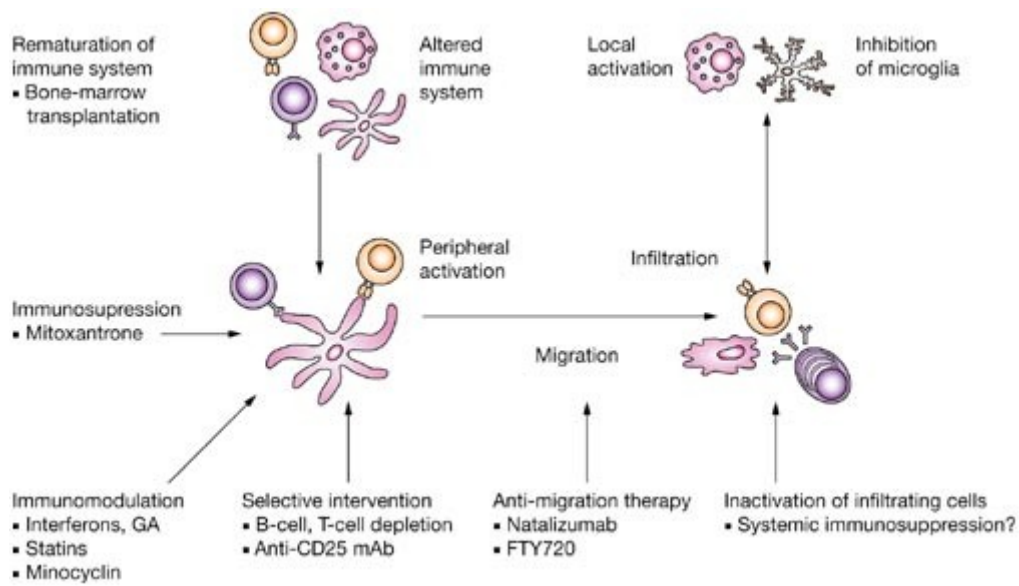
1.7.4 Léčba CIS

Je všeobecně uznávaným názorem, že RS je nutné léčit již od prvních příznaků a čím dříve s léčbou začneme, tím větší je pravděpodobnost zpomalení progresu onemocnění a oddálení vzniku klinického deficitu. Dříve se léčba zahajovala až po 2. atace onemocnění, tedy v případě klinicky definované RS. Pod tíhou dat z prováděných klinických sledování byl definován CIS v rámci revize McDonaldových kritérií z roku 2010, což umožnilo zahájit terapii preparáty DMD již po 1. atace.

1.7.5 Symptomatická terapie

Kromě výše uvedené imunomodulační či imunosupresivní terapie musí být součástí léčby i **symptomatická terapie** ke zmírnění příznaků onemocnění. K ovlivnění spasticky lze použít centrální myorelaxancia (tizanidin, baclofen, tetrazepam, tiokolchikosid), lokální aplikaci botulotoxinu nebo v případě výrazné spasticky dolních končetin přistoupit k intratekálnímu podávání baclofenu pumpou. Sfincterické potíže lze zmírnit podáváním anticholinergik, myorelaxancií či lokální aplikací botulotoxinu. Úplné vyprázdnění močového měchýře lze zajistit čistou intermitentní katetrizací. Neurogenní bolesti lze ovlivnit gabapentinem, pregabalinem nebo např. karbamazepinem. Nesmíme zapomenout ani na léčbu depresí, které zhoršují tíži stávajících příznaků a prohlubují únavu. V léčbě depresí se v současnosti nejčastěji používají preparáty SSRI- selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, SARI-serotoninoví antagonisté a inhibitory zpětného vychytávání serotoninu nebo SNRI- inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu. Nutno rovněž myslet na léčbu infekcí a sanaci fokusů. Nedílnou součástí péče o pacienty s RS je soustavná rehabilitace udržující jejich fyzickou kondici a zmírňující příznaky (především spasticitu), psychoterapie, ergoterapie nebo sociální poradenství (4).

Obrázek 4. Současné možnosti imunoterapie RS a mechanismy jejich účinku (56).



2 Vlastní výzkum

Cílem naší práce bylo vysledovat možné rozdíly v hodnotách jednotlivých zánětlivých a degenerativních markerů v mozkomíšním moku pacientů s různými formami roztroušené sklerózy mozkomíšní a stanovit, zda je pokles či elevace určitého markeru typický pro některou z forem RS.

Stěžejní výzkumný problém byl definován na základě našeho předpokladu, že některý z likvorových markerů může být typický pro konkrétní formu RS, může být tudíž ukazatelem intenzity zánětu nebo míry neurodegenerace a tedy predikovat průběh onemocnění. Na bázi tohoto předpokladu jsme stanovili následující věcné hypotézy:

H_0 : Některý z vybraných likvorových markerů je specifickým ukazatelem pro konkrétní formu RS.

K ní jsme stanovili alternativní hypotézu:

H_A : Žádný z vybraných likvorových markerů není specifickým ukazatelem pro konkrétní formu RS.

H_0 : Úroveň intratekální syntézy (Q_{IgG} , IgG index, počet OCB) koreluje se stupněm postižení pacientů s RS.

K ní jsme stanovili alternativní hypotézu:

H_A : Žádný z parametrů intratekální syntézy (Q_{IgG} , IgG index, počet OCB) nekoreluje se stupněm postižení pacientů s RS.

H_0 : Úroveň intratekální syntézy (Q_{IgG} , IgG index, počet OCB) koreluje s délkou onemocnění u pacientů s RS.

K ní jsme stanovili alternativní hypotézu:

H_A: Žádný z parametrů intratekální syntézy (Q_{IgG}, IgG index, počet OCB) nekoreluje s délkou onemocnění u pacientů s RS.

2.1 Soubor

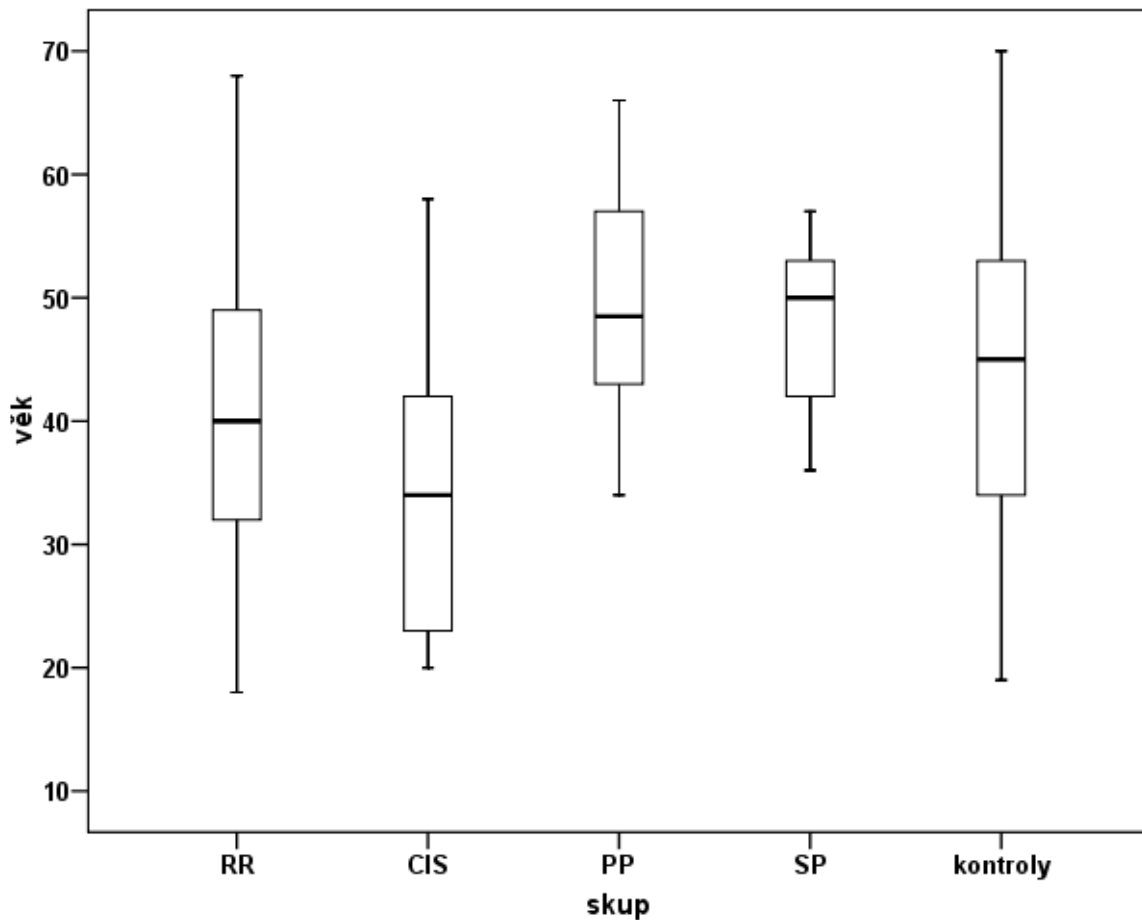
Bylo provedeno likvorologické vyšetření u pacientů hospitalizovaných na Neurologické klinice FN a LP UP Olomouc v letech 2005–2009. Mozkomíšni mok byl odebrán lumbální punkcí po předchozím podpisu informovaného souhlasu s výkonem. Celkem bylo analyzováno 258 likvorů, z toho 120 od pacientů s RS a 138 kontrol. Jako kontroly byly použity likvory pacientů, u kterých byla lumbální punkce provedena z diferenciálně diagnostických důvodů k vyloučení jiného neurologického onemocnění, jako např. subarachnoideálního krvácení či infekce CNS. Diagnóza RS byla stanovena v souladu s McDonaldovými kritérii.

Skupinu RS pacientů tvořilo 29 pacientů s CIS (23 žen a 6 mužů) ve věku 29–58 let, průměrně $33,9 \pm 10,9$ roku, 77 pacientů s relaps-remitentní formou RS (RR: 56 žen a 21 mužů) ve věku 18 až 68 let, průměrně $40,5 \pm 11$ let, 6 pacientů s primárně progredientní formou (PP: 3 muži a 3 ženy) ve věku 34 až 66 let s průměrem $49,5 \pm 11,4$ roku a 8 pacientů v sekundární progresi (SP: 7 žen a 1 muž) ve věku 36 až 57 let průměrného věku $47,9 \pm 7,2$ roku. Zvolené kontroly byly co do věku s pacienty s RS homogenní, tj. ve věku 19 až 70 let, průměrně $43,7 \pm 12,3$ roku. Rovněž poměr počtu žen a mužů v obou souborech byl obdobný. Analýza rozptylu a LSD post hoc testy prokázaly, že pacienti po CIS byli ve srovnání s ostatními skupinami (kromě RR) signifikantně mladší. *Viz tabulka 3, 4 a box graf 1.*

Tabulka 3. Popisná statistika – věk

	Počet	Minimum	Maximum	Median	Průměr	Sm. odchylka
RR	77	18	68	40,00	40,47	10,990
CIS	29	20	58	34,00	33,97	10,891
PP	6	34	66	48,50	49,50	11,432
SP	8	36	57	50,00	47,88	7,180
Kontroly	138	19	70	45,00	43,73	12,294
Celkem	258	18	70	42,00	41,92	12,047

Box graf 1. Znázornění věkového rozložení jednotlivých zkoumaných skupin.



Pozn: Horizontální hrany obdélníků reprezentují 25. a 75. percentil, horizontální tučné linie uvnitř obdélníků představují medián a vertikální čáry kolmé na obdélníky maximální a minimální datové hodnoty v rozmezí 1,5 interkvartilové vzdálenosti.

Tabulka 4. Kontingenční tabulka homogenity souboru vzhledem k pohlaví

		pohlaví		celkem
		Ž	M	
RR	počet	56	21	77
	% z celku	72,7 %	27,3 %	100,0 %
CIS	počet	23	6	29
	% ze celku	79,3 %	20,7 %	100,0 %
PP	počet	3	3	6
	% z celku	50,0 %	50,0 %	100,0 %
SP	počet	7	1	8
	% z celku	87,5 %	12,5 %	100,0 %
kontroly	počet	93	45	138
	% z celku	67,4 %	32,6 %	100,0 %
celkem	počet	182	76	258
	% z celku	70,5 %	29,5 %	100,0 %

2.2 Metodika

Všem zkoumaným pacientům byla za sterilních kautel provedena atraumatickou jehlou lumbální punkce, a to v poloze vsedě, vpich byl veden do prostoru L4/5. Bylo odebráno 15ml mozkomíšního moku do skleněných zkumavek a 15ml krve. Likvor i krev byl ihned dopraven do laboratoře, kde byl centrifugován (10 minut, 1 100g, 4°C) a spolu se sérem byl hluboce zmrazen na -20°C. Byly stanoveny koncentrace vybraných zánětlivých a degenerativních markerů metodou ELISA (cystatin C, tau-protein, beta-amyloid), imunoturbidimetricky (albumin), nefelometricky (IgG, prealbumin, transferin, C3 a C4 složky komplementu, haptoglobin, orosomucoid, alfa-1-antitrypsin, APO-A-I, APO-B), luminiscenční imunoanalýzou (beta-2-mikroglobulin) a elektrochemoluminiscencí (NSE). Byl vypočítán albuminový kvocient (Q_{alb}) (albumin v CSF/albumin v séru) k posouzení integrity HLB a kvocient IgG (Q_{IgG}) (IgG v CSF/IgG v séru). OCB byly vyšetřeny metodou izoelektrické fokusace na agarovém gelu s následným imunoblotingem. Počet OCB nižší než 2 byl považován za negativní výsledek.

Před lumbální punkcí bylo všem pacientům s RS provedeno neurologické vyšetření a stanovena hodnota škály invalidity EDSS.

Panel provedených vyšetření:

1. k posouzení integrity HLB : Q_{alb} a prealbumin,
2. zánětlivé markery: transferin, C3 a C4 složky komplementu, haptoglobin, beta-2-mikroglobulin, orosomucoid a alfa-1-antitrypsin (AAT),
3. markery tkáňové destrukce: APO-A-I, APO-B, cystatin C, NSE, tau-protein a beta-amyloid,
4. intratekální syntéza: počet OCB, Q_{IgG} a IgG index.

2.3 Statistické zpracování

Ke statistické analýze dat byl použit software SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Vzhledem k nenormální distribuci hodnot sledovaných parametrů, resp. přítomnosti extrémních hodnot v datech byl pro sledování souborů pacientů použit neparametrický test Kruskal-Wallis. V případě signifikance testu Kruskal-Wallis byl pro porovnání dvou souborů použit neparametrický test Mann-Whitney. Pro zkategorizované parametry (tj. podíl pacientů v normě resp. mimo normu) byl použit Chí-kvadrát test. Pro porovnání věku pacientů byla použita Analýza rozptylu s LSD post hoc testy. Korelace mezi OCB či IgG indexem a trváním onemocnění nebo hodnotou EDSS byla vypočítána pomocí Spearmanova rho. Všechny testy byly prováděny na hladině signifikance 0,05.

2.4 Výsledky

Výsledky jsou rozděleny do 3 částí. První část se zabývá zpracováním hodnot zánětlivých markerů u jednotlivých forem RS, druhá část je zaměřena na markery neurodegenerace a třetí část se věnuje posouzení intratekální syntézy IgG a její korelací s hodnotami škály EDSS a délkou trvání onemocnění.

2.4.1 Výsledky 1.

První část práce provádí srovnání hodnot zánětlivých likvorových markerů: C3 a C4 složky komplementu, transferinu, haptoglobinu, beta-2-mikroglobulinu, orosomucoidu a alfa-

1-antitrypsinu. Bylo nalezeno snížení mediánů a průměrných hodnot transferinu u CIS (16,75; 17,88 ± 4,72 mg/l), RR (16,95; 17,92 ± 8,18 mg/l) a především SP (16,55; 15,73 ± 3,41 mg/l) ve srovnání s kontrolami (19,3; 20,27 ± 9,27 mg/l) bez zánětlivého postižení CNS. Obdobné hodnoty jako kontroly vykazovala skupina PP (19,45; 20,01 ± 6,05 mg/l). *Viz tabulka 5a a 5b.* Neparametrický globální Kruskal-Wallisův test (test rovnosti mediánů) porovnávající sledované parametry v pěti skupinách a následně Chí-kvadrát test potvrdil statisticky významné rozdíly v hodnotách transferinu mezi sledovanými skupinami (P = 0,048). *Viz box graf 2.* Ovšem test Mann-Whitney porovnávající všechny páry s upravenou hladinou významnosti α dle Bonferonniho neprokázal statisticky signifikantní rozdíly. Dále byly nalezeny nesignifikantně nižší mediány a průměry hodnot C3 složky komplementu u RR (3,17; 3,79 ± 2,51 mg/l), SP (3,28; 3,62 ± 1,62 mg/l) a především CIS (2,95; 3,46 ± 1,33 mg/l) ve srovnání s PP (1,95; 5,34 ± 3,32 mg/l) a kontrolami (3,66; 4,13 ± 2,16 mg/l), přičemž průměrné hodnoty u všech skupin a mediány u PP a kontrol vykazovaly vyšší hodnoty, než je horní hranice normy. Dalším zjištěním je mírná elevace mediánu a průměru hodnot C4 složky komplementu u PP (1,95; 2,26 ± 1,13) na rozdíl o od ostatních forem RS (CIS: 1,47; 1,73 ± 0,42; RR: 1,56; 1,88 ± 1,30; SP: 1,44; 1,52 ± 0,22) a kontrol (1,46; 1,79 ± 0,77), všechny hodnoty ale zůstaly v normě. Dále bylo zaznamenáno zvýšení mediánu a průměru hodnot haptoglobinu u PP (3,40; 4,04 ± 3,26 mg/l) proti ostatním skupinám (CIS: 0,98; 2,20 ± 2,26 mg/l; RR: 1,09; 2,15 ± 3,09 mg/l; SP: 1,07; 2,467 ± 2,08 mg/l; kontroly: 1,13; 2,25 ± 2,66 mg/l). Kromě toho byly nalezeny subnormální hodnoty AAT v likvoru u 27,6 % nemocných po CIS (8 z 29 probandů), u 19,5 % nemocných s RR (15 ze 77 probandů), 25 % s SP (2 z 8 probandů) a 16,7 % u PP (1 pacient ze 6).

Hodnoty beta-2-mikroglobulinu, orosomucoidu a alfa-1-antitrypsinu se ve sledovaných skupinách nelišily.

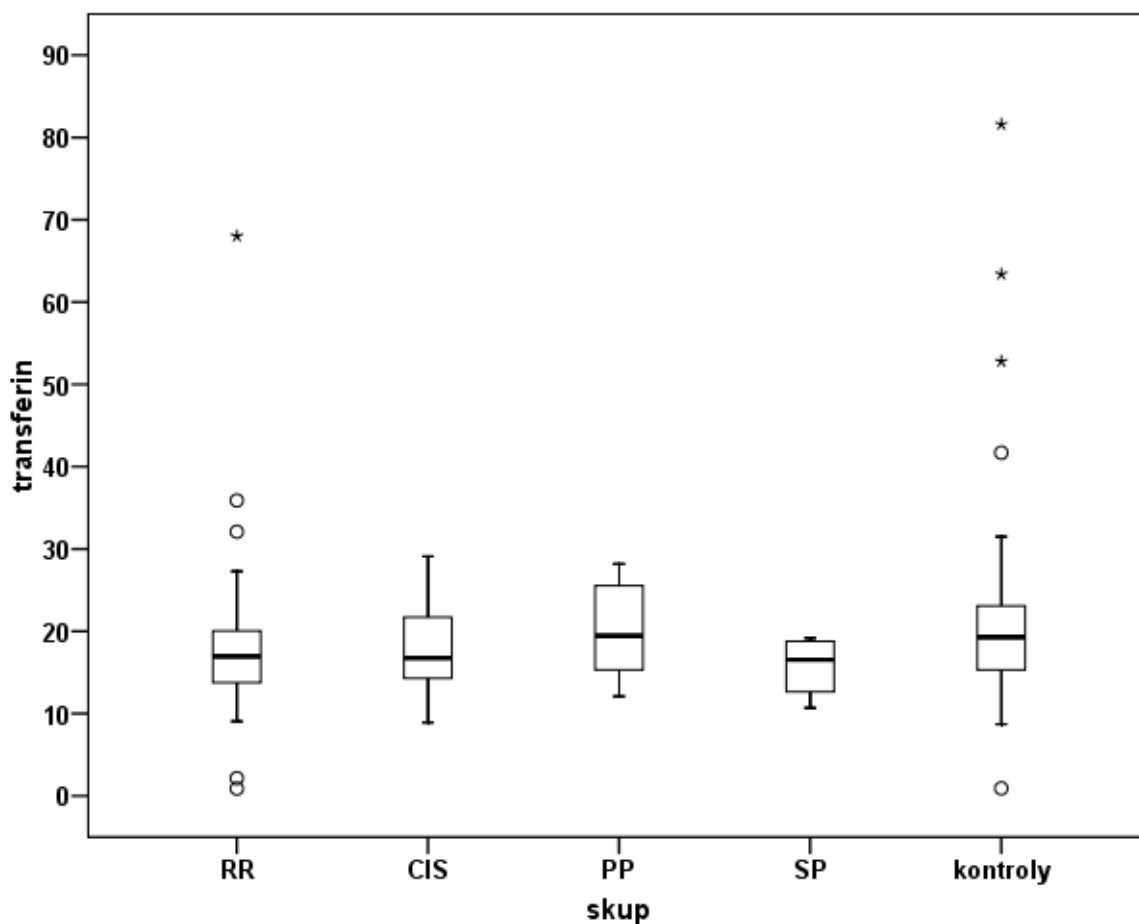
Tabulka 5a. Hodnoty markerů zánětu u jednotlivých forem RS a kontrol.

		C3 (norma 0,5- 3,5 mg/l)	C4 (norma 0,8– 2,5 mg/l)	Transferin (norma 7-22 mg/l)
CIS	Medián	2,95	1,47	16,75
	Průměr ± sm.odchylka	3,46 ± 1,33	1,73 ± 0,42	17,88 ± 4,72
RR	Medián	3,17	1,56	16,95
	Průměr ± sm.odchylka	3,79 ± 2,51	1,88 ± 1,30	17,92 ± 8,18
SP	Medián	3,28	1,44	16,55
	Průměr ± sm.odchylka	3,62 ± 1,62	1,52 ± 0,22	15,74 ± 3,41
PP	Medián	4,14	1,95	19,45
	Průměr ± sm.odchylka	5,34 ± 3,32	2,26 ± 1,13	20,01 ± 6,05
kontroly	Medián	3,66	1,46	19,30
	Průměr ± sm.odchylka	4,13 ± 2,16	1,79 ± 0,77	20,27 ± 9,27

Tabulka 5b. Hodnoty markerů zánětu u jednotlivých forem RS a kontrol - pokračování.

		Haptoglobin (norma 0,5-2 mg/l)	Beta-2- mikroglobulin (norma 0-2 mg/l)	Orosomuroid (norma 1,5- 4,5 mg/l)	Alfa-1- antitrypsin (norma 6-15 mg/l)
CIS	Medián	0,98	0,90	4,38	6,99
	Průměr ± sm.odchylka	2,20 ± 2,26	0,95 ± 0,24	5,65 ± 3,66	8,59 ± 5,32
RR	Medián	1,09	0,90	4,73	6,81
	Průměr ± sm.odchylka	2,15 ± 3,09	0,92 ± 0,27	6,30 ± 7,17	8,43 ± 5,91
SP	Medián	1,07	0,95	4,54	8,78
	Průměr ± sm.odchylka	2,467 ± 2,08	0,94 ± 0,18	5,79 ± 3,53	8,23 ± 2,42
PP	Medián	3,40	1,00	4,65	8,40
	Průměr ± sm.odchylka	4,04 ± 3,26	1,12 ± 0,33	7,62 ± 5,72	11,96 ± 8,00
kontroly	Medián	1,13	0,90	4,93	7,90
	Průměr ± sm.odchylka	2,25 ± 2,66	0,93 ± 0,43	6,04 ± 3,67	9,11 ± 5,83

Box graf 2. Rozložení hodnot transferinu ve sledovaných skupinách.



Pozn: Horizontální hrany obdélníků reprezentují 25. a 75. percentil, horizontální tučné linie uvnitř obdélníků představují medián a vertikální čáry kolmé na obdélníky maximální a minimální datové hodnoty v rozmezí 1,5 interkvartilové vzdálenosti. Kolečka (°) a hvězdičky (*) symbolizují odlehle a extrémní datové hodnoty.

2.4.2 Výsledky 2.

Následující část hodnotí rozdíly v hodnotách vyšetřovaných markerů neurodegenerace: APO A-I, APO B, cystatinu C, NSE, tau-proteinu a beta-amyloidu. Viz tabulka 6a a 6b. Kruskal-Wallisův test prokázal statisticky významné rozdíly v mediánech a průměrech hodnot cystatinu C mezi sledovanými skupinami ($P = 0,004$). Viz box graf 3. Následně provedený test Mann-Whitney popsal signifikantně nižší hodnoty cystatinu C u RR než u kontrol ($P = 0,015$). Byl doplněn výpočet cystatinového indexu (cystatin C CSF/cystatin C sérum), který vykazoval podobné výsledky. Provedené korelace mezi hodnotami cystatinu C a EDSS pomocí Spearmanova rho nepotvrdily statistickou závislost těchto parametrů (CIS: $P = 0,254$; RR: $P = 0,774$; SP: $P = 0,558$; PP: $P = 0,624$). Kromě toho byly zaznamenány nižší mediány a průměry hodnot APO-AI u pacientů s CIS (2,9; $3,69 \pm 1,47$), RR (3,4; $3,69 \pm 1,78$) a méně SP (3,45; $4,15 \pm 2,07$) oproti kontrolám (4,1; $4,61 \pm 2,75$); nepatrně vyšší hodnoty tau proteinu u CIS (244; $265,4 \pm 144,3$) vůči kontrolám (220; $260,1 \pm 178,68$) a normě (0-210 ng/l), a naopak nižší mediány a průměry hodnot tau proteinu především SP (175,5; $186,5 \pm 83,3$), méně u RR (207,0; $235,5 \pm 136,7$) a PP (208,5; $217,8 \pm 63,95$). U všech skupin s RS bylo nalezeno snížení mediánů a průměrů hodnot beta-amyloidu, nejvíce u SP (764,23; $798,8 \pm 117,2$) ve srovnání s kontrolní skupinou (818,76; $844,63 \pm 219,52$). Všechno ovšem bez statistické významnosti. Hodnoty APO-B a neuron-specifické enolázy byly identické ve všech skupinách.

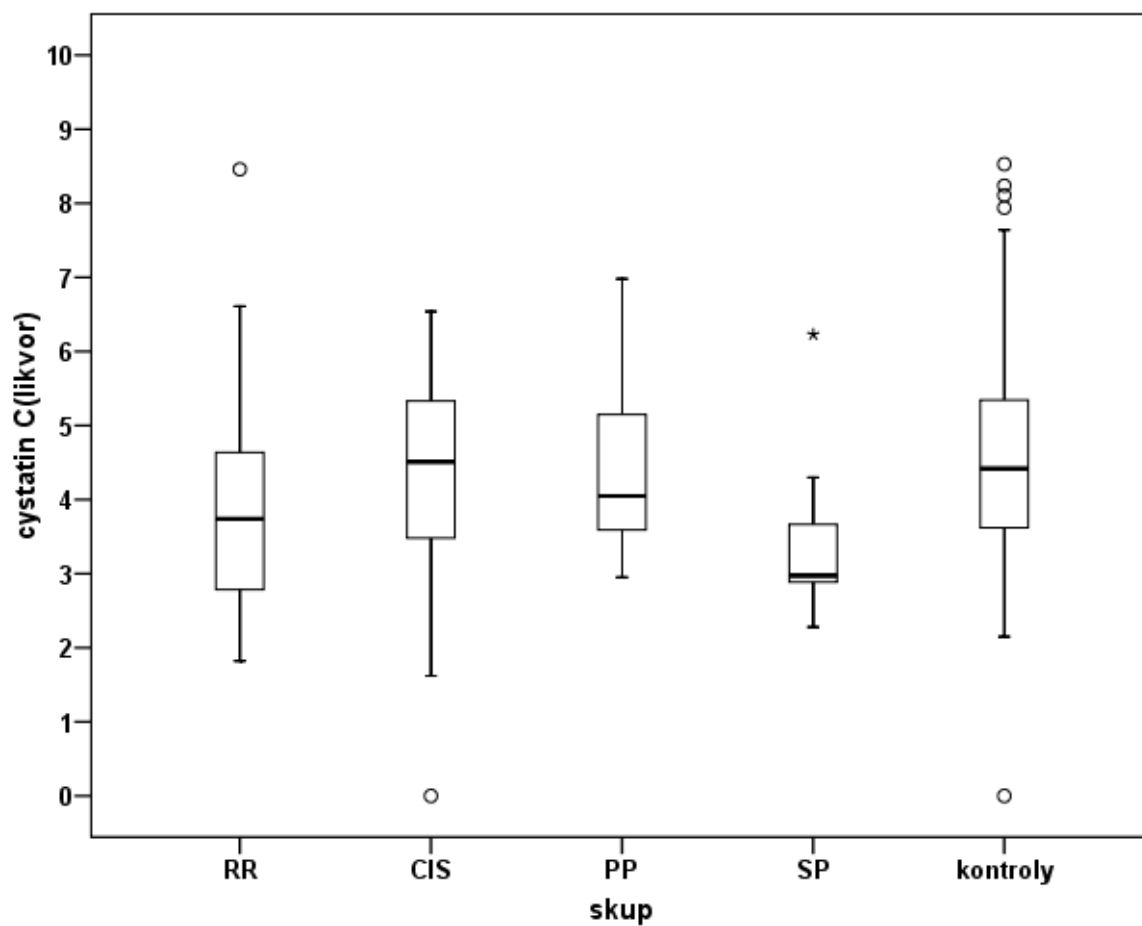
Tabulka 6a. Hodnoty degenerativních markerů u sledovaných skupin.

		APO-AI (norma 1,5-3 mg/l)	APO-B (norma 0,5-2 mg/l)	Cystatin C (norma 3- 12,5 mg/l)	Cystatinový index (cystatin CSF/sérum)
CIS	Medián	2,9	1,4	4,51	4,7
	Průměr ± sm.odchylka	3,69 ± 1,47	1,34 ± 0,38	4,29 ± 1,50	4,89 ± 1,3
RR	Medián	3,4	1,4	3,74	4,42
	Průměr ± sm.odchylka	3,93 ± 1,78	1,7 ± 2,14	3,88 ± 1,37	4,58 ± 1,24
SP	Medián	3,45	1,5	2,97	3,79
	Průměr ± sm.odchylka	4,15 ± 2,07	1,69 ± 1,0	3,44 ± 1,26	4,49 ± 1,82
PP	Medián	3,0	1,5	4,05	5,0
	Průměr ± sm.odchylka	4,44 ± 2,69	1,28 ± 0,48	4,46 ± 1,45	4,74 ± 0,90
kontroly	Medián	4,1	1,4	4,42	
	Průměr ± sm.odchylka	4,61 ± 2,75	1,51 ± 1,2	4,54 ± 1,44	

Tabulka 6b. Hodnoty degenerativních markerů u sledovaných skupin - pokračování.

		NSE (norma 3,7-12,6 µg/l)	Tau-protein (norma 0-210 ng/l)	Beta-amyloid (400-1200 ng/l)
CIS	Medián	10,1	244,0	802,71
	Průměr ± sm.odchylka	10,37 ± 3,98	265,38 ± 144,29	806,4 ± 184,83
RR	Medián	8,81	207,0	777,47
	Průměr ± sm.odchylka	9,29 ± 3,36	235,53 ± 136,71	776,55 ± 253,47
SP	Medián	9,01	175,5	764,23
	Průměr ± sm.odchylka	8,06 ± 2,87	186,5 ± 83,32	798,84 ± 117,20
PP	Medián	9,84	208,5	772,70
	Průměr ± sm.odchylka	9,61 ± 2,16	217,83 ± 63,95	796,27 ± 270,95
kontroly	Medián	9,63	220,0	818,76
	Průměr ± sm.odchylka	10,28 ± 4,18	260,01 ± 178,68	844,65 ± 219,52

Box graf 3. Rozložení hodnot cystatinu C ve sledovaných skupinách.



2.4.3 Výsledky 3.

Poslední část práce byla věnována posouzení intratekální syntézy IgG dané Q_{IgG} , IgG indexem a počtem OCB IgG v alkalické frakci u jednotlivých forem RS. Dále byla provedena korelace mezi intratekální syntézou, škálou invalidity EDSS a délkou trvání onemocnění. *Viz tabulka 7.* Kruskal-Wallisův test prokázal statisticky signifikantní rozdíly v hodnotách Q_{IgG} , IgG indexu, OCB a EDSS mezi jednotlivými zkoumanými skupinami. *Viz tabulka 8.* Test Mann-Whitney tyto diference potvrdil pouze u EDSS a to nižší hodnoty mediánu a průměru EDSS u CIS (1,0; $0,79 \pm 0,91$) a RR (2,0; $2,01 \pm 1,34$) na rozdíl od SP (6,0; $5,75 \pm 1,63$) a PP (4,5; $4,83 \pm 2,14$). Tento rozdíl byl nalezen i mezi CIS a RR, ne mezi SP a PP. *Viz tabulka 9.* *Grafické znázornění rozdělení hodnot parametrů Q_{IgG} , OCB a EDSS u zkoumaných skupin viz box graf 4,5,6.* Hodnota Q_{IgG} byla relativně nižší u RR formy, počet OCB byl ve sledovaných skupinách podobný, pouze u PP byly nalezené hodnoty vyšší. Pokud jsme porovnávali procentuální zastoupení nemocných s prokázanou intratekální syntézou, tedy IgG indexem vyšším než 0,7, nejméně bylo nalezeno ve skupině po CIS (49,3%), u ostatních skupin bylo toto zastoupení obdobné (RR 69,8 %, SP 63,5 %, PP 66,6 %). Procentuální vyjádření pozitivitu intratekální syntézy dané počtem OCB větším nebo rovno 2 bylo v jednotlivých skupinách bez výraznějšího rozdílu. Nejvíce nemocných s $OCB \geq 2$ bylo přítomno ve skupině po CIS (89,7 %), nejméně u RR (81,8 %). Provedené korelace mezi Q_{IgG} , IgG indexem nebo OCB a hodnotami EDSS či délkou onemocnění prostřednictvím Spearmanova rho nezaznamenaly statistickou závislost.

Tabulka 7. Hodnoty Q_{IgG}, IgG indexu, OCB, EDSS a délka trvání onemocnění u sledovaných skupin.

		CIS	RR	SP	PP
Q _{IgG}	medián	4,5	3,7	4,5	7,55
	průměr	8,28	4,76	5,33	8,15
	st. odchylka	13,66	3,29	3,01	4,36
IgG index	medián	0,705	0,780	1,14	1,24
	průměr	1,006	0,948	1,067	0,974
	st. odchylka	0,549	0,377	0,367	0,375
	< 0.7 (počet)	15 (51.7%)	24 (31.2%)	3 (37.5%)	2 (33.3%)
	> 0.7 (počet)	14 (49.3%)	53 (69.8%)	5 (63.5%)	4 (66.6%)
OCB (počet)	medián	7,0	8,0	8,0	12,5
	průměr n	10,1	8,97	8,88	13,0
	st. odchylka	8,962	6,537	5,54	7,321
	< 2 (počet)	3 (10.3%)	14 (18.2%)	1 (12.5%)	1 (16.7%)
	≥ 2 (počet)	26 (89.7%)	61 (81.8%)	7 (87.5%)	5 (83.3%)
EDSS	medián	1,0	2,0	6,0	4,75
	průměr	0,79	2,01	5,75	4,83
	st. odchylka	0,911	1,339	1,626	2,137
Délka trvání onemocnění (roky)	medián	0,1	2,5	11,5	8,0
	průměr	0,32	4,04	15,38	7,5
	st. odchylka	0,30	2,98	9,97	5,0

Tabulka 8. Kruskal-Wallisův test pro parametry Q IgG, IgG index, OCB a EDSS.

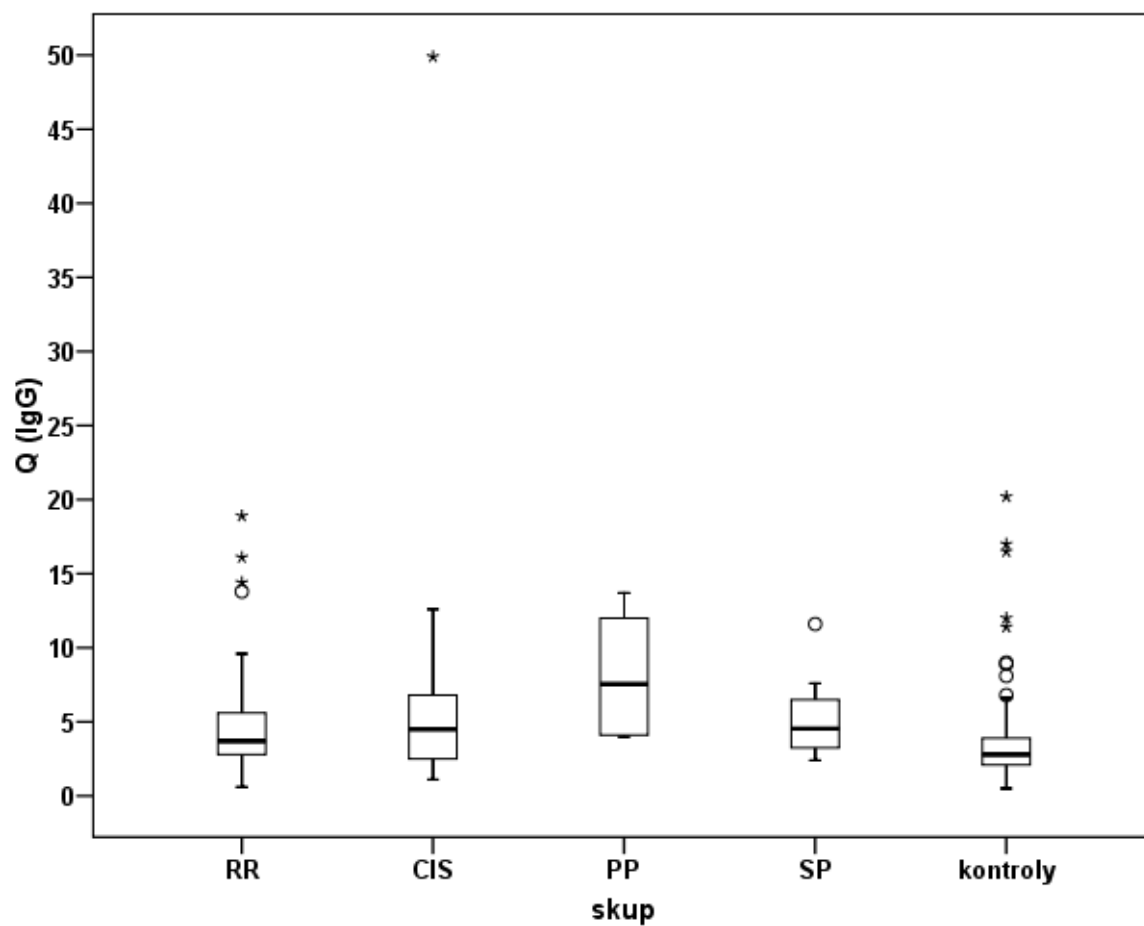
	Q _{IgG}	IgG index	OCB	EDSS
Chi-Square	27,336	43,466	170,79	45,369
Df	4	4	4	3
Asymp. Sig.	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Tabulka 9. Test Mann-Whitney pro parametr EDSS.

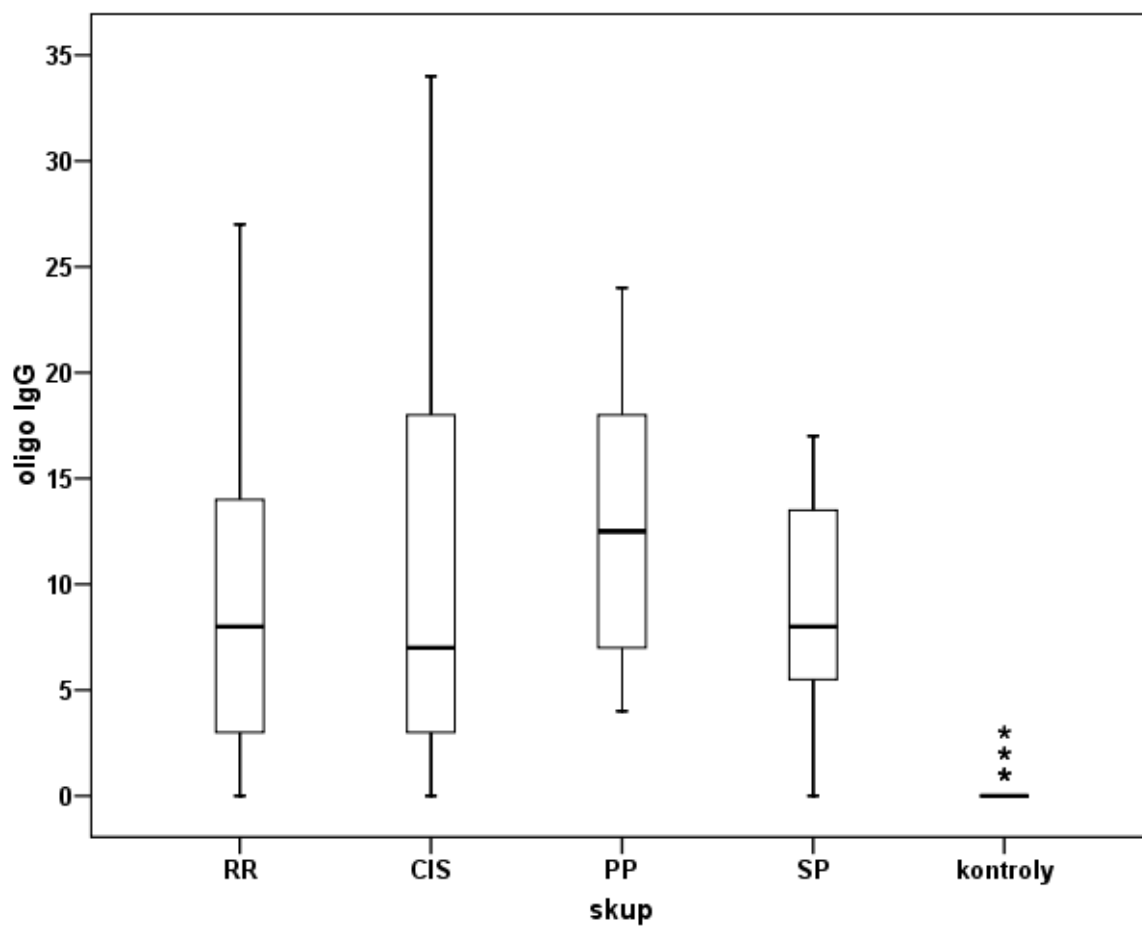
	RR : CIS	RR : PP	RR : SP	CIS : PP	CIS : SP	PP : SP
Mann-Whitney U	498,500	55,000	33,000	4,000	1,500	18,500
Wilcoxon W	933,500	3058,000	3036,000	439,000	436,500	39,500
Z	-4,457	-3,140	4,197	-3,784	-4,371	-0,722
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,002	0,040	0,0005	0,003	0,002	0,470

..

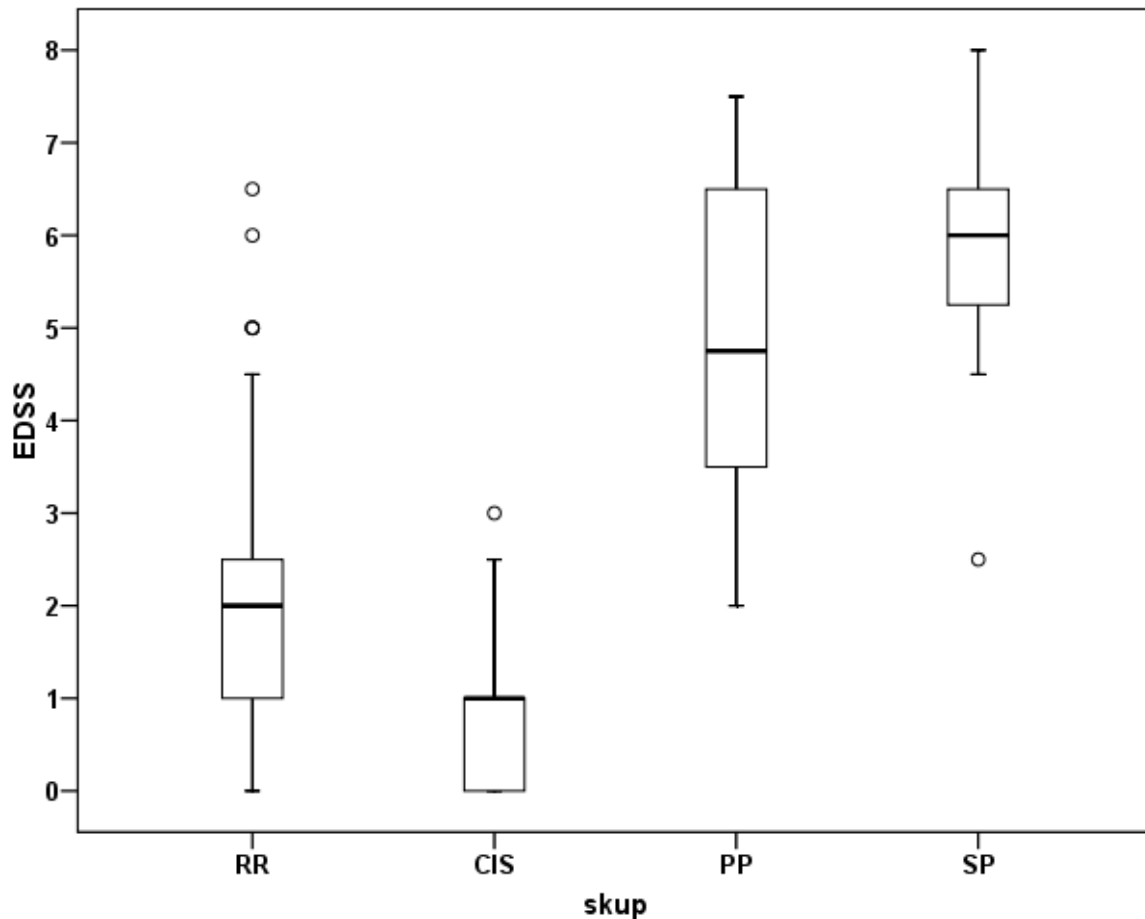
Box graf 4. Rozložení hodnot Q_{IgG} ve sledovaných skupinách.



Box graf 5. Rozložení hodnot OCB u jednotlivých forem RS.



Box graf 6. Hodnoty EDSS u jednotlivých forem RS.



2.5 Diskuse

Všeobecně uznávanou tezí je, že na počátku onemocnění RS v etiopatogenezi převažují zánětlivé procesy a v pokročilých stádiích dominují spíše procesy neurodegenerativní (4). Výzkumy posledních let ovšem prokázaly, že k axonální transekci a neurodegeneraci dochází již v časných stádiích nemoci (57). Rozhodli jsme se proto provést vyšetření vybraných zánětlivých a degenerativních markerů v mozkomíšním moku pacientů s RS v různých stádiích onemocnění a s různě těžkým klinickým postižením.

2.5.1 Diskuse 1.

Četné práce zabývající se etiopatogenezou RS se věnují problematice metabolismu železa. Velké množství železa a ferritinu se nachází v oligodendrocytech, kde se podílí na formování myelinu a procesu oxidativní fosforylace (58). Železo je rovněž růstovým faktorem důležitým pro proliferaci aktivovaných T-lymfocytů (59). V případě jakéhokoli stresu stoupá syntéza ferritinu v oligodendrocytech, ferritin se uvolňuje i do mozkomíšního moku a plazmy. Váže volné železo, čímž brání oxidativnímu poškození buněk. Ionty železa působí jako katalyzátor při vzniku hydroxylového radikálu, který iniciuje peroxidaci lipidů a oxidativní poškození proteinů. V práci LeVineho a kol. byly nalezeny vyšší hodnoty ferritinu v likvoru pacientů s aktivní chronicko-progredientní formou RS. Elevace ferritinu byla přítomna i u stabilních pacientů se SP, ovšem bez statistické signifikance. To, že podobný nález nebyl pozorován i u relaps-remitentní formy, je patrně způsobeno rozdílným mechanismem demyelinizace a zánětu. Hodnoty transferinu v CSF odpovídaly hodnotám kontrol (60). Zeman a kol. prováděli vyšetření hladin transferinu v séru a CSF a výpočet transferinového kvocientu (transferin CSF/ transferin sérum). Zaznamenali snížení hladiny transferinu v CSF a transferinového kvocientu u pacientů v remisi, u nemocných s trváním onemocnění do 2 let a u žen (61). Recentní studie používají k vyšetření CSF většinou proteomickou analýzu. Toto vyšetření představuje 2-dimenzionální elektroforézu s následnou spektrofotometrií, což umožňuje identifikovat jednotlivé likvorové proteiny (61). Proteomicky vyšetřoval CSF pacientů s RS Harris a kol. popsal u nich rovněž snížení hladiny transferinu (62). Tyto nálezy potvrzují výsledky našich vyšetření. Zaznamenali jsme také snížení hodnot transferinu především u SP, méně u CIS a RR ve srovnání s PP a kontrolami. Nerozlišovali jsme ovšem pacienty s aktivní RS a v remisi a naše pozorování nebyla statisticky signifikantní. Možnost využití stanovení hladin transferinu v CSF k diagnostice RS nebo posouzení aktivity onemocnění se proto jeví sporná.

Aktivace komplementového systému je další z entit podílejících se na patogenezi RS. Komplementové proteiny jsou nespecifickými mediátory humorální imunity. Komplementový systém funguje jako kaskáda, kterou lze aktivovat 3 různými cestami. Klasická cesta je spouštěna imunokomplexy, CRP či agregáty IgG nebo IgM. Obdobná je cesta lektinová, nezávislá na protilátkách. Cesta alternativní je indukována přímo buněčnými stěnami kvasinek a virů za přítomnosti magnézia. Všechny cesty vedou k aktivaci C3 složky. Spojením složek C5b s C6, C7, C8 a C9 se vytvoří membránový útočný komplex, který vazbou na lipidovou buněčnou membránu způsobí lýzu buňky. Další funkcí komplementu je

opsonizace mikroorganismů pro fagocytózu, chemotaktické přitahování leukocytů do oblasti zánětu, likvidace imunokomplexů a indukce specifické imunitní odpovědi usnadněním lokalizace antigenů B-buňkami a antigen-prezentujícími buňkami (1). Vyšetření funkce komplementu u pacientů s RS se věnoval Ingham a kol., který analyzoval hladiny C3 a C4 složky komplementu v séru a likvoru. Popisuje signifikantní zvýšení plazmatické hladiny C3 a C4 i poměru C3(C4) v CSF/C3(C4) v séru u pacientů s RS ve srovnání s kontrolami. Korelace likvorových a plazmatických koncentrací C3 a C4 ukazuje na systémový i centrální původ likvorové frakce těchto složek komplementu, což svědčí pro aktivaci komplementu u RS (63). Sellebjerg a spolupracovníci stanovovali hladiny C3 složky komplementu a terminálního komplementového komplexu (TTC) u jednotlivých typů RS. Zaznamenali elevaci C3 složky komplementu u všech forem RS a TTC u nemocných s atakou, přičemž jeho hladina korelovala s hladinou myelin bazického proteinu, který je přímým markerem demyelinizace, a hodnotou EDSS (64). Podobné výsledky prezentovala i studie Padilla-Docaly a kol., kdy u 80 % nemocných s RS byla nalezena intratekální syntéza C3c bez ohledu na délku onemocnění (65). V našem souboru jsme našli nesignifikantní zvýšení mediánu a průměru hodnot C3 u PP formy, ale naopak snížení těchto hodnot u CIS, RR a SP ve srovnání s kontrolami. Všechny průměrné hodnoty a mediány PP a kontrol vykazovaly vyšší hodnoty, než je horní hranice normy. Medián a průměr hodnot C4 složky komplementu byl zvýšen u PP a hodnoty u ostatních vyšetřovaných skupin byly obdobné kontrolám. Hodnoty C4 ale v žádné ze skupin nepřesáhly hranici normy. Takže lze říci, že naše výsledky odpovídají výsledkům výše uvedených pozorování.

Haptoglobin je typickým likvorovým zánětlivým markerem ze skupiny reaktantů akutní fáze, jehož koncentrace roste téměř u všech zánětlivých onemocnění. Rumbach a kol. se pokoušeli najít jiný parametr pro potvrzení diagnózy RS než přítomnost intratekální syntézy či OCB. Vyšetřovali např. hladinu haptoglobinu v séru a likvoru, ale nenašli žádné rozdíly mezi pacienty s různými formami RS (66). Práce Tumaní a kol. se pokoušela najít marker, který by predikoval přechod z CIS do RRMS. Likvory pacientů sledovaných po dobu 2 let podrobili proteomické analýze MALDI-TOF spektrofotometrie. Ve skupině nemocných, u kterých se vyvinula RR, zaznamenali kromě nižší hladiny haptoglobinu také nižší hodnoty alfa-1-B-glykoproteinu, fetuinu-A, apolipoproteinu A4, retinol-vážícího proteinu, superoxid dismutázy a transferinu a zvýšení inhibitoru serinové peptidázy (67). V našem souboru jsme zaznamenali mírnou, nesignifikantní elevaci haptoglobinu ve skupině ve stádiu primární progresse (medián 3,40; průměr $4,04 \pm 3,26$ mg/l), u ostatních skupin byl v normě (0,5–2,0

mg/l). Nález v podstatě koreluje se závěry Rumbachovy studie, protože rozdíly nejsou signifikantní. Mohlo by se rovněž jednat o chybu malých čísel, protože skupinu PP tvořilo jen 6 pacientů na rozdíl od ostatních skupin.

Beta-2-mikroglobulin je lehký řetězec HLA I. třídy, který je exprimován na povrchu buněčných membrán především lymfocytů, monocytů a makrofágů a lze ho detekovat ve všech tělních tekutinách. Jeho koncentrace roste u serózních infekcí, RS, hemoblastóz, iktu nebo HIV encefalopatie. Je považován za marker aktivity imunitních onemocnění. Bylo popsáno snížení jeho sérové hladiny u nemocných léčených cladribinem, u kterých došlo ke klinickému zlepšení a snížení EDSS. V likvoru tento trend nebyl zaznamenán (68). Bagnato a spolupracovníci referují o kolísání sérové hladiny beta-2-mikroglobulinu nezávisle na aktivitě onemocnění, tudíž jeho vyšetřování nemá prediktivní hodnotu (69). V našem sledování se hodnoty beta-2-mikroglobulinu v likvoru nemocných s RS a kontrol nelišily.

Orosomucoid je malá molekula dobře procházející přes HLB, která ho pravděpodobně propouští selektivně podle jeho biologického významu, ne v závislosti na její permeabilitě. Koncentrace orosomucoidu stoupá u malignit, především u metastáz karcinomu a hemoblastóz. Jeho intratekální syntéza nebyla dosud přesvědčivě prokázána (70). Dle Adama a kol. lze zaznamenat elevaci orosomucoidu v likvoru 50–60 % nemocných s RS po mnohaletém trvání onemocnění nezávisle na jejich věku. Naopak nižší hladiny v likvoru vykazují nemocní v remisi, nižší sérové hladiny byly pozorovány u výrazněji postižených pacientů v sekundární progresi (71). Naše práce nemůže tato pozorování potvrdit, protože jsme nezaznamenali rozdíly v CSF hladinách orosomucoidu mezi jednotlivými typy RS a kontrolami.

Alfa-1-antitrypsin (AAT) je proteinázový inhibitor, inhibitor trypsinu. Stejně jako orosomucoid prochází selektivně přes HLB a jeho koncentrace pozitivně koreluje s Q_{alb} , tedy s integritou HLB (72). Jeho hladina v likvoru stoupá u všech zánětlivých afekcí CNS a leukemických meningeálních infiltrací. Naopak nízká hladina AAT je nepříznivým prognostickým faktorem (70). AAT deficiencie je geneticky podmíněné raritní onemocnění postihující převážně kavkazskou rasu v severní Evropě a je považována za jedno z nejčastějších jednolokusových onemocnění (73). Takto postižení trpí především onemocněním jater a plic, častěji se u nich vyskytují i vaskulární onemocnění a RS (74). U sledovaných subjektů v našem souboru byly průměry a mediány hodnot AAT v mezích normy a nelišily se mezi jednotlivými skupinami. Ovšem nižší hodnoty AAT v likvoru byly nalezeny

u 27,6 % nemocných po CIS, 19,5 % nemocných s RR, 25 % s SP a 16,7 % u PP. Další genetické vyšetření těchto nemocných je ke zvážení.

2.5.2 Diskuse 2.

Druhá část diskuse je zaměřena na námi vyšetřované markery neurodegenerace. Apolipoproteiny jsou běžnou součástí likvoru, kde se nacházejí ve velmi malých koncentracích. Jejich elevace je známkou tkáňové destrukce CNS, podobně jako přítomnost lipofágů v cytologickém obraze. Při poškození nervové tkáně dochází k vazbě lipidových metabolitů na transportní proteiny – apoproteiny za vzniku apolipoproteinů, které zajišťují odsun tukových částic z CNS (75). Apolipoprotein APO-A-I patří k vysoce denzním lipoproteinům (HDL). Dle práce Burgera a Dayera APO-A-I specificky inhibuje produkci cytokinů monocytů a makrofágy po jejich kontaktu se stimulovanými T-lymfocyty. Je negativním reaktantem akutní fáze, neboť při akutním zánětu jeho hladina klesá více než o 25 % oproti původnímu stavu. Podle autorů by snížení plazmatické hladiny APO-A-I v akutní fázi zánětu mohlo být známkou tendence k přechodu do chronicity (76). Vyšetřování hladin apolipoproteinů je předmětem výzkumu především u demencí. Je známo, že polymorfismus alely APO-A-I-75G/A způsobuje elevaci hladiny APO-A-I, čímž se snižuje riziko demence. Koutsis a spolupracovníci zkoumali efekt polymorfismu alely APO-A-I-75G/A na kognitivní výkon nemocných s RS. Udávají, že nositelé této alely vykazovali lepší výsledky v neuropsychologických testech, a to především v oblasti sémantické verbální fluence a ve Stroopově testu (77). Již v roce 1988 vyšetřovali Gelman a kol. hladiny apolipoproteinů APO-E a APO-A-I v séru a likvoru nemocných s RS. U 44 % z nich zaznamenali pouze mírný pokles sérového APO-E, ostatní hodnoty v CSF a séru byly v normě (78).

Apolipoprotein APO-B je strukturálním apolipoproteinem pro chylomikra, VLDL (very low density lipoproteins) a LDL (low density lipoproteins). Je syntetizován ve střevních a jaterních buňkách a je významný pro transport cholesterolu do buňky (75). Koncentrace APO-B v likvoru je velice nízká, ačkoli LDL receptory jsou popisovány na oligodendrocytech. Osman a kol. použili k jeho stanovení v séru a likvoru metodu TR-IFMA (time resolved immunofluorometric assay). Intratekální syntéza APO-B nebyla prokázána, takže toto velmi malé množství APO-B je pravděpodobně sérového původu. Vzhledem k těmto výsledkům je patrně role APO-B v lipidovém transportu v CNS zanedbatelná (79). V naší práci jsme zaznamenali nesignifikantně nižší mediány a průměry hodnot APO-AI u pacientů s CIS, RR a

méně SP oproti kontrolám. Podle výše zmiňovaných dat by tato skutečnost mohla znamenat přítomnost akutního zánětu u nemocných v těchto skupinách. Nejvyšší intenzita zánětu dle hodnot APO-A-I by se vyskytovala ve skupině po CIS, méně s RR a nejmenší by byla u SP. U skupiny PP medián hodnot APO-A-I je rovněž nižší, ovšem průměr hodnot odpovídá kontrolám. Zaznamenané koncentrace APO-B se mezi zkoumanými skupinami nelišily, stejně jako v dostupné literatuře.

Cystatin C patří do skupiny inhibitorů proteáz. Objektem vědeckého zájmu se staly díky skutečnosti, že nekontrovaná proteolýza může vést k ireverzibilnímu poškození tkání, chronickému zánětu, malignímu bujení nebo předčasné ateroskleróze. Cystatin C je produkován většinou jaderných buněk. Nachází se v cytoplazmě neuronů, ale také v buňkách nadledvin, štítné žlázy, adenohipofýzy a A-buňkách pankreatu. Jeho koncentrace v likvoru je 5,5 x vyšší než v séru a tvoří 2–4 % likvorových proteinů (80). Cystatin C je antagonistou katepsinů, což je skupina lysozomálních proteinů produkována aktivovanou mikroglíí a makrofágy. Je tak schopen modulovat aktivaci imunitních buněk a zánětem způsobenou smrt buněk. Snížení koncentrace cystatinu C v CSF je popisováno u celé řady zánětlivých afekcí postihujících centrální i periferní nervový systém. Na zvířecích modelech demyelinizace CNS je během aktivní fáze demyelinizace patrná zvýšená produkce katepsinů makrofágy a mikroglíí až do té doby, než začnou astrocyty produkovat jejich inhibitor, cystatin C. Tato převaha katepsinů nad cystatinem C vede k dysregulaci tohoto systému v pozdních fázích demyelinizace a následně k nedostatečné remyelinizaci. Stejný nálezn je popisován i v CSF pacientů v době relapsu RS (81,82). Z těchto důvodů by cystatin C mohl být užíván jako prognostický biomarker. Snížení jeho hladiny u nemocných s RS imponuje jako známka nepříznivého průběhu nemoci (81). Výsledky našich vyšetření odpovídaly literárním údajům. Prokázali jsme signifikantně nižší hodnoty cystatinu C i cystatinového indexu ve skupině nemocných s relaps-remitentní formou RS a nesignifikantní snížení ve skupině se sekundární progresí. Hodnoty u CIS, PP a kontrol byly podobné. Hodnoty cystatinu v CSF nekorelovaly s úrovní invalidity vyjádřenou škálou EDSS. Korelace s relaps rate jsme neprováděli.

Tau protein je fosforylovaný protein, který zajišťuje stabilitu mikrotubulů, umožňuje rychlý axonální transport a utváření synapsí. Za normálních okolností je jeho hladina v likvoru velmi nízká. Koncentrace tau proteinu v CSF roste u onemocnění charakterizovaných neuronální a axonální degenerací, např. u Creutzfeldt-Jacobovy choroby, Alzheimerovy demence a jiných tauopatií, iktu nebo encefalitidy (81). Anderson a kol. prokázali přítomnost abnormálně fosforylovaného a insolubilního tau proteinu u chronické

experimentální autoimunitní encefalomyelitidy a ve 2 vzorcích mozků pacientů s chronicko-progredientní formou RS, což ukazuje na přítomnost procesů podobných jako u neurodegenerací (83). Bartosik-Psujek a Archelos vyšetřovali likvorové hladiny tau proteinu a 14-3-3 proteinu u 3 skupin nemocných: u pacientů s RS, u pacientů s jinými zánětlivými chorobami a ve skupině s nezápětlivými chorobami CNS. Zaznamenali elevaci obou parametrů u RS a ve skupině se zánětlivými chorobami CNS, hladina tau proteinu současně korelovala s hodnotou IgG indexu. Tento nález podporuje hypotézu, že poškození axonů a oligodendrocytů parciálně koreluje se zánětlivou aktivitou (84). Podobně i Kapaki a kol. zaznamenal zvýšení hladiny tau proteinu u nemocných s primárně a sekundárně progredientní formou RS na rozdíl od relaps-remitentní formy, kde jeho hodnoty odpovídaly kontrolám (85). Dle Martíneze-Yélamose a kol. hladina tau proteinu predikuje rychlost progresu, tzn. čím je vyšší hladina tau proteinu, tím kratší doba je nutná ke zvýšení EDSS o jeden stupeň (86). Naopak Jiménez-Jiménez a spol. nebo Guimarães nenašli rozdíly v hodnotách tau proteinu mezi RS a kontrolami (87,88). Podobné výsledky jsme získali i v našem souboru. Zaznamenali jsme pouze nesignifikantně vyšší hodnoty tau proteinu u nemocných po CIS, kde byl medián i průměr lehce nad normou. U ostatních forem RS byly jeho hodnoty nižší než u kontrol.

Amyloidový prekurzorový protein (APP) je bílkovina obsažená v různých částech neuronu a je běžně odbouráván enzymem alfa-sekretázou. Za patologických okolností je štěpen beta-či gama-sekretázou za vzniku insolubilních fragmentů, beta-amyloidu, jenž se ukládá v extracelulárním prostoru. Beta-amyloidové plaky jsou charakteristické pro Alzheimerovu demenci, demenci s Lewyho tělisky, demenci u Parkinsonovy choroby nebo cerebrální amyloidovou angiopatii. APP je indukován glií jako odpověď na různé stimuly, včetně zánětu. Gehrman a kol. našli při histopatologickém a imunochemickém vyšetření vzorků mozkové tkáně nemocných s RS velké množství APP v T-lymfocytech, makrofázích, astrocytech a oligodendrocytech aktivních lézí na rozdíl od kontrol, kde byla jeho hladina velmi nízká (89). Dle sdělení Birtche a kol. je akumulace APP známkou akutního axonálního poškození a nachází se nejen v akutních lézích, ale také v remyelinizovaných oblastech a inaktivních demyelinizovaných lézích. Expres APP na poškozených axonech koreluje s množstvím makrofágů a CD8 + T-lymfocytů. K axonálnímu poškození dochází tedy nezávisle na demyelinizací a jeho patogeneze je patrně odlišná (90). Mai a spol. nezaznamenali rozdíly v hladinách APP a beta-amyloidu v likvoru pacientů s RS, NMO a zdravých kontrol, ale udávají nepřímou závislost mezi APP a EDSS. Nemocní s vyššími hodnotami APP

vykazovali menší úroveň klinického postižení (91). My jsme prováděli vyšetření pouze beta-amyloidu a rovněž jsme nenalezli rozdíly v jeho hodnotách mezi sledovanými skupinami. U nemocných s RS jsme naopak zaznamenali jeho nesignifikantně nižší hodnoty.

Neuron-specifická enoláza (NSE) je glykolytický enzym nacházející se v buňkách neuroektodermového původu. Je důležitým tumormarkerem u neuroblastomu, ale i malobuněčného karcinomu plic, melanomu či seminomu. Jeho koncentrace v CSF stoupá po úrazech CNS. Nižší hladinu NSE popsal Hein Née Maier a spol. v likvoru i séru nemocných po CIS, což by mohlo znamenat nižší neuronální metabolickou aktivitu v časných stádiích RS (92). Koch a spol. při svém pětiletém sledování zaznamenali snížení hladiny NSE v séru u nemocných s progredujícím neurologickým deficitem. Koncentrace NSE negativně korelovala s hodnotou škály EDSS (93). Forooghian a spol. se zabývali vyšetřením autoprotilátek proti NSE a myelin bazickému proteinu u nemocných a RS a kontrol. Popsali zvýšenou proliferační odpověď T-lymfocytů proti NSE, která pozitivně korelovala s protilátkovou odpovědí na myelin bazický protein. To by mohlo znamenat, že patogeneze RS nezahrnuje pouze tvorbu protilátek proti myelinu, ale také autoimunitní odpověď na nemyelinové autoantigeny (94). V našem souboru jsme nenalezli žádné rozdíly v koncentracích NSE mezi vyšetřovanými skupinami.

2.5.3 Diskuse 3.

Průkaz intratekální syntézy IgG a oligoklonálních IgG pásů v likvoru dosud zůstává důležitým parametrem podporujícím diagnózu RS v diferenciálně diagnostické rozvaze. Stanovení OCB metodou IEF s imunofixací je vysoce senzitivní, ale ne zcela specifické pro RS. Přítomnost OCB je prokazatelná u 95 % pacientů s RS, 72 % nemocných vykazuje elevaci IgG indexu (95). V našem souboru byla nalezena pozitivita OCB u 82,5 % pacientů a elevace IgG indexu u 63 % nemocných. Dle Kaisera a kol. v každém případě, kdy je IgG index $> 0,8$, je prokazatelná přítomnost OCB (96). Intratekální syntéza IgG přetrvává od začátku onemocnění bez ohledu na průběh nemoci (95) Tuto skutečnost potvrzují Petereit a Reske, kteří v období od 1 měsíce do 8 let provedli 1 až 5 likvorových vyšetření u 70 nemocných s RR. Kromě OCB a IgG indexu vyšetřovali MRZ reakci a zaznamenali signifikantní zvýšení produkce protilátek proti spalničkářům v období mezi prvními 2 LP, z toho u 7 % nemocných byla prokázána tato protilátková odpověď de novo. Zvýšení AI bylo

výraznější ve skupině nemocných s větším postižením ($EDSS \geq 3$) a rychlejší progresí (zhoršení EDSS o více než 1 stupeň za rok). U 2 ze 7 pacientů, kterým bylo provedeno 5 LP, byla zaznamenána expanze protilátkové odpovědi v rámci MRZ reakce z 1 na 3 antigeny. Tato pozorování by mohla být důkazem přítomnosti polyspecifické protilátkové reaktivity u části pacientů v průběhu onemocnění RS (97). Dle práce Kocha a kol. není přítomna závislost mezi počtem OCB a stabilitou onemocnění. Během pětiletého sledování 143 nemocných se počet OCB nelišil mezi pacienty v remisi a pacienty s progredujícím neurologickým deficitem (98). Zatímco počet OCB IgG není prognostickým faktorem dalšího průběhu onemocnění, průkaz oligoklonálních IgM pásů v likvoru predikuje horší prognózu, jak vyplývá z desetiletého sledování nemocných s RR Mandrioliho a spolupracovníků (99). Literární údaje o korelaci mezi IgG indexem a počtem OCB se různí. Mayringer a kol. udávají pozitivní korelaci mezi těmito parametry (100), naopak Mareš a kol. po vyšetření 150 likvorů tuto závislost nenalezli (101). Z četných klinických sledování je patrné, že intratekální syntéza vyjádřená počtem OCB a IgG indexem zůstává neměnná bez ohledu na terapii. Není ovlivněna léčbou interferonem (102), imunosupresívy ani autologní transplantací hematopoetických kmenových buněk (103,104). Výjimkou je terapie natalizumabem, kdy bylo von Glehnem a kol. popsáno kompletní vymizení OCB po jeho 10 aplikacích u 4 ze 6 vyšetřovaných pacientů (105).

V našem souboru jsme nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly v Q_{IgG} , IgG indexu a počtu OCB mezi jednotlivými typy RS. Pouze u relaps-remitentní formy je patrná nesignifikantně nižší hodnota Q_{IgG} . Naopak u primárně progresivní formy byl vyšší počet OCB než u ostatních skupin, což by mohlo být i chybou malých čísel, protože soubor PP tvořilo pouze 6 pacientů. Nenašli jsme ani žádný vztah mezi intratekální syntézou vyjádřenou Q_{IgG} , IgG indexem a počtem OCB a úrovní invalidity danou hodnotou EDSS. Neprokázali jsme ani korelaci mezi intratekální syntézou a délkou trvání onemocnění.

3 Závěr

Na základě statistické analýzy získaných dat se nám podařilo potvrdit hypotézu, že některý z likvorových markerů může být specifický pro určitou formu RS, a to v případě 1 parametru. Prokázali jsme signifikantně nižší hodnoty cystatinu C i cystatinového indexu ve skupině nemocných s relaps-remitentní formou RS a nesignifikantně nižší hodnoty u nemocných v sekundární progresi. Hypotézu o korelaci mezi úrovní intratekální syntézy a mírou postižení danou hodnotou EDSS nebo délkou trvání onemocnění nebylo možné potvrdit.

Jinak lze říci, že vyšetření mozkomíšního moku je stále významnou doplňující vyšetřovací metodou v diferenciální diagnostice RS. Zlatým standardem je vyšetření intratekální syntézy dané Q_{IgG} , IgG indexem a počtem OCB, jejíž intenzita nekoreluje s úrovní klinického postižení ani délkou onemocnění a není ani specifická pro určitý typ RS. Dle výsledků naší práce jsme došli k závěru, že nemá prognostický význam provádět vyšetření hladin námi sledovaných zánětlivých nebo degenerativních markerů. Pouze stanovení koncentrace cystatinu C v séru i likvoru může být přínosné k posouzení míry poškození nervové tkáně neboli neurodegenerace.

Na tyto výsledky chceme v budoucnu navázat dalšími výzkumnými projekty, které by mohly přispět ke zlepšení diferenciální diagnostiky RS. Protože jen včasné stanovení diagnózy choroby může napomoci k lepšímu terapeutickému ovlivnění průběhu onemocnění a tak minimalizovat devastující následky, kterým jsou i přes stále nové možnosti terapie pacienti vystaveni.

4 Souhrn

4.1 Souhrn český

Roztroušená skleróza mozkomíšní je chronické zánětlivé demyelinizační onemocnění CNS vedoucí k demyelinizaci nervových vláken a jejich následné ztrátě. Všeobecně je uznávána teze, že z počátku onemocnění v její patogenезi převažuje zánět, který je postupně nahrazen neurodegenerací. Odrazem tohoto dění je přítomnost a určité množství specifických látek v mozkomíšním moku. Vyšetřením celého souboru likvorových markerů jsme se pokusili prokázat, zda koncentrace některého z markerů není typická pro určitou formu RS, a nemůže být tudíž ukazatelem intenzity zánětu nebo míry neurodegenerace, tedy predikovat průběh onemocnění. Dále jsme provedli korelaci mezi příslušnými markery a úrovní klinického postižení vyšetřených pacientů.

Mozkomíšní mok byl získán od pacientů hospitalizovaných na Neurologické klinice FN a LF UP Olomouc v letech 2005 až 2009 s diagnózou roztroušené sklerózy mozkomíšní. Kontrolní soubor tvořili nemocní, kterým byla provedena lumbální punkce z diferenciálně diagnostických důvodů k vyloučení neuroinfekce či krvácení do CNS. Před lumbální punkcí bylo všem pacientům s RS provedeno neurologické vyšetření a stanovena hodnota škály invalidity EDSS.

Celkem bylo analyzováno 258 likvorů, z toho 120 od pacientů s RS a 138 kontrol. Skupinu RS pacientů tvořilo 29 pacientů s CIS průměrného věku $33,9 \pm 10,9$ roku, 77 pacientů s relaps-remitentní formou RS (RR) průměrného věku $40,5 \pm 11$ let, 6 pacientů s primárně progredientní formou (PP) s průměrem $49,5 \pm 11,4$ roku a 8 pacientů v sekundární progresi (SP) průměrného věku $47,9 \pm 7,2$ roku. Zvolené kontroly byly co do věku i poměru pohlaví s pacienty s RS homogenní. Byl vytvořen panel laboratorních vyšetření, ke kterým patřil Q_{alb} a prealbumin k posouzení integrity HLB, zánětlivé markery (transferin, C3 a C4 složky komplementu, haptoglobin, beta-2-mikroglobulin, orosomucoid a alfa-1-antitrypsin), markery tkáňové destrukce (apolipoprotein A-I (Apo A-I), apolipoprotein B (Apo B), cystatin C, neuron-specifická enoláza (NSE), tau-protein a beta-amyloid) a ukazatele intratekální syntézy (počet OCB a Q_{IgG}). Výsledky byly podrobeny statistické analýze. Po zpracování hodnot zánětlivých markerů nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v jejich

hladinách mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami. Zajímavý byl nález nižších hodnot alfa-1-antitrypsu (ATT) v likvoru u 27,6 % (8 z 29 probandů) nemocných po CIS, u 19,5 % (15 ze 77 probandů) nemocných s RR, 25 % (2 z 8 probandů) s SP a 16,7 % (1 pacient ze 6) u PP. AAT je proteinázový inhibitor, jehož hladina v likvoru stoupá u všech zánětlivých afekcí CNS. AAT deficience je geneticky podmíněné raritní onemocnění postihující převážně kavkazskou rasu v severní Evropě. Takto postižení trpí především onemocněním jater a plic, častěji se u nich vyskytují i vaskulární onemocnění a RS. Další genetické vyšetření našich nemocných je ke zvážení.

Dále jsme prokázali signifikantně nižší hodnoty cystatinu C i cystatinového indexu ve skupině nemocných s relaps-remitentní formou RS a nesignifikantní snížení ve skupině se sekundární progresí. Hodnoty u CIS, PP a kontrol byly podobné. Hodnoty cystatinu v CSF nekorelovaly s úrovní invalidity vyjádřenou škálou EDSS. Korelace s relaps rate jsme neprováděli. Cystatin C patří do skupiny inhibitorů proteáz a je antagonickou katepsinů. U RS převaha katepsinů nad cystatinem C vede k dysregulaci tohoto systému v pozdních fázích demyelinizace nebo v období ataky a následně k nedostatečné remyelinizaci. Snížení hladiny cystatinu C je považována za nepříznivý faktor. Z těchto důvodů by cystatin C mohl být užíván jako prognostický biomarker.

V našem souboru jsme nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly v Q_{IgG} , IgG indexu a počtu OCB mezi jednotlivými typy RS. Nenašli jsme ani žádný vztah mezi intratekální syntézou vyjádřenou Q_{IgG} , IgG indexem a počtem OCB a úrovní invalidity danou hodnotou EDSS. Neprokázali jsme ani korelaci mezi intratekální syntézou a délkou trvání onemocnění

Závěrem lze říci, že vyšetření mozkomíšního moku je stále významnou doplňující vyšetřovací metodou ke stanovení diagnózy RS. Zlatým standardem je vyšetření intratekální syntézy dané Q_{IgG} , IgG indexem a počtem OCB, jejíž intenzita nekoreluje s úrovní klinického postižení ani není specifická pro určitý typ RS. Dle výsledků naší práce jsme došli k závěru, že nemá prognostický význam provádět vyšetření hladin námi sledovaných zánětlivých nebo degenerativních markerů. Pouze stanovení koncentrace cystatinu C v séru i likvoru může být přínosné k posouzení míry poškození nervové tkáně neboli neurodegenerace.

4.2 Summary

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory demyelinating disease of the CNS leading to demyelination of nerve fibers and their subsequent loss. It is generally accepted thesis that the beginning of the disease prevail the inflammation in the pathogenesis, which is gradually replaced by neurodegeneration. By assessment of a number of specific markers in the cerebrospinal fluid in CSF examination, we tried to establish whether the concentration of any of the markers is typical for some form of MS and can therefore be an indicator of the intensity or intensity of inflammation or neurodegeneration, therefore, predict the course of the disease. In addition we searched for a correlation between the levels of markers and clinical disability of examined patients. Cerebrospinal fluid was obtained from patients hospitalized in the Neurological Clinic, University Hospital and Palacky University in Olomouc in the years 2005 to 2009 with a diagnosis of multiple sclerosis. The control group consisted of patients who were performed by lumbar puncture in the differential diagnostic reasons to exclude neuroinfections or bleeding into the CNS. Before lumbar puncture, all patients with MS were performed with neurological examination and measurement of EDSS disability scale. A total of 258 cerebrospinal fluid were analyzed, including 120 from patients with MS and 138 controls. The group of MS patients consisted of 29 patients with CIS average age 33.9 ± 10.9 year, 77 patients with relapsing-remitting MS (RR), mean age 40.5 ± 11 years, 6 patients with primary progressive form (PP) with an average 49.5 ± 11.4 years and 8 patients with secondary progressive (SP), mean age 47.9 ± 7.2 years. Controls were selected in terms of age and sex ratio of patients with MS homogenous. He was a panel of laboratory tests, which belonged Qalb prealbumin and to assess the integrity of the HLB, inflammatory markers (transferrin, C3 and C4 complement components, haptoglobin, beta-2-microglobulin, orosomucoid and alpha-1-antitrypsin), markers of tissue destruction (apolipoprotein AI (Apo AI), apolipoprotein B (Apo B), cystatin C, neuron-specific enoláza (NSE), tau-protein and beta-amyloid) and intrathecal synthesis parameters (number and QIgG OCB). The results were subjected to statistical analysis. After processing, the values of inflammatory markers were no significant differences in their levels between the assessed groups. An interesting finding was the lower values alpha-1-antitrypsin (ATT) in the CSF in 27.6 % (8 of 29 probands) of patients after the CIS, at 19.5 % (15 of 77 probands) of patients with RR, 25 % (2 of 8 probands) with SP and 16.7 % (1 patient of 6) for PP. AAT is proteinase inhibitor whose levels in CSF increases in all inflammatory affections CNS. AAT deficiency is a rare

genetic disease that affects mainly Caucasian race in northern Europe. Thus disability is suffering from liver disease, especially lung and, more often they occur and vascular diseases and other genetic analysis of MS patients is our consideration. We also demonstrated significantly lower levels of cystatin C and cystatin index in the group of patients with relapsing-remitting MS, and a nonsignificant reduction in the group with secondary progression. Values in the CIS, PA and controls were similar. Cystatin values in the CSF did not correlate with the level of disability expressed by EDSS scale. We did not examine a correlation with relapse rate. Cystatin C belongs to a class of protease inhibitors and cathepsins antagonism. The prevalence of MS over cathepsins cystatin C leads to dysregulation of this system in the late stages of demyelination, or in the attacks and subsequent lack of remyelination. Reducing levels of cystatin C is considered as the adverse factor. For these reasons, cystatin C could be used as a prognostic biomarker.

In our group we did not detect any significant differences in QIgG, IgG index and OCB number of different types of MS. We could not find either no relationship between intrathecal synthesis expressed QIgG, IgG index and OCB number and level of disability the EDSS. We did not find any correlation between the intrathecal synthesis and duration of disease

In conclusion, the examination of cerebrospinal fluid is still an important complementary examination method for diagnosis of MS. Gold standard is the examination of the intrathecal synthesis of Q IgG, IgG index and the number of OCB, whose intensity does not correlate with the level of clinical disability and it is not specific to a particular type of MS. According to the results of our work, we concluded that it had no prognostic significance level to test above mentioned degenerative or inflammatory markers. Only the determination of concentration of cystatin C in serum and CSF may be useful to assess the degree of damage of the nervous tissue or neurodegeneration.

5 Literatura

1. Havrdová E a kol. *Neuroimunologie*. Maxdorf 2001.
2. Havrdová E. *Roztroušená skleróza*. Maxdorf 2005.
3. Poser CM. Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1995; 161:11-22.
4. Havrdová E. *Roztroušená skleróza*. *Čes Slov Neurol N* 2008; 71/104(2):121-132.
5. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Va der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82:1132-1141.
6. Orton SM, Wald L, Confavreux C, Vukusic S, Krohn JP, Ramagopalan SV, Herrera BM, Sadovnick AD, Ebers GC. Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France. *Neurology* 2011; 76(5):425-31.
7. Meier DS, Balashov KE, Healy B, Weiner HI, Guttmann CRG. Seasonal prevalence of MS disease activity. *Neurology* 2010; 75(9):799-806.
8. Goodin DS. The genetic basis of multiple sclerosis: a model for MS susceptibility. *BMC Neurol*. 2010; 10:101.
9. Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, Ness J, Chabas D, Strober J, McDonald J, Belman A, Milazzo M, Gorman M, Weinstock-Guttman B, Rodriguez M, Oksenberg JJR, James JA, US Pediatric MS Network. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology* 2011; 76(23):1989-95.
10. Torkildsen Ø, Nyland H, Myrnes H, Myhr KM. Epstein-Barr virus reactivation and multiple Sclerosis. *Eur J Neurol* 2008; 15(1):106-8.
11. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Smoking and multiple sclerosis: an update meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6(1):16149.
12. Kieseier BC. Assessing long-term effects of disease modifying drugs. *J Neurol* 2006; 253:VI/23-VI/30.
13. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier BC, Hartung HP. Immunopathogenesis and Immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006; 2(4):201-11.
14. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. *Brain Pathol* 2007; 17:210–218.
15. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 2004; 55:458–468.
16. Hladíková M, Šťourač P. Matrixové metaloproteinázy v patogenezi roztroušené sklerózy. *Ces Slov Neurol N* 2008; 71/104(5):530-536.
17. Haacke EM. Chronic cerebral spinal venous insufficiency in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 2011; 11(1):5-9.
18. Doležal O. Chronická žilní cerebrospinální insuficience u roztroušené sklerózy – staronový koncept, nové otázky? *Ces Slov Neurol N* 2011; 74/107(3):357-360.

19. Adams CW. Perivascular iron deposition and other vascular damage in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1988; 51(2):260-265.
20. Awad AM, Marder E, Milo R, Stúve O. Multiple sclerosis and chronic cerebrospinal venous insufficiency: a critical review. *Ther Adv Neurol Disord* 2011; 4(4):231-235.
21. D'haeseleer M, Cambron M, Vanopdenbosch L, De Keyser J. Vascular aspects of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2011;10(7):657-66.
22. Kessler TM, Fowler CJ, Panicker JN. Sexual dysfunction in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2009;9(3):341-50.
23. Dušánková J, Havrdová E. Psychiatrická problematika sclerosis multiplex. *Neurol. pro praxi* 2006; 4:192-4.
24. Sládková V, Muchová B, Ticháčková A, Mareš J, Urbánek K, Kaňovský P. Výskyt depresí u nemocných s roztroušenou sklerózou mozkomíšni. *Cesk Slov Neurol N* 2006; 69/102(4):280-285.
25. Štecková T, Hlušík P, Sládková V, Doláková J, Zapletalová J, Kaňovský P. Kognitivní dysfunkce u pacientů s klinicky izolovaným syndromem a roztroušenou sklerózou. *Cesk Slov Neurol N* 2011; 74/107(5):551-5.
26. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11):1444-52.
27. Dostupné z: <http://www.mult-sclerosis.org/Posercriteria.html> (aktualizováno 29.6.2011, použito 22.3.2012).
28. Dostupné z: <http://www.mult-sclerosis.org/Schumachercriteria.html> (aktualizováno 1.1.2008, použito 22.3.2012).
29. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-127.
30. Horáková D. Roztroušená skleróza – naše současné možnosti při diagnostice, stanovení prognózy nemoci a sledování efektivity léčby. *Neurol. pro praxi* 2011; 13(4):265-269.
31. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol* 2011; 69:292-302.
32. Vaněčková M, Seidl Z, Krásenský J, Horáková D, Havrdová E, Němcová J, Daneš J. Naše Zkušenosti s MR monitorováním pacientů s roztroušenou sklerózou v klinické praxi. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73/106(6):716-720.
33. Filippi M, Rocca MA, De Stefano N, Enzinger CH, Fisher E, Horsfield MA, Inglese M, Pelletier D, Comi G. Magnetic Resonance Techniques in Multiple Sclerosis. The Present and the Future. *Arch Neurol.* 2011; 68(12):1514-1520.

34. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Öhman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CHJM, Sellbjerg F, Tourtellotte WW. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. A consensus statement. *Arch Neurol* 2005; 62:865-870.
35. Sobek O, Adam P, Kelbich P, Koudelková M, Doležil D, Kasík J, Hajduková L, Krušina M, Hybelová M. Vyšetření likvoru – současné možnosti. *Neurol. pro praxi* 2009; 10(5): 280-284.
36. Bednářová J, Adam P. Likvorový profil u roztroušené sklerózy mozkomíšní. *Neurol. pro praxi* 2002; 5:249-251.
37. Kala M, Mareš J. *Lumbální punkce a mozkomíšní mok*. Galén 2008:104.
38. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J of Neurol Sci* 2001; 184:101–122.
39. Dostupné z: <http://www.antibodypatterns.com/IEF.php> (datum aktualizace není uvedeno, staženo 1.4.2012).
40. Avsar T, Korkmaz D, Tütüncü M et al. Protein biomarkers for multiple sclerosis: semi-quantitative analysis of cerebrospinal fluid candidate protein markers in different forms of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012; Epub ahead of print.
41. Harris VK, Sadiq SA. Disease biomarkers in multiple sclerosis: potential for use in therapeutic decision making. *Mol Diagn Ther.* 2009; 13(4): 225-244.
42. Fischer C, André-Obadia N, Mauguière F. Diagnostic criteria of multiple sclerosis: electrophysiological criteria. *Rev Neurol* 2001; 157(8-9):974-80.
43. Noval S, Contreras I, Muñoz S, Oreja-Guevara C, Manzano B, Rebolleda G. Optical Coherence Tomography in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica: An Update. *Mult Scler Int* 2011; 2011:472790.
44. Reske D, Petereit HF, Heiss WD. Difficulties in the differentiation of chronic inflammatory diseases of the central nervous system – value of cerebrospinal fluid analysis and immunological abnormalities in the diagnosis. *Acta Neurol Scand* 2005; 112:207-213.
45. Matà S, Lolli F. Neuromyelitis optica: an update. *J Neurol Sci* 2011; 303(1-2):13-21.
46. Špalek P. Intravenózní imunoglobulín v léčbě autoimunitných neurologických ochorení. *Neurol. pro praxi* 2011; 12(6):398-402.
47. Cortese I, Chaudhry V, So YT, Cantor F, Cornblath DR, Rae-Grant A. Evidence based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders. Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2011; 76(3):294-300.
48. Havrdová E. Vývoj nových léků v oblasti RS – změnila se prognóza pacienta? *Neurol pro praxi* 2011; 12(3):170-174.
49. Rudick RA. Multiple sclerosis, natalizumab, and PML: Helping patients decide. *Cleve Clin J of Med* 2011; 78(2):18-23.
50. Nicolas R, Giannetti P, Alsanousi A, Friede T, Muraro PA. Development of oral Immunomodulatory agents in the management of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther* 2011; 5:255-274.

51. Kurča E, Cuninková M. Použitie monoklonových protilátok v neurológii. *Neurol. pro praxi* 2011; 12(6):403-406.
52. Piřha J. Imunosupresiva v léčbě neurologických onemocnění. *Neurol. pro praxi* 2011; 12(6):389-393.
53. Van Wijmeersch B, Sprangers B, Dubois B, Waer M, Billiau AD. Autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Multiple Sclerosis: perspective on mechanisms of action. *J Neuroimmunol* 2008; 197(2):89-98.
54. Krasulová E, Trněný M, Kozák T, Havrdová E. Autologní transplantace kmenových krvetvorných buněk a její současná role v léčbě roztroušené sklerózy. *Cesk Slov Neurol N* 2009; 72/105(3):227-234.
55. Lu JQ, Joseph JT, Nash RA, Storek J, Stevens AM, Metz LM, Clark AW, Johnson ES, Yong VW. Neuroinflammation and Demyelination in Multiple Sclerosis After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Arch Neurol* 2010; 67(6):716-722.
56. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2:201-211.
57. Racke MK. Immunopatogenesis of multiple sclerosis. *Annn Indian Acad. Neurol.* 2009; 12(4):215-220.
58. Sfagos C, Makis AC, Chaidos A, Hatzimichael EC, Dalamaga A, Kosma K, Bourantas KL. Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2005; 11(3):272-275.
59. Zeman D, Adam P, Kalistová H, Sobek O, Kelbich P, Anděl J, Anděl M. Treansferrin in patients with multiple sclerosis: a comparison among various subgroups of multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand.* 2000; 101(2):89-94.
60. LeVine SM, Lynch SG, Ou CHN, Wulser MJ, Tam E, Boo N. Ferritin, transferrin a iron concentration in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Brain Res.* 1999; 821(2):511-515.
61. Rammohan KW. Cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol.* 2009; 12(4):246-253.
62. Harris VK, Diamanduros A, Good P, Zakin E, Chalivendra V, Sadiq SA. Bri2-23 is a potential cerebrospinal fluid biomarker in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2010; 40(1):331-339.
63. Ingram G, Hakobyan S, Hirst C, Harriks C, Loveless S, Mitchell J, Pickersgill T, Robertson NP, Morgam BP. Systemic komplement profilig in multiple sclerosis as a biomarker of disease state. *Mult Scler.* 2012; Epub akad of print.
64. Sellebjerg F, Jalliashvili Im, Christiansen M, Garred P. Intrathecal activation of the complement systém and disability in multiple sclerosis. *J of the Neurol. Sci* 1998; 157(2):168-174.
65. Padila-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Fundora-Hernández H, Noris-García E, Bu-Coifiu-Fanego R, González-Hernández M, Rodríguez-Rey A. C3c intrathecal synthesis evaluation in patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65(3-B):800-802.

66. Rumbach L, Grucker M, Kiesmann M, Warter JM, Collard M: Biochemical analysis of the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: study of various formulas. *Pathol Biol (Paris)*;36(10):1217-1220.
67. Tumani H, Lehmensiek V, Rau D, Guttman I, Tauscheer G, Mogel H, Palm C, Hirt V, Suessmuth SD, Sapunova-Meier I, Ludolph AC, Brettschneider J. CSF proteome analysis in clinically isolated syndrome (CIS): candidate markers for conversion to definite multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2009; 452(2):214-217.
68. Niezgodá A, Losy J, Mehta PD. Effect of cladribine treatment on beta-2-microglobulin and soluble intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with multiple sclerosis. *Folia Morphol (Warsz)* 2001; 60 (3):225-228.
69. Bagdato F, Zivadinov R, Cecchinelli D et al. Beta2-microglobulin serum level is not marker of disease activity in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2004; 11(7):455-60
70. Adam P, Taborsky L, Sobek O: *Proteinocytologie mozkomíšního moku*. Orion Diagnostika, Medica New Publisher, 2002.
71. Adam P, Sobek O, Táborský L, Hildebrand T, Tutterová O, Záček P. CSF and serum orosomucoid (alpha-1-glycoprotein) in patients with multiple sclerosis: a comparison among particular subgroups of MS patients. *Clin Chim Acta* 2003; 334(1-2):107-110.
72. Pearl GS, Mullins RE. Alpha-1-antitrypsin in cerebrospinal fluid of patients with neurologic diseases. *Arch Neurol*. 1985; 42(8):775-777.
73. de Serres FJ. Alpha-1-antitrypsin deficiency is not a rare disease but a disease that is rarely diagnosed. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(16):1851-1854.
74. Lolin YI, Ward AM. Alpha-1-antitrypsin phenotypes and associated disease patterns in neurological patients. *Acta Neurol Scand*. 1995; 91(5):394-8.
75. Adam P, Nekola P, Tauberová A, Preiningerová J, Tyl D, Zeman D, Sobek O. Sledování apolipoproteinů v likvoru. *Čes a Slov Neurol. N* 1997; 60(6):304.
76. Burger D, Dayer JM. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev*. 2002; 1(1-2):111-117.
77. Koutsis G, Panas M, Giogkarakí E, Karadima G, Sfagos C, Vassilopoulos D. An APOA1 promoter polymorphism is associated with cognitive performance in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15(2):174-179.
78. Gelman BB, Rifai N, Christenson RH, Silverman LM. Cerebrospinal fluid and plasma apolipoproteins in patients with multiple sclerosis. *Ann Clin Lab Sci*. 1988; 18(1):46-52.
79. Osman I, Gaillard O, Meillet D, Bordas-Fonfrère M, Gervais A, Schuller E, Delattre J, Legrand A. A sensitive time-resolved immunofluorometric assay for the measurement of apolipoprotein B in cerebrospinal fluid. Application to multiple sclerosis and other neurological diseases. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1995; 33(1):53-58.
80. Mareš J, Stejskal D, Vavroušková J, Urbánek K, Herzig K, Hlušík P. Use of cystatin C determination in clinical diagnostics. *Biomed. Papers* 2003; 147(2):177-180.

81. Gajofatto A, Bongiani M, Zanusso G, Benedetti MD, Monaco S. Are Cerebrospinal Fluid Biomarkers Useful in Predicting the Prognosis of Multiple Sclerosis Patients? *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12:7960-7970.
82. Nakashima I, Fujinoki M, Fujihara K, Kawamura T, Nakamura M, Itoyama Y. Alteration of cystatin C in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007; 62(2):197-200; discussion 205.
83. Anderson JM, Hampton DW, Patani R, Pryce G, Crowther RA, Reynolds R, Franklin RJM, Giovanoni G, Compston DAS, Baker D, Spillantini MG, Chandran S. Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Brain* 2008; 131(7):1736-1748.
84. Bartosik-Psujek H, Archelos JJ. Tau protein and 14-3-3 are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and correlate with intrathecal synthesis of IgG. *J Neurol.* 2004; 521:414-420.
85. Kapaki E, Paraskevas GP, Michalopoulou M, Kilidireas K. Increased cerebrospinal fluid tau protein in multiple sclerosis. *Eur Neur* 2000; 43:228-232.
86. Martínez-Yélamos A, Saiz A, Bas J, Hernandez JJ, Graus F, Arbizu T. Tau protein in cerebrospinal fluid: a possible marker of poor outcome in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2004; 363(1):14-17.
87. Jiménez-Jiménez FJ, Zurdo JM, Hernanz A, Medina Acebrón S, de Bustos F, Barcenilla B, Sayed Z, Ayuso-Peralta L. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2002; 106(6):351-354.
88. Guimarães J. Tau protein seems not to be a useful routine clinical marker of axonal damage in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2006; 12(3):354-356.
89. Gehrman J, Banati RB, Cuzner ML, Kreutzberg GW, Newcombe J. Amyloid precursor protein (APP) expression in multiple sclerosis lesions. *Glia* 1995; 15(2):141-151.
90. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; 123(6): 1174-1183.
91. Mai W, Hu X, Lu Z, Peng F, Wang Y. Cerebrospinal Fluid Levels of Soluble Amyloid Precursor Protein and β -Amyloid 42 in Patients with Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica and Clinically Isolated Syndrome. *J Int Med Res.* 2011; 39(6):2402-2413.
92. Hein Neé Maier K, Kohler A, Diem R, Sattler MB, Demmer I, Lange P, Bahr M, Otto M. Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2008; 436(1):72-6.
93. Koch M, Mostert J, Heersema D, Teelken A, De Keyser J. Plasma S100beta and NSE levels and progression in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2007; 252(2):154-8.
94. Forooghian F, Cheung RK, Smith WC, O'Connor P, Dosch HM. Enolase and arrestin are novel nonmyelin autoantigens in multiple sclerosis. *J Clin Immunol.* 2007; 27(4):388-396.

95. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol.* 2006; 180(1-2):17-28.
96. Kaiser R, Czygan M, Kaufmann R, Lucking CH. Intrathecal IgG synthesis: when is determination of oligoclonal bands necessary? *Nervenarzt* 1995; 66:618-623.
97. Petereit H-F, Reske D. Expansion of antibody reactivity in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients – follow-up and clinical implications. *Cerebrospin. Fluid Res.* 2005;2:3.
98. Koch M, Heersema D, Mostert J, Teelken A, De Keyser J. Cerebrospinal fluid Oligoclonal bands and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2007; 15(4):23.
99. Mandrioli J, Sola P, Bedin R, Gambini M, Merelli E. A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease. *J Neurol.* 2008; 255(7):1023-1031.
100. Mayringer I, Timeltaler B, Deisenhammer F. Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases. *Eur J Neurol.* 2005; 12(7):527-530.
101. Mares J, Herzig R, Urbanek K, Sladkova V, Sklenarova J, Bekarek V, Schneiderka P, Zapletalova J, Kanovsky P. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008; 152(2):247-249.
102. Rudick RA, Cookfair DL, Simonian NA, Ransohoff RM, Richert JR, Jacobs LD, Herndon RM, Salazar AM, Fischer JS, Granger CV, Goodkin DE, Simon JH, Bartoszak DM, Bourdette DN, Braiman J, Brownschidle CM, Coats ME, Cohan SL, Dougherty S, Kinkel RP, Mass MK, Munchsauer FE, O'Reilly K, Priore RL, Whitham RH. Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFNbeta-1a) for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *J Neuroimmunol.* 1999; 93(1-2):8-14.
103. Bowen JD, Kraft GH, Wundes A, Guan Q, Maravilla KR, Gooley TA, McSweeney PA, Pavletic SZ, Openshaw H, Storb R, Wener M, McLaughlin BA, Henstorf GR, Nash RA. Autologous hematopoietic cell transplantation following high-dose immunosuppressive therapy for advanced multiple sclerosis: long-term results. *Bone Marrow Transplant.* 2011; Epub ahead of print.
104. Saiz A, Carreras E, Berenguer J, Yagüe J, Martínez C, Marín P, Rovira M, Pujol T, Arbizu T, Graus F. MRI and CSF oligoclonal bands after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology* 2001; 56(8):1084-1089.
105. von Glehn F, Farias AS, Penalva de Oliveira AC, Damasceno A, Longhini AL, Oliveira EC, Damasceno BP, Santos LM, Brandão CO. Disappearance of cerebrospinal fluid oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2011; Epub ahead of print.

6 Publikace

6.1 Práce související s dizertační prací

6.1.1 Původní vědecké publikace uveřejněné in extenso v recenzovaných vědeckých časopisech s IF

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, Podivínský J, Bekárek V, Sklenařová J, Zapletalová J, Hluštík P, **Sládková V**, Doležil D, Kaňovský P. Relapsing-remitting multiple sclerosis and oligoclonal band pattern during disease modifying drug therapy. *Čes a slov Neurol N* 2007; 70/103(6):674-677, IF₂₀₀₅ 0,070.

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, **Sládková V**, Opavský R, Hluštík P, Kollárová K, Podivínský J, Sklenařová J, Bekárek V, Schneiderka P, Zapletalová J, Kaňovský P. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the CSF of patients with multiple sclerosis. *Čes a slov Neurol N* 2007; 70/103(4):392-394, IF₂₀₀₅ 0,070.

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Zapletalová J, Stejskal D, Hluštík P, Kaňovský P. Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome. *Neurol Res* 2011; 33(4):415-420, IF₂₀₁₀ 1,621.

citováno v: Corthals AP. Multiple sclerosis is not a disease of the immune system. *Quart Rev of Biol.* 2011; 86(4):287-321.

Sládková V, Mareš J, Hluštík P, Langová J, Kaňovský P. Intrathecal synthesis in particular types of multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2012; 156(1), IF₂₀₁₀ 0,716. Přijato do tisku.

6.1.2 Původní vědecké publikace uveřejněné in extenso v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Mares J, Herzig R, Urbanek K, **Sladkova V**, Sklenarova J, Bekarek V, Schneiderka P, Zapletalova J, Kanovsky P. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2008; 152(2):247-9.

6.1.3 Přehledné/souborné vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Sládková V, Mareš J, Kaňovský P. Vyšetření mozkomíšního moku u RS. Neurologia 2012; 7(1). Přijato do tisku.

6.1.4 Publikovaná abstrakta

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, Hluštík P, **Sládková V**, Sklenářová J. Intrathecal IgG Synthesis in Multiple Sclerosis. 28th World Congress of Neurology (WCN), Sydney, Australia, Nov. 5-11,2005, abstrakt J of Neurol Sci 2005; 41(Suppl.328):235.

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, Hluštík P, **Sládková V**, Sklenářová J, Bekárek V, Schneiderka P, Zapletalová J, Kaňovský P. The correlation of IgG index and oligoclonal bands in patients with clinical supposed multiple sclerosis. 21st Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), Thessaloniki, Greece, abstrakt Mult Scler 2005; 11(Suppl 1):23.

Mares J, Herzig R., Urbanek K, **Sladkova V**, Hlustik P, Sklenarova J, Bekarek V, Schneiderka P, Zapletalova J, Kanovsky P. Correlation of IgG Index and Oligoclonal Bands in CSF of Patients with Multiple Sclerosis and other neurology diseases. 22nd Congress of The European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), Madrid, Spain, abstrakt Mult Scler 2006; 12(Suppl 1):64.

Sládková V, Mareš J, Kaňovský P. Markery neurodegenerace u nemocných s RS. XXII. České a slovenské dny mladých neurologů, XII. Dny mladých neurologů Moravskoslezského kraje na sjezdu mladých neurologů Hradec nad Moravicí 11.5.2007, abstrakt Neurol pro praxi 2007; 8:B21.

Nevrlý M, **Sládková V**, Mareš J, Kaňovský P. Neurodegenerace a demyelinizace: koincidence nebo nová skutečnost? XXII. České a slovenské dny mladých neurologů, XII. Dny mladých neurologů Moravskoslezského kraje sdělení na sjezdu mladých neurologů Hradec nad Moravicí 11.5.2007, abstrakt Neurol pro praxi 2007; 8:B21.

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, **Sládková V**, Opavský R, Hlušík P, Kollárová K, Podivínský J, Sklenářová J, Bekárek V, Schneiderka P, Zapletalová J, Kaňovský P. Korelace IgG indexu a oligoklonálních pásů v likvoru pacientů s roztroušenou sklerózou a pacientů bez afekce CNS. Cesk a Slov Neurol N 2007; 70/103(Suppl):72.

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, **Sládková V**, Opavský R, Hlušík P, Kollárová K. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the CSF of patients with multiple sclerosis and patients without CNS affection. 23rd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Oct.11-14.2007, Praha, abstrakt Multiple sclerosis 2007;13:S7-S273, P374.

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, **Sládková V**, Opavský R, Hlušík P, Kollárová K, Podivínský J, Sklenářová J, Bekárek V, Schneiderka P, Zapletalová J, Kaňovský P. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the CSF of patients with multiple sclerosis. Čes a Slov Neurol N 2007; 70/103(4):392-394.

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Opavský R, Kaňovský P. Likvorové markery neurodegenerace u nemocných s roztroušenou sklerózou mozkomíšni. XXI. český a slovenský neurologický sjezd Praha, 28.11.-1.12.2007, abstrakt Česk Slov Neurol N 2007; 70/103(supplementum):S72.

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Kollárová K, Kaňovský P. Comparison of the degenerative and inflammatory markers in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome. 12th Congress of the European Federation of Neurological Societies, Madrid, Spain, Aug.23-26,2008, abstrakt Eur J of Neurol 2008; 12(Supp.3):220.

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Kollárová K, Kaňovský P. Comparison of the degenerative and inflammatory markers in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome. 24th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Sep.17-20, 2008, Montreal, Canada, abstrakt Multiple Sclerosis 2008; 14:S29-S293.

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Kollárová K, Kaňovský P. Srovnání zánětlivých a degenerativních likvorových markerů u nemocných s remitentně- relabující formou roztroušené sklerózy mozkomíšní a s klinicky izolovaným syndromem. XXII. český a slovenský neurologický sjezd, 27.-30.11.2008, Olomouc, abstrakt Česk Slov Neurol N 2008; 71/104(suppl 3):15-16.

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, Doležil D, **Sládková V**, Luběnová B, Obereignerů R, Bekárek V, Sklenářová J, Zapletalová J, Kaňovský P. Vývoj počtu oligoklonálních IgG pásů v likvoru pacientů s roztroušenou sklerózou. Čes a Slov Neurol N 2008; 71/104 (Suppl 3):15.

Mares J, Herzig R, Urbanek K, **Sladkova V**, Opatovsky R, Lubenova B, Kollarova K, Hlustik P, Vranova H, Sklenarova J, Bekarek V, Schneiderka P, Zapletalova J, Kanovsky P. Intrathecal synthesis measured by the IgG Index and oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. A correlation study. J Neurol 2008; 255(Suppl 2):207.

Sládková V, Luběnová B., Mareš J., Kaňovský P. Markery zánětu a neurodegenerace v likvoru pacientů s roztroušenou sklerózou mozkomíšní. XXIV. české a slovenské dny mladých neurologů, 14.-16.5.2009, Hradec nad Moravicí, abstrakt Neurol pro praxi 2009; 10(suppl.C):25.

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Zapletalová J, Kaňovský P. Comparison of the degenerative and inflammatory markers in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinically isolated syndrome. 19th Meeting of the European Neurological Society, June 20-24, 2009, Milan, Italy, abstrakt J of Neurol 2009; 256(Suppl.2):89.

6.2 Ostatní publikace

6.2.1 Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v recenzovaných vědeckých časopisech s IF

Sládková V, Muchová B, Ticháčková A, Mareš J, Urbánek K, Kaňovský P. Výskyt depresí u nemocných s RS. *Česk a Slov Neurol N* 2006; 69/102(4):280-285, IF₂₀₀₆ 0,045.

citováno v: Havrdova E. Multiple Sclerosis. *Česk Slov Neurol N* 2008; 71(2):121-132.

Szilasiova J, Novosadova Z, Gdovinova Z. Cognitive evoked potentials – The P300 wave in patients with sclerosis multiplex: Relation to the form of the disease, somatic affection and quality of life. *Česk Slov Neurol N* 2007; 70(6):665-673.

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Kollárová K, Opavský R, Kaňovský P. Léky navozený systémový lupus erythematosus při terapii interferonem beta-1b. Kazuistika. *Čes a Slov Neurol N* 2008; 71/104(4):487-489, IF₂₀₀₈ 0,319.

citováno v: Szilasiova J, Lazurova I. Sclerosis Multiplex and Comorbidity with Another Autoimmune Disease. *Česk Slov Neurol N* 2009; 72(1):51-56.

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Hlušík P, Kaňovský P. Drug-induced systemic lupus erythematosus in interferon beta-1b therapy. *Neuroendocrinol Lett* 2011; 32(1):4-6, IF₂₀₁₀ 1,621.

citováno v: Bukhari M. Drug induced rheumatic diseases: a review of Publisher case reports from the last two years. *Curr. Opin in Rheum.* 2012; 24(2):182-186.

Štecková T, Hlušík P, **Sládková V**, Doláková J, Zapletalová J, Kaňovský P. Kognitivní dysfunkce u pacientů s klinickým izolovaným syndromem a roztroušenou sklerózou. *Čes a Slov Neurol N* 2011; 74/107(5):551-555, IF₂₀₁₀ 0,393.

6.2.2 Přehledné/souborné vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Nevrlý M, **Sládková V**, Otruba P, Buřval S, Lukáš Z, Kaňovský P. Případ motorické a senzitivní neuropatie a roztroušené sklerózy mozkomíšní u jednoho pacienta. *Neurol pro praxi* 2010; 11(1):59-62.

Hok P, Hlušík P, Túdús Z, Frantis P, Klosová J, **Sládková V**, Mareš J, Otruba P, Kaňovský P. Zmiany czynności kory ruchowej mózgu po leczeniu botuliną u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym i spazmem kończyn dolnych. *Aktualn Neurol* 2011; 11(4):251-256.

6.2.3 Publikovaná abstrakta

Mareš J, Herzig R, **Sládková V**, Doležil D, Urbánek K, Kaňovský P. Atako-remitentní forma roztroušené sklerózy a změny vzorce oligoklonálních IgG pásů v likvoru během terapie DMD. XXI. zjazd slovenských a českých mladých neurologův, 16.-18.2.2006, Martin, Slovensko, abstrakt *Neurol pro praxi* 2006; 7(1 Suppl 1):22.

Sládková V, Muchová B, Ticháčková A, Urbánek K, Kaňovský P. Výskyt depresí u nemocných s RS. XXI. zjazd slovenských a českých mladých neurologův, 16.-18.2.2006, Martin, Slovensko, abstrakt *Neurol pro praxi* 2006; 7(1 Suppl 1):23.

Mareš J, **Sládková V**, Herzig R, Urbánek K, Pidrman V, Bekárek V, Schneiderka P, Kaňovský P. Markery neurodegenerace u degenerativních onemocnění CNS. *Neurol pro praxi* 2006; 7(S2):55-6.

Mareš J, **Sládková V**, Herzig R, Urbánek K, Pidrman V, Bekárek V, Schneiderka P, Kaňovský P. Markery neurodegenerace u degenerativních onemocnění CNS. XX. slovenský a český neurologický sjezd, 29.9.2006, Košice, Slovensko, abstrakt *Čes a Slov Neurol N* 2006; 7(S2):55-56.

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, Podivínský J, Bekárek V, Sklenařová J, Zapletalová J, Hlušík P, **Sládková V**, Doležil D, Kaňovský P. Relapsing-remitting multiple sclerosis and oligoclonal band pattern during disease modifying drug therapy. *Čes a Slov Neurol N* 2007; 70/103(6):674-677.

Mareš J, Herzig R, **Sladkova V**, Urbanek K, Bekarek V, Sklenarova J, Zapletalova J, Dolezil

D, Kanovsky P. Oligoclonal band pattern during interferon beta therapy of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14: S2-293.

Mares J, Herzig R, Urbanek K, Hlustik P, Vranova H, **Sladkova V**, Opavsky R, Lubenova B, Kollarova K, Obereigneru R, Sklenarova J, Stejskal D, Vavrouskova J, Zapletalova J, Kanovsky P. The assessment of beta amyloid, tau protein and cystatin C in the cerebrospinal fluid laboratory markers of neurodegenerative diseases. *J Neurol* 2008; 255(Suppl 2):195.

Klosová J, Hluštík P, Hok P, **Sládková V**, Mareš J, Otruba P, Herzig R, Kaňovský P. Cortical activation changes following botulinum-toxin treatment of leg spasticky in multiple sclerosis - pilot study. 7. Olomoucké neuroimunologické sympozium s mezinárodní účastí, 22.-23.9.2011, Olomouc, abstrakt *Čes a Slov Neurol N* 2011; 74/107(5):605.

7 Přílohy

7.1. Publikace č. 1:

Sládková V, Mareš J, Luběnová B, Zapletalová J, Stejskal D, Hlušík P, Kaňovský P. Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome. *Neurol Res* 2011; 33(4):415-420, IF₂₀₁₀ 1,621.

Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing–remitting course of disease and after clinical isolated syndrome

Vladimira Sladkova, Jan Mareš, Blanka Lubenova, Jana Zapletalova, David Stejskal, Petr Hlustik, Petr Kanovsky

Department of Neurology, University Hospital Olomouc, Czech Republic

Background: Literature includes evidence of initial predominance of inflammation and later development of neurodegeneration in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS).

Objective: To search for differences in inflammatory and degenerative cerebrospinal fluid (CSF) markers between relapsing–remitting MS (RRMS) and the clinical isolated syndrome (CIS).

Methods: A total of 148 subjects were evaluated, 65 MS patients (45 RRMS and 20 CIS) and 83 controls. The evaluated parameters included albumin quotient and prealbumin, transferrin, C3 and C4 complement factors, haptoglobin, beta-2-microglobulin, orosomucoid, alpha-1-antitrypsin, apolipoprotein A-I, apolipoprotein B, cystatin C, neuron-specific enolase, tau protein, beta-amyloid, oligoclonal IgG band (OCB), and IgG quotient (QIgG).

Results: No differences were found in the inflammatory and degenerative CSF markers between patients with RRMS and CIS. QIgG was higher in RRMS than that in CIS but the number of OCB was higher after CIS. Cystatin C levels were significantly lower in RRMS compared to the other groups. It can be considered an indicator of the demyelination degree. Normal values of beta-amyloid were less frequent in RRMS compared to those in controls.

Keywords: Multiple sclerosis, CIS, RRMS, CSF, Inflammatory markers, Degenerative markers

Introduction

The pathogenesis of multiple sclerosis (MS) is characterized by the processes of inflammation and degeneration. The disease is probably triggered by an immune reaction to myelin-related epitopes in the periphery, which leads to generation and activation of T cells targeting an unidentified antigen. These cells cross the blood-brain barrier (BBB) into the central nervous system (CNS), where local reactivation by the target antigen and clonal expansion occurs. Pro-inflammatory cytokines produced by activated T cells stimulate the infiltration of macrophages and other immunocompetent cells into the developing lesions. Antibodies released by B cells contribute to myelin destruction through a complement system.¹ In parallel with the damage of myelin sheaths, axonal damage also begins during the earliest stages of MS; inflammation sustains this damage and can persist subclinically.² Furthermore,

inflammation initiates the degenerative cascade right from the onset of the disease. Neurodegeneration is triggered by microglia activation and mediated by oxidative stress and excitotoxicity. Oxidative stress results in the damage of multiple lipid and protein compounds via peroxidation and nitration processes. Excitotoxicity mechanisms are complex involving glutamate overload, ion channel dysfunction, calcium overload, mitochondriopathy, proteolytic enzyme production and activation of apoptotic pathways.³

Generally, relapses are the clinical equivalent of the acute focal inflammation in the CNS, whereas progression is due to chronic diffuse neurodegeneration. Acute inflammatory lesions may be the 'trees that hide the forest', because clinical progression and neurodegeneration develop from the onset of disease, independently of relapses and the inflammatory process.⁴

Assessment of inflammatory activity and the level of neurodegeneration in the CNS is possible using several methods *in vivo*: magnetic resonance imaging techniques or body fluid evaluation. The basic and most

Correspondence to: Vladimira Sladkova, Department of Neurology, University Hospital Olomouc, I.P. Pavlova 6, Olomouc, Czech Republic. Email: sladkovav@centrum.cz

important method is cerebrospinal fluid (CSF) examination. In our work, we asked the question, whether there are any differences in the CSF levels of the inflammatory and degenerative markers in patients with relapsing-remitting course of MS (RRMS) and those after clinical isolated syndrome (CIS).

Patients and Methods

A total of 148 patients were studied, 65 MS patients and 83 controls with other non-inflammatory neurological diseases (e.g. stroke, low-back pain, and headache). Diagnosis of MS was determinate by McDonald criteria. All patients signed informed consent to lumbar puncture. CSF evaluations in control group patients were performed to exclude other neurological disorders, such as subarachnoid haemorrhage or CNS infection. The group of MS patients included 45 patients with RRMS and 20 after CIS, overall 47 women and 18 men, 18–68 years old (mean age 40.5 years) with disease duration ranging from 1 month to 28 years (mean 3.5 years and median 11.4 years). Demographic data are provided in Table 1. The CIS patients (but not the

RRMS patients) were significantly younger than the control group ($P=0.011$, analysis of variance and least significant difference *post hoc* test).

In each participant, about 15 ml of CSF was collected in glass tubes via lumbar puncture with an atraumatic needle and 15 ml of blood was drawn. The CSF was centrifuged (10 minutes, 1100g, 4°C) and both serum and CSF were deep frozen (–20°C). Serum and CSF were then subject to haematological, immunological and biological testing using enzyme-linked immunosorbent assay, spectrophotometry, turbidimetry and nephelometry in the biochemical and haematological laboratory.

A standardized laboratory protocol included the following CSF analyses: (1) markers of the BBB integrity: albumin quotient (Qalb) and prealbumin; (2) inflammatory markers: transferrin, C3 and C4 complement factors, haptoglobin, beta-2-microglobulin, orosomucoid and alpha-1-antitrypsin (AAT); (3) markers of tissue destruction: apolipoprotein A-I (ApoA-I), Apo-B, cystatin C, neuron-specific enolase (NSE), tau protein and beta-amyloid; (4) intrathecal immunoglobulin synthesis was evaluated

Table 1 Patient group characteristics

Group	No. of patient (proportion)			Mean age (years)		
	Female	Male	Total	Female	Male	Overall (years)
CIS	16 (80%)	4 (20%)	20	32.4	35.2	34.9
RRMS	31 (69.6%)	14 (30.4%)	45	40.5	38.6	39.6
Controls	61 (73.5%)	22 (26.5%)	83	42.8	41.9	42.3
Total	109 (73.2%)	40 (26.8%)	148	41.1	38.6	40.5

Table 2 Chi-square test demonstrates statistically significantly lower share of RRMS patients with normal beta-amyloid values in comparison with controls and a higher proportion of patients with lower than normal beta-amyloid values in RRMS

		Beta-amyloid			Total
		<400	Normal (400–1200)	>1200	
CIS	Count	0	18	2	20
	% within group	0.0%	90.0%	10.0%	100.0%
	Adjusted residual	–1.1	0.0	1.0	
Controls	Count	0	79	4	83
	% within group	0.0%	95.2%	4.8%	100.0%
	Adjusted residual	–3.1	2.4	–0.4	
RRMS	Count	7	36	2	45
	% within group	15.6%	80.0%	4.4%	100.0%
	Adjusted residual	4.0	–2.6	–0.3	
Total	Count	7	133	8	148
	% within group	4.7%	89.9%	5.4%	100.0%

Chi-square tests			
	Value	Degree of freedom	Asymptotic significance (two-sided)
Pearson chi-square	17.681	4	0.001
No. of valid cases	148		

Note: Markers with significant differences across groups are printed in bold.

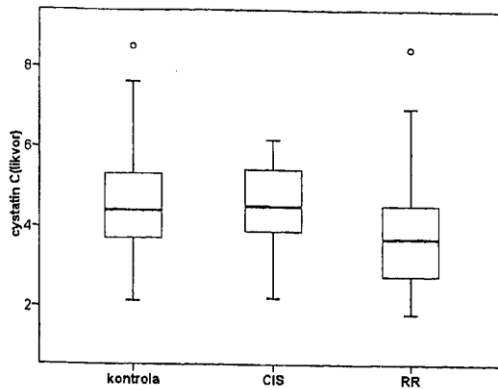


Figure 1 Box graph illustrating statistically significantly lower values of cystatin C in the RRMS group in comparison with controls and the CIS group.

using the number of oligoclonal IgG bands (OCBs) in the alkaline fraction in immunoelectrophoresis and using IgG quotient (QIgG).

Statistical analysis was performed using SPSS version 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Considering the non-normal distribution values of evaluated parameters, and the apparent presence of outlier values in the data, a non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparison among the three subject groups. Where the Kruskal-Wallis test was significant, a non-parametric Mann-Whitney test was subsequently used for a *post hoc* comparison between pairs of evaluated patient groups. Chi-square test was applied to categorical data. For correlation between disease duration or expanded disability status scale (EDSS) value and particular parameters, Spearman's rho was used. Significance level 0.05 was used for all the tests.

Results

Results are shown in Tables 2 and 3 and Fig. 1.

The RRMS patients, even those after CIS, showed decreased values of several inflammatory and degenerative markers compared to the control group, but none of the differences were statistically significant (inflammatory marker: transferrin; degenerative markers: beta-amyloid and ApoA-I, see also Table 3). Other non-significant changes included C3 and prealbumin (decreased in CIS), tau protein (decreased in RRMS), and NSE (increased in CIS and decreased in RRMS).

Intrathecal synthesis assessed by the QIgG was higher in RRMS than in controls ($P=0.008$, Mann-Whitney U-test) whereas in CIS, the QIgG was increased against controls, but not significantly ($P=0.278$, Mann-Whitney U-test).

CSF oligoclonal bands were significantly more numerous in both patient groups compared to controls, as expected (both $P<0.0001$, Mann-Whitney U-test). In contrast to the QIgG, the number of OCB was higher after CIS than in RRMS.

CSF levels of cystatin C were statistically significantly lower in RRMS patients compared to patients after CIS ($P=0.029$, Mann-Whitney test) and control group ($P=0.003$, Mann-Whitney test) as shown in Fig. 1.

Chi-square test demonstrated a statistically significantly lower proportion of patients with normal beta-amyloid values among RRMS patients (80%) compared to the control group (normal values in 95.2% patients) as shown in Table 2.

We found a positive correlation between the number of OCBs in CSF and EDSS value in patients after CIS.

Table 3 CSF levels of the investigated markers in RRMS patients, patients after CIS and controls

Marker	CIS		RRMS		Controls	
	Median	Mean ± SD	Median	Mean ± SD	Median	Mean ± SD
C3 (mg/l)	3.20	3.67 ± 1.43	3.20	4.04 ± 3.10	3.48	3.99 ± 1.64
C4 (mg/l)	1.44	1.82 ± 0.48	1.45	2.04 ± 1.62	1.48	1.84 ± 0.88
Haptoglobin (mg/l)	0.94	2.54 ± 2.64	1.10	2.51 ± 3.91	1.19	2.47 ± 2.68
Beta-2-microglobulin (mg/l)	0.90	0.91 ± 0.22	0.90	0.95 ± 0.30	0.90	0.95 ± 0.52
Alpha-1-antitrypsin (mg/l)	7.20	9.05 ± 6.10	7.11	9.20 ± 7.17	8.00	8.78 ± 4.06
Orosomucoid (mg/l)	4.48	6.22 ± 4.21	4.79	7.35 ± 9.03	5.25	6.24 ± 3.56
Transferrin (mg/l)	17.55	17.79 ± 4.88	16.65	17.87 ± 9.72	18.10	19.27 ± 7.87
Cystatin C (mg/l)	4.52	4.46 ± 1.19	3.71	3.85 ± 1.48	4.42	4.56 ± 1.32
Tau protein (ng/l)	235.00	218.85 ± 90.22	205.50	208.33 ± 98.06	215.00	257.63 ± 205.83
Beta-amyloid (ng/l)	843.92	845.28 ± 175.92	824.37	793.64 ± 271.28	857.16	891.68 ± 231.89
ApoA-I (mg/l)	3.10	3.71 ± 1.38	3.40	3.91 ± 1.69	4.10	4.58 ± 2.13
Apo-B (mg/l)	1.50	1.30 ± 0.46	1.50	1.87 ± 2.77	1.50	1.38 ± 0.34
NSE (µg/l)	10.42	10.70 ± 4.35	9.01	8.92 ± 3.57	9.63	9.25 ± 4.42
Prealbumin (mg/l)	17.20	18.10 ± 3.30	18.00	18.10 ± 2.60	17.70	19.70 ± 20.90
QIgG	3.15	6.29 ± 10.50	3.75	4.89 ± 3.78	2.80	3.56 ± 2.70
OCB number	6.00	9.40 ± 9.48	7.50	8.55 ± 6.10	0.00	0.39 ± 1.24

Note: Parameters showing significant differences among the groups are printed in bold.

Discussion

According to the literature, in the course of MS, the intensity of inflammation decreases, whereas the importance of degeneration in the pathogenesis of disease increases.⁵ It is assumed that values of CSF inflammatory or degenerative markers could be higher in a developed disease than those at disease onset. Therefore, we decided to assess multiple inflammatory and degenerative markers in the CSF in patients after CIS and patients with RRMS.

BBB integrity evaluated by prealbumin and Qalb values was normal or much slightly impaired, as it was expected.

QIgG, reflecting B-lymphocyte activity associated with intrathecal immunoglobulin synthesis, is elevated in about 70% of MS patients, but its elevation is not specific for MS.⁵ The finding of CSF OCB undetectable in the serum is a more sensitive as well as more specific test for intrathecal IgG production than positive QIgG. The presence of OCB provides a strong support for the diagnosis of MS and occurs in more than 95% MS patients.^{5,6} Intrathecal IgG synthesis seems to remain stable in course of disease, independent of treatment. Progression from monoclonal to an oligoclonal CSF pattern during the disease as described in the literature provides evidence for expanding B cell activity.⁶ In our studied groups, we found significantly higher intrathecal synthesis (as assessed by the QIgG) in RRMS patients compared to controls, whereas in the CIS patients, the QIgG was increased, but not significantly. OCBs were significantly more numerous in both patient groups compared to controls, as expected. A positive correlation between the number of OCB and EDSS value was found. It means that higher disease activity induces higher disability.

Complement system activation was studied through C3 and C4 factor evaluation. In a previous study, C3c factor elevation was demonstrated in more than 80% MS patients independently of disease duration.⁷ Another study reported a significant correlation between CSF concentration of the terminal complement complex and the level of disability.⁸ In our patient group, C3 and C4 values were not significantly different among the studied groups.

Transferrin quotient (CSF transferrin/serum transferrin concentration) decrease was described in MS patients in remission and in patients with short disease duration (0–2 years); in contrast, increased values were found in primary progressive MS.⁹ Transferrin is involved in the regulation of iron metabolism and may have a protective role against oxidative stress. Moreover, transferrin is an important growth factor for the proliferation of activated T lymphocytes.⁹ In our work, we did not assess transferrin quotient for technical reasons.

Nevertheless, we noted a decrease in transferrin CSF level in RRMS and a less pronounced decrease in the CIS group in comparison with controls, but not statistically significant (*see* Table 3). This finding corresponds with the expectation of lower transferrin index in patients with short disease duration.

Orosomuroid is a small molecule crossing the BBB and its concentration increases in malignant CNS processes (haemoblastosis and metastatic cancer). Increased CSF orosomuroid level occurs in about 50–60% of MS patients but only after several years of disease duration, without significant correlation with age.¹⁰ Decreased CSF orosomuroid level was found in patients in remission, whereas decreased serum level was observed in secondary progression in severely disabled MS patients.¹⁰ BBB permits this protein to pass due to its biological properties, not according to BBB permeability.¹¹ Our results were not different across the studied groups.

Beta-2-microglobulin is the light chain of class I antigen of the major histocompatibility complex and is present in all body fluids. This protein is located on the cell membrane surface, predominantly on lymphocytes, monocytes and macrophages. Its CSF concentration increases in serous infections, MS, haemoblastoses, strokes and HIV encephalopathies. It is considered a marker for disease activity in immune disorders, and also a marker of the effect of some drugs (interferon-beta and cladribine).^{12,13} Our data did not demonstrate increase in CSF levels of beta-2-microglobulin, perhaps resulting from a concentration gradient across the blood-CSF barrier.

Haptoglobin is a typical CSF inflammatory marker, the concentration of which increases in all inflammatory CNS diseases. In Rumbach *et al.*'s study, there were no differences in haptoglobin index (haptoglobin in CSF/haptoglobin in serum) among separate MS subgroups.¹⁴

Cystatin C belongs to the group of protease inhibitors. It has been found in the cytoplasm of neurons and in the other extracerebral localizations (adrenal medulla, thyroid gland, anterior pituitary lobe, and A cells of the pancreas). Its concentration in the CSF is 5.5 times higher than that in the serum and constitutes 2–4% of total CSF protein.¹⁵ In our study, we found statistically significantly lower value of cystatin C in RRMS, which may relate to intensive proteolysis during demyelination. The decrease in cystatin C concentration in MS could suggest proteinase system dysregulation, which could initiate, or promote myelin damage.¹⁶ That is why CSF cystatin C level could be a marker of demyelination intensity.^{16,17}

AAT is another protease (trypsin) inhibitor. It passes through the damaged BBB and its concentration positively correlates with Qalb. AAT concentration

increases in all CNS inflammatory diseases and in leukemic meningeal infiltrates. Its low CSF level in CNS infections suggests worse prognosis. AAT deficiency is genetically conditioned and may be one of the most common single-locus diseases worldwide.¹⁸ Lack of AAT leads predominantly to liver and lung diseases, and less often, it leads to vascular diseases. Reduction of AAT activity has been described in MS as well.¹⁹

Tau protein is considered to be important for maintaining the stability of axonal microtubules involved in the mediation of fast axonal transport of synaptic constituents.²⁰ Literature data are discrepant. Martínez-Yélamos *et al.*²² studied the relationship between CSF tau protein concentration and disability. They reported that patients with higher tau protein value manifest a more rapid one-point increase in the EDSS.²⁰ Other authors found positive correlations between tau protein and EDSS in RRMS and CIS.²¹ In this way, tau protein evaluation may help us to predict short-term outcome in patients with early RRMS.²² On the contrary, Guimarães reported that most MS patients have normal tau protein values.²³

Amyloid precursor protein is produced in reactive glial cells in response to several pathological stimuli.²⁴ It was found not only in active demyelinated lesions, but also in remyelinated and inactive demyelinated lesions. Amyloid precursor protein expression in damaged axons correlated with the number of macrophages and CD8-positive T lymphocytes within the lesions, as reported by histopathology of brain biopsy material.²⁵ CSF beta-amyloid concentration in MS patients was normal.²⁶

Similarly, NSE was investigated in the CSF of MS patients. A decreased concentration was found in CIS patients, which could indicate reduced neuronal metabolic activity in the early stage of MS.²⁶ In another study, a negative correlation between plasma NSE level and EDSS was described.²⁷ In our work, we actually noted somewhat higher mean value of CSF NSE in the CIS group, where lower EDSS was found, but this difference was not statistically significant.

Apolipoprotein CSF level is associated with tissue destruction in CNS. Apo-B level in the CSF is very low, although low-density lipoprotein receptors have been found on oligodendrocytes. Its measurement is very difficult, and only the use of highly sensitive time-resolved immunofluorometric assay was described. Intrathecal Apo-B synthesis in MS patients was assumed, but no evidence for it has been found. Therefore, all CSF Apo-B is probably of serum origin.²⁸ High-density lipoprotein (HDL)-associated ApoA-I is considered a specific inhibitor of cytokine production in monocyte-macrophages after their contact with stimulated T cells.²⁹ Its serum

concentration is about 25% lower during the acute phase of inflammatory diseases. The authors suggest that serum HDL-associated ApoA-I during acute inflammation may indicate the possibility of chronic inflammation development, i.e. individuals might develop chronic inflammatory disease after the acute infection. HDL-associated ApoA-I might be the missing link between infection and chronic inflammation.²⁹ Gelman *et al.* did not find alteration of ApoA-I CSF concentration.³⁰ We observed somewhat lower mean values of ApoA-I in CIS and RRMS groups in comparison with controls. Mean values of Apo-B were not different among groups.

Conclusions

In the spectrum of inflammatory and degenerative markers, differences were found in cystatin C levels and numbers of OCB between the groups of CIS and RRMS patients. Significantly lower cystatin C levels in RRMS patients compared to the CIS patients can demonstrate the development of inflammation to neurodegeneration in the pathogenesis of MS. Statistical analysis acknowledges that higher number of OCB indicates higher disease activity and consequently higher disability level.

Acknowledgement

This work was supported by the grant of the Ministry of Education (No. MSM 6198959216).

References

- 1 Kieseier BC. Assessing long-term effects of disease modifying drugs. *J Neurol* 2006;253:VI/23-VI/30.
- 2 Franciotta D. Biological markers in multiple sclerosis. *Int MS J* 2004;11:86-94.
- 3 Gonsette RS. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci* 2008;274:48-53.
- 4 Confavreux C, Vukusic S. Multiple sclerosis: a degenerative disease? *Bull Acad Natl Med* 2008;192:483-91.
- 5 Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006;180:17-28.
- 6 Peterit HF, Reske D. Expansion of antibody reactivity in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients – follow-up and clinical implications. *Cerebrospinal fluid Res* 2005;27:2-3.
- 7 Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Fundora-Hernández H, Noris-García E, Bu-Coifiu-Fanego R, González-Hernández M, *et al.* C3c intrathecal synthesis evaluation in patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2007;65:800-2.
- 8 Sellebjerg F, Jaliashvili I, Christiansen M, Garred P. Intrathecal activation of the complement system and disability in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;157:168-74.
- 9 Zeman D, Adam P, Kalistova H, Sobek O, Kelbich P, Andel J, *et al.* Transferrin in patients with multiple sclerosis: a comparison among various subgroups of multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2000;101:89-94.
- 10 Adam P, Sobek O, Taborsky L, Hildebrand T, Tutterova O, Zacek P. CSF and serum orosomucoid (alpha-1-glycoprotein) in patients with multiple sclerosis: a comparison among particular subgroups of MS patients. *Clin Chim Acta* 2003;334:107-10.
- 11 Adam P, Taborsky L, Sobek O. Proteinocytology of cerebrospinal fluid. Prague: Medica New Publisher; 2002.
- 12 Niezgoda A, Losy J, Mehta PD. Effect of cladribine treatment on beta-2-microglobulin and soluble intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with multiple sclerosis. *Folia Morphol* 2001;60:225-8.

- 13 Bagdato F, Zivadnov R, Cecchinelli D, Tancredi A, Grop A, Pierandini A, et al. Beta-2-microglobulin serum level is not marker of disease activity in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2004;11:455-60.
- 14 Rumbach L, Grucker M, Kiesmann M, Warter JM, Collard M. Biochemical analysis of the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: study of various formulas. *Pathol Biol* 1988;36:1217-20.
- 15 Mares J, Stejskal D, Vavrouskova J, Urbanek K, Herzig R, Hlustik P. Use of cystatin C determination in clinical diagnostics. *Biomed Pap* 2003;147:177-80.
- 16 Bollengier F. Cystatin C, alias post-gamma-globulin: a marker for multiple sclerosis? *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:589-93.
- 17 Nakashima I, Fujinoki M, Fujihara K, Kawamura T, Nakamura M, Itoyama Y. Alteration of cystatin C in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007;62:197-200.
- 18 De Serres FJ. Alpha-1-antitrypsin deficiency is not a rare disease but a disease that is rarely diagnosed. *Environ Health Perspect* 2003;111:1851-4.
- 19 Lolin YI, Ward AM. Alpha-1-antitrypsin phenotypes and associated disease patterns in neurological patients. *Acta Neurol Scand* 1995;91:394-8.
- 20 Jiménez-Jiménez FJ, Zunfo JM, Hernanz A, Medina-Acebrón S, De Bustos F, Barcenilla B, et al. Tau protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002;106:351-4.
- 21 Brettschneider J, Petzold A, Junker A, Tumani H. Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006;12:143-8.
- 22 Martínez-Yélamos A, Saiz A, Bas J, Hernandez JJ, Graus F, Arbizu T. Tau protein in cerebrospinal fluid: a possible marker of poor outcome in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2004;363:14-7.
- 23 Guimarães J. Tau protein seems not to be a useful clinical marker of axonal damage in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006;12:354-6.
- 24 Gehrman J, Banati RB, Cuzner ML, Kreutzberg GW, Newcombe J. Amyloid precursor protein (APP) expression in multiple sclerosis lesions. *Glia* 1995;15:141-51.
- 25 Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000;123:1174-83.
- 26 Hein Neé Maier K, Kohler A, Diem R, Sattler MB, Demmer I, Lange P, et al. Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2008;436:72-6.
- 27 Koch M, Mostert J, Heersema D, Teelken A, De Keyser J. Plasma S100beta and NSE levels and progression in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2007;252:154-8.
- 28 Osman I, Gaillard O, Meillet D, Bordas-Fonfrède M, Gervais A, Schuller E, et al. A sensitive time-resolved immunofluorometric assay for the measurement of apolipoprotein B in cerebrospinal fluid. Application to multiple sclerosis and other neurological diseases. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:53-8.
- 29 Burger D, Dayer JM. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev* 2002;1:111-7.
- 30 Gelman BB, Rifai N, Christenson RH, Silverman LM. Cerebrospinal fluid and plasma apolipoproteins in patients with multiple sclerosis. *Ann Clin Lab Sci* 1988;18:46-52.

7.2. Publikace č. 2 (přijato do tisku):

Sládková V, Mareš J, Hluštík P, Langová J, Kaňovský P. Intrathecal synthesis in particular types of multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2012; 156(1), IF₂₀₁₀ 0,716.

INTRATHECAL SYNTHESIS IN PARTICULAR TYPES OF MULTIPLE SCLEROSIS

Vladimira Sladkova^a, Jan Mares^a, Petr Hlustik^a, Jana Langova^b, Petr Kanovsky^a

^a *Department of Neurology University Hospital Olomouc, Czech Republic*

^b *Department of Biostatistics University Hospital Olomouc, Czech Republic*

Corresponding author: Vladimira Sladkova

E-mail address: sladkovav@centrum.cz

ABSTRACT

Aim: The aim of our study was to find any differences in intrathecal synthesis presented by IgG index and number of OCB among particular types of multiple sclerosis (MS).

Methods: There were examined 120 CSFs of 29 patients after CIS and 91 MS patients (77 patients with relapsing-remitting MS (RR), 6 patients with primary progressive course of disease (PP) and 8 patients in secondary progression (SP)), mean age 42 years (from 18 to 70 years). Albumin and IgG in serum and CSF was evaluated by nephelometry, consequently was counted albumin quotient (serum albumin/CSF albumin), IgG quotient (serum IgG/CSF IgG) and IgG index (IgG quotient/albumin quotient). Oligoclonal IgG bands (OCB) were assessed by means of isoelectric focusing (IEF) on agarose gel followed by immunoblotting. In all patients we determined Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS). All data were subjected to statistical analysis on significance level 0.

Results: Statistically significant differences among IgG index and OCB count in particular MS types were not found. Correlation between EDSS value and intrathecal synthesis presented by IgG index (QIgG/Qalbumin) and OCB count was not evidenced.

Conclusion: The differences in intrathecal synthesis presented by IgG index and number of OCB among particular types of MS were not confirmed.

Key words: Multiple sclerosis/Cerebrospinal fluid/Oligoclonal bands

INTRODUCTION:

MS is an autoimmune inflammatory disease of the central nervous system (CNS). There occurs autoimmune attack directed against the myelin sheath, which leads to demyelination and axonal loss¹. The inflammatory reaction in CNS in MS patients involves various components of immune system: B and T cells, macrophages, cytokines, antibodies or complement system¹. Immunoglobulins are produced by activated B-lymphocytes crossing brain-blood barrier. An elevation of CSF immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin index (IgG index) and the presence of the oligoclonal bands (OCB) in the CSF are characteristic for MS. But these findings are not specific only for MS². OCB can be found in inflammatory or chronic infection diseases of CNS³. Only 72% of MS patients present with increased IgG index and 98% of MS patients show an intrathecal OCB, which are not found in serum².

The aim of our study was to find any differences in intrathecal synthesis presented by IgG index and number of OCB among particular types of MS. We tried to answer the question if the intrathecal synthesis is different in the onset of disease and in the stage of developed MS.

GROUP AND METHODS:

We evaluated 120 CSFs of 29 patients after CIS and 91 MS patients. MS group consists of 77 patients with relapsing-remitting MS (RR), 6 patients with primary progressive course of disease (PP) and 8 patients in secondary progression (SP); mean age 42 years (from 18 to 70 years). The whole group of assessed patients included 89 female and 31 men (table 1).

CSF evaluation in MS patients was taken as a part of differential diagnostics. All patients signed an informed consent with a lumbar puncture. In each participant, about 15 ml of CSF was collected in glass tubes via lumbar puncture with an atraumatic needle using; and 15 ml of blood were drawn. The CSF was by 30 min. centrifuged (10 min., 1100g, 4 °C) and both serum and CSF were deep frozen (-20 °C). There were evaluated albumin and IgG in serum and CSF by nephelometry using commercially available kits, in certificated laboratory. Consequently was counted albumin quotient (serum albumin/CSF albumin) for blood-brain barrier (BBB) integrity appreciation and IgG quotient (serum IgG/CSF IgG). For intrathecal synthesis determination was used IgG index (IgG quotient/albumin quotient). Value of IgG index was higher than 0.7 means intrathecal IgG synthesis presence. Oligoclonal IgG bands were assessed in both compartments by means of isoelectric focusing (IEF) on agarose gel followed by immunoblotting. OCB number was lower than 2, considered as negative.

In all patients we determined Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS) before lumbar puncture procedure.

Statistical analysis was made by using SPSS version 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Considering the abnormal distribution the values of evaluated parameters, and the apparent presence of outlier values in the data, a non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparison among the subject groups. Where the Kruskal-Wallis test was significant, a non-parametric Mann-Whitney test was subsequently used for a post-hoc comparison between pairs of evaluated patient groups. Chi-square test was applied to categorical data. Significance level 0.05 was used for all the tests.

RESULTS:

The CIS patients were significantly younger than the other evaluated groups (P = 0.109 to RISM, P=0.0032 to PP, P=0.0030 to SP, ANOVA and LSD post-hoc test).

We did not find any statistically significant differences between IgG index and OCB count in particular MS types. Only mean and median of OCB count in PP was higher than in other MS types (mean in PP =13.0, median =12.5; mean in CIS= 10.1, median = 7.0; mean in RR = 8.97, median = 8.0; mean in SP = 8.88, median = 8.0). EDSS in CIS patients was significantly lower than in the others groups. We did not find any correlation between EDSS value and intrathecal synthesis presented by IgG index (QIgG/Qalbumin) and OCB count.

DISCUSSION:

The discovering of the OCB in cerebrospinal fluid (CSF) was a major step forward in the understanding of MS and the other inflammatory diseases of CNS. The key observation that leads to the discovery of OCB can be dated in 1942, when Kabat described an elevated gamma globulin in CSF of MS patients. Subsequently in 1959, Karcher, van Sande and Lowenthal reported that agar electrophoresis subdivided CSF gamma-globulins from a patient with subacute sclerosing panencephalitis^{4,5}. From year 1986, it is routinely used for OCB detection in CSF a method of isoelectric focusation on agarose gel with immunoblotting⁵. OCB assessment in the CSF is currently important in the MS diagnosis; their presence supports this diagnosis as they are not found in the serum⁶.

According to the revised McDonald criteria, the presence OCB in CSF or IgG index elevation is one of the conditions for MS diagnosis determination⁷.

In our expectation, there are not any differences in intrathecal synthesis represented by IgG index and OCB count CNS after first clinical manifestation of MS and in stage of developed disease after many years of duration. The observation confirms the presence of inflammation in the CNS from the onset of disease and through the whole disease duration. Higher number of OCB in CSF of primary progressive patients in our group is apparently small numbers mistake.

Koch and all did not find in their work any differences in the presence or number of CSF OCB between patients with stable RRMS and SP patients with significant worsening of disability⁸. In our work from year 2008, we did not find any correlation between the IgG index values and the OCB count in the CSF of MS patients³.

As we note, we did not find any correlation between levels of disability presented by EDSS and intrathecal synthesis as an inflammatory marker. These results can support the literary data that the level of disability is caused by an advanced neurodegeneration and axonal loss but not by the intensity of inflammation. Similar, patients after CIS had lower EDSS score due to short disease duration.

CONCLUSION:

We did not find any statistically significant differences between IgG index and OCB count in particular MS types. We did not record any correlation between EDSS value and intrathecal synthesis presented by IgG index (QIgG/Qalbumin) and OCB count.

ABBREVIATIONS:

CIS, Clinical isolated syndrome; CNS, Central nervous system; CSF, Cerebrospinal fluid; EDSS, Expanded Disability Status Scale; IEF, Isoelectric focusing; IgG, Immunoglobulin G; MS, Multiple sclerosis; OCB, Oligoclonal bands; PP, Primary progressive multiple sclerosis; RR, Relapsing – remitting multiple sclerosis; SP, Secondary progressive multiple sclerosis

ACKNOWLEDGEMENT: This work was supported by the grant of the Ministry of Education no. MSM 6198959216.

REFERENCES:

1. Kuenz B, Lutterotti A and coll. Cerebrospinal fluid B Cells Correlate with Early Brain Inflammation in Multiple Sclerosis. *PloS One*, 2008; 3(7):2559
2. Petereit H-F, Reske D. Expansion of antibody reactivity in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients – follow-up and clinical implications. *Cerebrospinal fluid Res* 2005;2:3
3. Mares J and coll. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky University Czech Rep.* 2008, 152(2):247-249
4. Holmøy T. The Discovery of Oligoclonal Bands: A 50-Year Anniversary. *Eur Neurol* 2009;62:311-315
5. Rammohan K W. Cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol* 2009;12(4): 246-253
6. Freedman M, Thompson E, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CH, Sellebjerg F, Tourtellotte WV. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Arch Neurol* 2005;62:865-870
7. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the „McDonald criteria“. *Ann Neurol*. 2005;58: 840-6
8. Koch M, Heersema D, Mostert J, Teelken A, De Keyser J. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2007;14(7):797-800

Table 1. Patient group characteristics

Group	Sex (proportion)		Total	Mean age (years)		Overall (years)
	F	M		F	M	
	CIS	23 79.3%		6 20.7%	29	
RR	56 72.7%	21 21.3%	77	41.33 38.99	40.47	
SP	7 87.5%	1 12.5%	8	47.18 48.24	47.88	
PP	3 50.0%	3 50.0%	6	51.47 48.5	49.50	
Total	89 74.2%	31 25.8%	120	41.52 42.00	41,92	

Table 2. IgG indexes, OCB and EDSS in particular MS forms.

MS type		CIS	RR	SP	PP
count		29	77	8	6
IgG index	median	0.705	0.780	1.14	1.24
	mean	1.006	0.948	1.067	0.974
	St. deviation	0.549	0.377	0.367	0.375
	< 0.7	15 (51.7%)	24 (31.2%)	3 (37.5%)	2 (33.3%)
	> 0.7	14 (49.3%)	53 (69.8%)	5 (63.5%)	4 (66.6%)
OCB(count)	median	7.0	8.0	8.0	12.5
	mean	10.1	8.97	8.88	13.0
	St. deviation	8.962	6.537	5.54	7.321
	< 2	3 (10.3%)	14 (18.2%)	1 (12.5%)	1 (16.7%)
	≥ 2	26 (89.7%)	61 (81.8%)	7 (87.5%)	5 (83.3%)
EDSS	median	1.0	2.0	6.0	4.75
	mean	0.79	2.01	5.75	4.83
	St. deviation	0.911	1.339	1.626	2.137

7.3. Publikace č. 3 (přijato do tisku):

Sládková V, Mareš J, Kaňovský P. Vyšetření mozkomíšního moku u RS. *Neurologia* 2012; 7(1). Přijato do tisku.

Vyšetření mozkomíšního moku u roztroušené sklerózy.

MUDr. Vladimíra Sládková¹, doc. MUDr. Jan Mareš, PhD. ¹, prof. MUDr. Petr Kaňovský, CSc.¹

¹ Neurologická klinika FN a LF UP Olomouc

Kontaktní adresa: MUDr. Vladimíra Sládková

Neurologická klinika FN a LF UP Olomouc

I.P. Pavlova 6

775 20 Olomouc

Tel. +420 585 853 436

Fax. +420 585 883 436

e-mail: sladkovav@centrum.cz

Souhrn

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je chronické zánětlivé demyelinizační onemocnění CNS s prevalencí v našich zemích 80-130 nemocných na 100 000 obyvatel. Patří mezi autoimunitní onemocnění vedoucí k demyelinizaci nervových vláken a jejich následné ztrátě. Podle McDonaldových diagnostických kritérií publikovaných v roce 2001 a jejich revidované verze z roku 2005 byly kromě klinického vyšetření základními metodami ke stanovení diagnózy RS analýza mozkomíšního moku a MR zobrazení. Přestože podle revidované verze McDonaldových diagnostických kritérií likvorové vyšetření již není ke stanovení diagnózy RS nutné, stále zůstává nezbytným v diferenciálně diagnostické rozvaze. K základním likvorologickým vyšetřením patří kvantitativní a kvalitativní cytologie, základní biochemické vyšetření, posouzení stavu hemato-likvorové bariéry (HLB), vyšetření intratekální syntézy IgG a stanovení počtu oligoklonálních IgG pásů (OCB). Spektrum vyšetření lze doplnit tzv. MRZ reakcí neboli stanovením intratekální syntézy specifických IgG protilátek proti neurotropním virům (viru spalniček, rubeola-zoster, zarděnek a herpes viru I) a stanovením hladin některých zánětlivých či neurodegenerativních markerů.

Klíčová slova: roztroušená skleróza mozkomíšní, mozkomíšní mok, intratekální syntéza, oligoklonální pásy

Úvod

Podle McDonaldových diagnostických kritérií publikovaných v roce 2001 a jejich revidované verze z roku 2005 je analýza mozkomíšního moku spolu s MR zobrazením a vyšetřením evokovaných potenciálů základní vyšetřovací metodou sloužící k diagnostice roztroušené sklerózy mozkomíšní (RS). Vzhledem k tomu byl světově uznávanými odborníky na problematiku RS vytvořen panel laboratorních likvorových vyšetření nezbytných k diagnostice či diferenciální diagnostice RS. Cílem bylo sjednotit spektrum dosud vyšetřovaných parametrů a používaných metod, a tak minimalizovat pravděpodobnost falešně pozitivní diagnózy RS. Likvorologické vyšetření by mělo být prováděno pouze v certifikovaných laboratořích pracovníky s určitou zkušeností s použitými technikami. K nezbytným vyšetřením patří kvantitativní a kvalitativní cytologie, základní biochemické vyšetření, posouzení stavu hemato-likvorové bariéry (HLB), vyšetření intratekální syntézy IgG a stanovení počtu oligoklonálních IgG pásů (OCB) (1). Spektrum vyšetření doplňuje tzv. MRZ reakce neboli stanovení intratekální syntézy specifických IgG protilátek proti neurotropním virům (viru spalniček, rubeola-zoster, zarděnek a herpes viru I) a stanovení hladin některých zánětlivých či neurodegenerativních markerů (2).

Cytologie

Protože buněčné elementy v likvoru (CSF) podléhají velmi rychle destrukci, je nutné dle doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP provést cytologické vyšetření do 3 hodin po odběru. Používá se nativní, necentrifugovaný likvor (3). Počet elementů se stanovuje ve Fuchs-Rosenthalově komůrce o objemu 2,88 μl (3,2 mm^3) a dříve udávaný zlomek/3 je nahrazen počtem elementů v 1 μl . Za normu je považován počet 5 buněčných elementů v 1 μl . U nemocných s RS obvykle nacházíme mírnou pleiocytózu, tj. 20-30 / mm^3 , asi 2 % nemocných s RS vykazuje počet elementů vyšší než 40 / mm^3 . Hodnota přesahující 90 elementů / mm^3 diagnózu RS prakticky vylučuje (4). Ke kvalitativnímu zhodnocení preparátu se pro malý počet elementů v CSF provádí jeho koncentrace např. Saykovou cytosedimentační metodou, cytocentrifugační metodou nebo izolací buněčných elementů přes membránové filtry. Následně se barví podle Maye-Grünwalda-Giemsy-Romanowského. U RS může být likvorový obraz zcela normální. V období ataky může být přítomen obraz serózního zánětu s lymfomonocytární oligocytózou. Nacházíme aktivované formy lymfocytární i monocytární řady: plasmocyty, lymfoblasty nebo buňky tvaru „pečetního prstenu“ (3). Pro RS

jsou typické především plazmatické buňky s excentricky uloženým jádrem, kondenzovaným chromatinem, perinukleárním projasněním a bazofilní cytoplazmou (4).

Základní biochemické vyšetření

Při základním biochemickém vyšetření nacházíme normální či lehce zvýšenou proteinorachii, která může mít původ v poruše hemato-likvorové bariéry nebo v intratekální syntéze (4,5). Glykorachie a koncentrace chloridů zůstává v normě (5).

Funkce hemato-likvorové bariéry

Hemato-likvorovou bariéru tvoří endotel kapilár pia mater a chorioideálních plexů. Jedná se o dynamický systém umožňující transport celé řady látek. Ionty či nízkomolekulární látky procházejí za pomoci iontové pumpy, pro určité látky (např. aminokyseliny) existují specifické transportní proteiny (5). Přenos proteinů probíhá prostřednictvím difúze. Zvýšení koncentrace určitého proteinu v séru tedy vede k jeho elevaci i v likvoru, přičemž poměr koncentrace tohoto proteinu v CSF a séru zůstává konstantní (4).

Funkci hematolikorové bariéry posuzujeme pomocí tzv. albuminového kvocientu Q_{alb} , který je poměrem hodnoty albuminu v likvoru k albuminu v séru. Kvocient albuminu je hodnota věkově závislá. Do 15 let věku je jeho hodnota menší než 5×10^{-3} , do 40 let $\leq 6,5 \times 10^{-3}$ a do 60 let $\leq 8 \times 10^{-3}$. Albumin se do CSF vždy dostává přestupem přes HLB ze séra, takže každé zvýšení koncentrace albuminu, a tedy i kvocientu albuminu znamená poruchu HLB (4). U RS zůstává její funkce zachována, v době ataky může být lehce porušena, hodnota Q_{alb} pak je $7-10 \times 10^{-3}$ (3).

Intratekální syntéza IgG, IgA, IgM

Rozhodující pro stanovení diagnózy RS je průkaz intrathekální syntézy IgG a přítomnost oligoklonálních IgG pásů (OCB) metodou isoelektrické fokusace a imunofixace. Intrathekální syntéza IgG v CNS pochází z perivaskulárních infiltrátů lymfocytů B, které vyvráždí v plazmocyty a produkují specifické Ig. Na rozdíl od séra, kde během imunitní odpovědi dochází k přechodu syntézy IgM v IgG v subakutní či chronické fázi reakce, intrathekálně není tato reakce patrná. Poměry hodnot v třídách IgG/IgM/IgA zůstávají od počátku onemocnění konstantní, protože jsou patrně vyvolány určitým specifickým agens. Tato jistá heterogenita imunitní odpovědi je vysvětlována teorií imunitní sítě, kdy imunitní reakce na určité agens vyvolá změny v celé imunitní síti. Po aktivaci imunitního systému CNS pak

intratekální syntéza přetrvává i bez přítomnosti vyvolávajícího agens (3). V minulosti se k výpočtu intratekální syntézy používal Linkův index nebo Tourtellotova formule s lineární závislostí mezi Q_{alb} , který charakterizuje funkci HLB, a Q_{IgG} udávajícím intratekální syntézu IgG. Byly ovšem zatíženy falešnou pozitivitou při střední a vyšší poruše HLB (4). Proto se všeobecně užívá Reiberova diagramu popisujícího hyperbolickou závislost mezi Q_{IgG} a Q_{alb} . Vertikální linie udává věkově závislé referenční rozmezí hodnot Q_{alb} a hyperbola rozděluje referenční hodnoty pro IgG pocházející ze séra (pod linií) a syntetizované intratekálně (nad linií). Viz obrázek 1 (6,7). Obdobně se stanovují i indexy IgM a IgA. Intratekální syntézu potvrzují hodnoty $IgG > 0,7$, $IgM > 2,4$ a $IgA > 1,2$ (3). U jednotlivých chorob se procentuální zastoupení jednotlivých tříd IgG liší, např. IgG dominují v časně fázi bakteriální a virové meningitidy, u polyradikuloneuritidy Guillain-Barré, RS, neurosyfylyis a chronické HIV encefalitidy, IgA převažují u neurotuberkulózy, mozkového abscesu a adrenoleukodystrofie, IgM u neuroborreliózy a non-Hodgkinsého lymfomu. Ke zvýšení všech tříd IgG dochází u oportunních infekcí (CMV, toxoplazmózy) (6).

Metodou IEF je kromě oligoklonální produkce imunoglobulinů možné stanovit přítomnost volných řetězců kappa a lambda, což je velmi důležité v diferenciálně diagnostické rozvaze. Senzitivita průkazu oligoklonálních IgG u pacientů s RS je 95 % (4). Průkaz lehkých řetězců je méně senzitivní (92%), je ovšem velmi důležitý, protože u některých nemocných nedochází k syntéze oligoklonálních IgG, ale pouze lehkých řetězců kappa (1). Naproti tomu izolovaný nález lehkých řetězců lambda bez přítomnosti IgG OCB je nespecifický a může spíše hovořit proti diagnóze RS (2). U RS je vyskytuje intratekální syntéza IgG u 72 % nemocných, syntéza IgM u 20 % a IgA u 9 % nemocných (4).

Oligoklonální IgG pásy

Pokud je prokázána intratekální syntéza kvantitativně, vyšetření pokračuje kvalitativním stanovením oligoklonálních subtraktů γ -globulinů v likvoru i séru metodou izoelektrické fokusace na agarovém gelu s následným stříbřením, imunofixací či imunoblottingem. Poprvé byla tato metoda průkazu OCB u pacientů s RS popsána v roce 1957 Karcherem a kol. (Antwerpy, Belgie). Prováděli elektroforézu na agarovém gelu spolu se stříbřením, které bylo v roce 1986 nahrazeno imunoblottingem (8). Za pozitivní nález prokazující intratekální syntézu je nález 2 a více OCB, které se u RS nacházejí většinou v alkalické frakci elektroforetického pole (4). V roce 1994 bylo na základě mezinárodního konsenzu stanoveno 5 základních vzorců OCB (2,3,4). Viz obrázek 2.

- Vzorec 1: normální likvor (bez průkazu OCB v likvoru a v séru)
- Vzorec 2: OCB v likvoru, které nejsou v séru (RS)
- Vzorec 3: OCB v obou kompartmentech a navíc OCB v likvoru (u neuroborreliózy, event. u RS)
- Vzorec 4: identické OCB v likvoru i v séru (paraneoplastické syndromy, systémový lupus erythematoses)
- Vzorec 5: monoklonální pásy v likvoru i v séru (monoklonální gamapatie – např. mnohotný myelom)

U pacientů s RS nacházíme převážně OCB vzorec 2, méně často vzorec 3. Ovšem OCB nacházíme v likvoru a séru i u jiných chorob, např. u infekcí, autoimunitních či systémových onemocnění (4).

Vyšetření OCB u pacientů s klinicky izolovaným syndromem (CIS) má rovněž prediktivní charakter. Výskyt OCB u nemocných s CIS zdvojnásobuje riziko další ataky a rozvoje RS nezávisle na nálezů na MR, nemá ovšem vliv na tíži neurologického deficitu (9).

MRZ reakce

MRZ reakce je doplňkovým likvorovým vyšetřením k časně diagnostice autoimunitních onemocnění. Jedná se o detekci specifických IgG protilátek proti neurotropním virům spalniček (morbilli), zarděnek (rubeola) a planých neštovic (herpes zoster) metodou ELISA. K odlišení protilátek, které přestoupily ze séra přes porušenou hemato-likvorovou bariéru, se stanovuje protilátkový index AI, který je poměrem koncentrace dané protilátky v likvoru ku koncentraci této protilátky v séru. Jeho normální hodnota je 1,0 a referenční rozmezí 0,7 – 1,3. Hodnota $AI > 1,4$ je známkou intrathekální syntézy dané protilátky (3). Pozitivita kombinované MRZ reakce, tj. přítomnost intratekální syntézy protilátek proti jednomu, dvěma nebo všem třem neurotropním virům, podporuje především diagnózu RS, kde je popisována u 84 – 94 % pacientů. Literatura uvádí pozitivitu protilátek proti spalničkám u 78 % nemocných s RS, protilátky proti zarděnkám u 60 % a proti varicela-zoster viru u 55 % nemocných. Vysoká pozitivita reakce je uváděna i u dalších autoimunit, např. u Sjögrenova syndromu, systémového lupusu či Wegenerovy granulomatózy. Naproti tomu u jiných zánětlivých afekcí, např. neuroborreliózy, neurosyfilis nebo neurotuberkulózy, je

kombinovaná MRZ reakce pozitivní pouze v 0,1 % případů (3, 6). Kromě výše uvedených protilátek se u pacientů s RS udává vyšší koncentrace protilátek proti herpes viru I (u 28 % nemocných) (6).

Specifické markery zánětu či neurodegenerace

Ve specializovaných laboratořích lze provádět vyšetření specifických likvorových markerů, pomocí kterých lze posoudit aktivitu onemocnění, stupeň neurodegenerace nebo predikovat průběh onemocnění.

Patří sem:

- neuronální protilátky
 - protilátky proti myelinu - protilátky proti myelin-bazickému proteinu (anti-MBP), protilátky proti myelinovému oligodendrocytárnímu glykoproteinu (anti-MOG), proteolipidový protein, glykoprotein sdružený s myelinem, 2', 3'-cyklická nukleotid 3' - fosfodiesteráza
 - protilátky proti axonům - protilátky proti neurofilamentům : lehkým (light-NFL), středním (medium-NFM) a těžkým (heavy-NFH)
- zánětlivé markery – transferin, ferritin, prealbumin, orosomucoid, C-reaktivní protein, C3 a C4 složky komplementu, beta-2-mikroglobulin
- markery destrukce – apolipoproteiny A a B, cystatin C
- cytokiny – interleukin 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12
- strukturální proteiny CNS – protein 14-3-3, neuron-specifická enoláza (NSE), protein S-100b, tau-protein, fosforylovaný tau-protein, beta-amyloid (2, 4), gliální fibrilární kyselý protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP), N-acetylaspartát (10,11)

Myelinový bazický protein (MBP) je základní strukturální protein vnitřní strany myelinové pochvy, který je jedním z hlavních cílů imunitní odpovědi u RS. U nemocných s RS dochází v důsledku poškození myelinu k elevaci jeho hladiny v CSF, současně stoupá i koncentrace anti-MBP protilátek (3). Zvýšená hladina MBP obecně provází všechny jednotky, kde probíhá poškození myelinu, tj. traumata, cerebrovaskulární onemocnění či rozsáhlejší postižení bílé hmoty mozkové. Tudíž stanovení hladiny MBP u RS nemá diferenciálně diagnostický význam. Vzhledem k tomu, že jeho hladina stoupá v období atak, může být markerem aktivity onemocnění (8).

Myelinový oligodendrocytární glykoprotein (MOG) tvoří zevní část myelinové pochvy a je dalším důležitým substrátem humorální imunity u RS (3). Recentní studie potvrzují, že je významným autoantigenem především u dětské ADEM. Zde až 40 % nemocných vykazuje anti-MOG protilátky v séru na rozdíl od CIS či RS, kde jsou relativně vzácné. Význam průkazu MOG a anti-MOG protilátek tkví hlavně v rovině teoretické, jejich praktický význam je ovšem malý (12).

Další oblastí zájmu je vyšetření koncentrace lehkých (light–NFL), středních (medium–NFM) nebo těžkých (heavy–NFH) řetězců **neurofilament** (NFL), základních stavebních jednotek axonů. Uvolňují se do likvoru při poškození axonu a iniciují tvorbu protilátek ve třídách IgG, IgM i IgA (3). Četné studie popisují zvýšení hladiny light–NFL v likvoru většiny pacientů s remitující-relabující formou RS (8), která ovšem nekoreluje s progresí nebo úrovní klinického deficitu, takže postrádá prediktivní hodnotu (13). Anti-NFL protilátky se nacházejí i v séru pacientů s RS na rozdíl od ostatních neurologických onemocnění. To je patrně způsobeno přechodem cytoskeletálních proteinů z poškozených axonů do extracelulárního prostoru při dysregulaci imunitního systému, což by mohlo být nálezem specifickým pro RS (14).

Ferritin se nachází v oligodendrocytech, kde se podílí na formování myelinu a na procesu oxidativní fosforylace (15). V případě jakéhokoli stresu jeho syntéza v oligodendrocytech stoupá a uvolňuje se do mozkomíšního moku a plazmy. Vyšší hodnoty ferritinu v likvoru jsou popisovány u pacientů s aktivní chronicko-progredientní formou RS (16). Hladina **transferinu**, tzn. transportního proteinu, bývá naopak snížena, což potvrzují proteomická vyšetření likvoru (17). **Orosomuroid** je malá molekula patřící do skupiny onkomarkerů. Její koncentrace roste především u malignit CNS (hemoblastózy, metastázy). Vyšší hodnoty orosomuroidu v CSF jsou popisovány u 50 – 60 % pacientů s RS po mnoha letech onemocnění, naopak snížení jeho hladiny bylo pozorováno u pacientů v remisi. Nízké sérové hladiny mívají těžce postižení pacienti v sekundární progresi (18). **C-reaktivní protein** (CRP) je protein akutní fáze, k jehož elevaci dochází při jakékoli infekci CNS, a nemá tudíž větší pro RS diagnostickou hodnotu. **Komplementové proteiny** jsou nespecifickými mediátory humorální imunity a podílí se na patogenezi RS. Komplementový systém funguje jako kaskáda vedoucí k vytvoření membránového útočného komplexu, který způsobuje lýzu buňky. Další funkcí komplementu je opsonizace mikroorganismů pro fagocytózu, chemotaktické přitahování leukocytů do oblasti zánětu, likvidace imunokomplexů a indukce specifické imunitní odpovědi usnadněním lokalizace antigenů B-buňkami a antigen-

prezentujícími buňkami (5). V literatuře je u všech forem RS popisováno zvýšení hladiny C3 a C4 složky komplementu v séru i likvoru, což ukazuje na jejich systémový i centrální původ (19). **Beta-2-mikroglobulin** je lehký řetězec HLA I. třídy, který je vázán na povrchu buněčných membrán především lymfocytů, monocytů a makrofágů a lze detekovat ve všech tělních tekutinách. Jeho koncentrace roste u serózních infekcí, RS, hemoblastóz, iktu nebo HIV encefalopatie. Je považován za marker aktivity imunitních onemocnění, u RS tato skutečnost ovšem není potvrzena (20). Zvýšení hladin apolipoproteinů v likvoru je všeobecně považováno za známku tkáňové destrukce. **APO-B** je nízkodenzitní lipoprotein s receptorem na oligodendrocytech. Jeho hladina v CSF je velmi nízká a je pravděpodobně sérového původu (21). Vysokodenzitní lipoprotein **APO-AI** je považován za specifický inhibitor produkce cytokinů monocytů a makrofágy po jejich kontaktu s aktivovanými T-lymfocyty. Jeho sérová koncentrace v akutní fázi zánětu klesá až o 25 %. Tento pokles v likvoru nebyl pozorován (22). **Cystatin C** patří do skupiny inhibitorů proteáz a nachází se v cytoplazmě neuronů, buněk nadledvinek, štítné žlázy, A- buněk pankreatu a adenohipofýzy. Jeho koncentrace v likvoru je 5,5 x vyšší než v séru a tvoří 2-4 % proteinů CSF. U RS pozorujeme pokles jeho hladiny v CSF. To může být důkazem dysregulace systému proteináz, která by mohla iniciovat poškození myelinu. Proto by cystatin C mohl být markerem intenzity demyelinizace (23). **Interleukiny** jsou prostředky mezibuněčné komunikace a fungují jako aktivátory či inhibitory zánětu. Ke změnám jejich koncentrací dochází u celé řady zánětlivých i degenerativních onemocnění CNS (2). **14-3-3 protein** je nitrobuněčný protein účastnící se nitrobuněčného přenosu signálu, dělení a růstu buněk, adheze či apoptózy. Při poškození buňky dochází k jeho uvolnění o CSF, proto jeho koncentrace stoupá především u neurodegenerací. Dle některých zveřejněných prací dochází k jeho elevaci i u aktivních forem RS, což by mohlo být známkou poškození axonů či neuronů (24). **Neuron-specifická enoláza (NSE)** je glykolytický enzym vyskytující se v tkáních neuroektodermového původu, v nervové tkáni tvoří 2 % cytoplazmatických proteinů. K jeho elevaci v CSF dochází po úrazech nervové tkáně. V séru bývá zvýšen u malignit (melanomu, tumorů plic, ledvin,..), takže je významným tumormarkerem (25). U RS bylo zaznamenáno snížení koncentrace NSE v likvoru, které může indikovat sníženou metabolickou aktivitu neuronů (26). **Protein S-100** je strukturální protein exprimovaný převážně astrocyty, ale také melanomy. Jeho koncentrace stoupá při mozkových kontuzích, subarachnoideálním krvácení, RS a některých neuroinfekcích (3). **Tau-protein** je strukturální protein důležitý pro udržení stability axonálních mikrotubulů umožňující rychlý axonální transport. Za normálních okolností je jeho koncentrace v likvoru velmi nízká. Vzestup jeho koncentrace je typický pro neurodegenerativní onemocnění,

především Creutzfeldt-Jacobovu chorobu, Alzheimerovu demenci a další tauopatie. U nemocných s RS bývá většinou v normě, některé studie uvádějí vyšší hodnoty u primárně či sekundárně progredientní formy (24). **Beta-amyloid** vzniká patologickým štěpením amyloidového prekurzorového proteinu, který je součástí buněk, převážně buněčných membrán. Není dále metabolicky zpracovatelný, hromadí se v extracelulárním prostoru a je součástí amyloidových plak, v jejichž blízkosti dochází k zániku synapsí a degeneraci neuronů. Pokles jeho koncentrace v CSF je typický pro Alzheimerovu demenci. U RS bývají jeho hodnoty v normě. **Gliální fibrilární kyselý protein** (GFAP) je tvořen astroglíí a v likvoru se nachází ve velmi nízké koncentraci. Některé práce uvádějí jeho mírnou elevaci u RS, což by mohlo opět souviset s poškozením axonů (10). **N-acetylaspartát** je produkován mitochondriemi axonů a v případě jejich poškození jeho produkce klesá. Proto by dle publikovaných prací mohl být časným markerem axonálního poškození (27).

Závěr

Závěrem lze říci, že zlatým standardem likvorové analýzy při podezření z RS je kromě provedení kvalitativní a kvantitativní cytologie a posouzení integrity hemato-likvorové bariéry především výpočet intratekální syntézy IgG a stanovení oligoklonálních IgG páسů v likvoru i séru. Další parametry mají zatím spíše experimentální význam.

Literatura

1. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F et al. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. A consensus statement. Arch Neurol 2005; 62: 865-870
2. Sobek O, Adam P, Kelbich P et al. Vyšetření likvoru – současné možnosti. Neurol. pro praxi 2009; 10(5): 80-284
3. Kala M, Mareš J. Lumbální punkce a mozkomíšní mok. Galén 2008: 82-97
4. Bednářová J, Adam P. Likvorový profil u roztroušené sklerózy mozkomíšní. Neurol. pro praxi 2002; 5 : 249-251
5. Havrdová E. Neuroimunologie. Maxdorf 2001: 53
6. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J of Neurol Sci 2001; 184: 101–122
7. Roztroušená skleróza. In: Wikiskripta. 2011. Dostupné z WWW:

<http://www.wikiskripta.eu/index.php/>

8. Rammohan KW. Cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Ann Indian Acad. Neurol.* 2009; 12(4): 246-253
9. Tintore M, Rovira A, Rio J et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first Attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 2008; 70: 1079-83
10. Avsar T, Korkmaz D, Tütüncü M et al. Protein biomarkers for multiple sclerosis: semi-quantitative analysis of cerebrospinal fluid candidate protein markers in different forms of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012; Epub ahead of print
11. Harris VK, Sadiq SA. Disease biomarkers in multiple sclerosis: potential for use in Therapeutic decision making. *Mol Diagn Ther.* 2009; 13(4): 225-244
12. Olsson T. Role of anti-MOG antibodies in demyelinating diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 2011; 7: 248-249
13. Axelsson M, Malmeström C, Nilsson S et al. Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 2011; 258(5): 882-888
14. Fialová L, Bartoš A, Soukupová J et al. Synergy of Serum and Cerebrospinal Fluid Antibodies Against Axonal Cytoskeletal Proteins in Patients with Different Neurological Diseases. *Folia Biol (Praha)* 2009; 55(1): 23-26
15. Sfagos C, Makis AC, Chaidos A, Hatzimichael EC, Dalamaga A, Kosma K, Bourantas KL. Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2005; 11(3): 272-275
16. LeVine SM, Lynch SG, Ou CHN, Wulser MJ, Tam E, Boo N. Ferritin, transferrin and iron concentration in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Brain Res.* 1999; 821(2): 511-515
17. Harris VK, Diamanduros A, Good P, Zakin E, Chalivendra V, Sadiq SA. Bri2-23 is a potential cerebrospinal fluid biomarker in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2010; 40(1): 331-339
18. Adam P, Sobek O, Táborský L et al. CSF and serum orosomucoid (alpha-1-glycoprotein)

- in patients with multiple sclerosis: a comparison among particular subgroups of MS patients. *Clin Chim Acta* 2003; 334(1-2): 107-110
19. Ingram G, Hakobyan S, Hirst C et al. Systemic komplement profilig in multiple sclerosis as a biomarker of disease state. *Mult Scler.* 2012; Epub ahead of print
 20. Bagdato F, Zivadinov R, Cecchinelli D et al. Beta2-microglobulin serum level is not marker of disease activity in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2004; 11(7): 455-60
 21. Osman I, Gaillard O, Meillet D et al. A sensitive time-resolved immunofluorometric assay for the measurement of apolipoprotein B in cerebrospinal fluid. Application to multiple sclerosis and other neurological diseases. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*1995; 33(1): 53-58
 22. Burger D, Dayer JM. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev.* 2002; 1(1-2): 111-117
 23. Bollengier F. Cystatin C, alias post-gamma-globulin: a marker for multiple sclerosis? *J Clin ChemClin Biochem.*1987; 25(9): 589-593
 24. Gajofatto A, Bongianini M, Zanusso G et al. Are Cerebrospinal Fluid Biomarkers Useful in Predicting the Prognosis of Multiple Sclerosis Patients? *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12: 960-7970
 25. Neuron specifická enoláza. In: *Velký lékařský slovník.* Dostupné z WWW: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/neuron-specificka-enolaza-zkr-nse-4>
 26. Hein Neé Maier K, Kohler A, Diem R et al. Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indikative for multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2008; 436(1): 72-76
 27. Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M et al. Combination of CSF N-acetylaspartate

And neurodilament in multiple sclerosis. Neurology 2009; 72(15): 1322-1329

Obrázek 1. Reiberův diagram

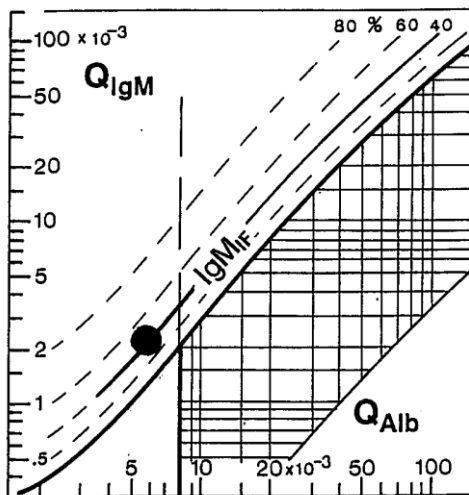
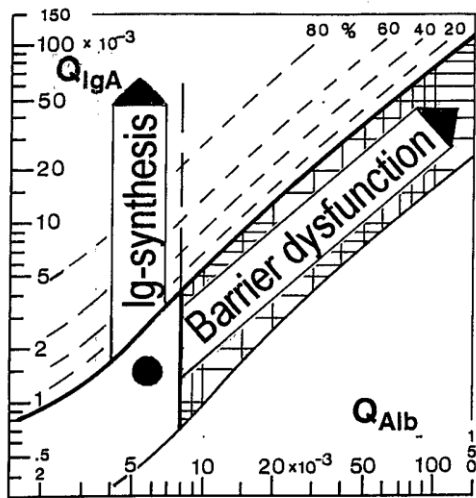
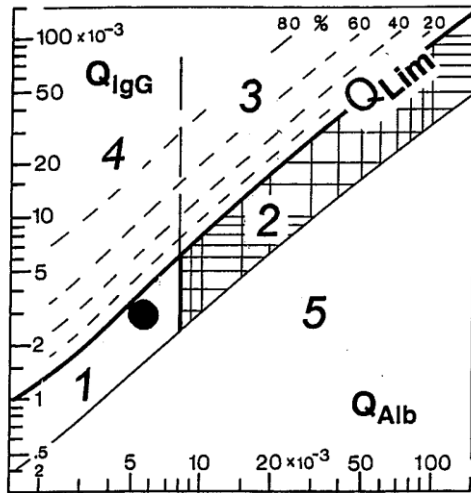
Oblast 1 : normální nález

Oblast 2 : izolovaná porucha HLB bez intratekální syntézy IgG

Oblast 3 : porucha HLB společně s intratekální syntézou IgG

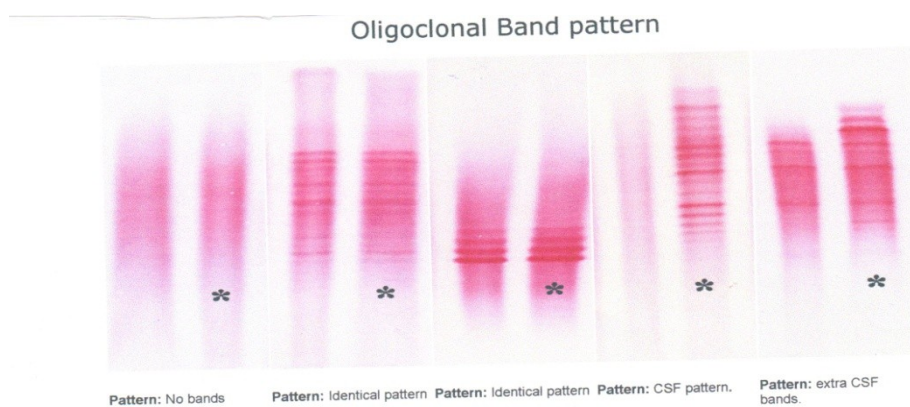
Oblast 4 : izolovaná intratekální syntéza IgG bez poruchy HLB

Oblast 5 : oblast analytických chyb (7)



Obrázek 2. Oligoklonální IgG pásy – vzorce

Vzorec 1 Vzorec 2 Vzorec 3 Vzorec 4 Vzorec 5



7.4 Publikace č. 4

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, Podivínský J, Bekárek V, Sklenařová J, Zapletalová J, Hluštík P, **Sládková V**, Doležil D, Kaňovský P. Relapsing-remitting multiple sclerosis and oligoclonal band pattern during disease modifying drug therapy. *Čes a slov Neurol N* 2007; 70/103(6):674-677, IF₂₀₀₅ 0,070.

Relapsing-remitting Multiple Sclerosis and Oligoclonal Band Pattern During Disease Modifying Drug Therapy

Relabující-remitující roztroušená skleróza a oligoklonální pruhy v průběhu léčby modifikující průběh choroby

Abstract

The aim of this study was to assess oligoclonal bands (OCB) in the cerebrospinal fluid (CSF) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) treated with disease modifying drug (DMD) therapy. The authors examined a group of 22 patients, 5 males (aged 19–44, mean 29.8 ± 6.5 years) and 17 females (aged 26–51, mean 37.8 ± 6.7 years). CSF samples were taken 0–42 months before and 1–16 months after the initiation of DMD therapy. The number of OCB in the CSF was assessed by isoelectric focusing. Paired sample t-test and Wilcoxon signed-rank test were applied when assessing statistical significance. In the patient group, the number of OCB at follow-up decreased significantly (mean decrease 6.2, median 3.5, $p = 0.001$, paired t-test). These results demonstrate changes in OCB patterns, respectively support the hypothesis about possible immunomodulation effect of DMD therapy.

Souhrn

Cílem studie bylo vyhodnotit oligoklonální pásy (OCB) v mozkomíšním moku (CSF) u pacientů s relapsující remitující roztroušenou sklerózou (RRMS) léčených nemoc modifikujícími léky (DMD). Autoři vyšetřili skupinu 22 pacientů, z nichž bylo 5 mužů (ve věku 19–44 let, průměrný věk $29,8 \pm 6,5$ let) a 17 žen (ve věku 26–51 let, průměrný věk $37,8 \pm 6,7$ let). Vzorky CSF byly odebrány 0–42 měsíců před a 1–16 měsíců po zahájení DMD léčby. Počet OCB v CSF byl stanoven metodou izoelektrické fokusace. K vyhodnocení statistické významnosti byl použit párový t-test a Wilcoxonův jednovýběrový test. V patientské skupině se počet OCB při sledování významně snížil (průměrný pokles byl 6,2, medián 3,5, $p = 0,001$, párový t-test). Tyto výsledky prokazují změny vzorců OCB, respektive podporují hypotézu o možném imunomodulačním účinku DMD léčby.

J. Mareš¹, R. Herzig¹, K. Urbánec¹,
J. Podivínský⁵, V. Bekárek²,
J. Sklenařová², J. Zapletalová²,
P. Hluštík¹, V. Sládková¹,
D. Doležíl⁴, P. Kaňovský¹

¹Department of Neurology,
LF UP a FN Olomouc

²Department of Clinical Biochemistry,
LF UP a FN Olomouc

³Department of Biometrics, LF UP
a FN Olomouc

⁴Department of Neurology, University
Hospital Ostrava-Poruba

⁵Neurology Geriatric Medical Institution,
Moravský Beroun

MUDr. Jan Mareš

Centrum pro diagnostiku a léčbu
demyelinizačních onemocnění
Neurologická klinika LF UP a FN
I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
e-mail: maresja@seznam.cz

Přijato k recenzi: 19. 12. 2007

Přijato do tisku: 10. 5. 2007

Key words

oligoclonal bands – cerebrospinal fluid
interferon beta – multiple sclerosis

Klíčová slova

oligoklonální pásy – mozkomíšní moky
interferon beta – roztroušená skleróza

Introduction

The detailed assessment of the CSF is currently a part of multiple sclerosis (MS) diagnostics. In all stages of this disease, we can find increased IgG levels in CSF which after correction for the function of the blood-brain barrier show its intrathecal synthesis. It is possible to demonstrate it as OCB. OCB represent immunoglobulin fractions participating in myelin destruction. OCB detection by isoelectric focusing is the most specific CSF test for MS [1] – it provides a significant support for MS diagnostics because they are not usually found in the serum of these patients and are therefore a proof of antibody production directly in central nervous system (CNS). OCB in the alkaline area are by CSF assessment positive (2 or more bands) in 95–100% of patients with MS [2, 3, 4]. In 40% of MS patients, OCB may be found in the serum as well.

OCB can be present even when the CSF IgG level is normal. Finally, these bands are not specific only for MS – they are also found in various inflammatory disorders as well as in chronic infections of the CNS, in acute disseminated encephalomyelitis [5], Guillain-Barré syndrome [6] or neurodegenerative dementia [7], vascular, toxic, metabolic, traumatic or psychiatric disorders, radicular syndromes or in most peripheral neuropathies [8]. The finding of oligoclonal bands in the CSF almost doubles the risk of development in clinically definite MS [9]. OCB have a predictive value in the case of negative MRI but there is no direct correlation between OCB in the CSF and the demyelinating process as assessed by the MRI.

Therapy of RRMS with interferons leads to a significant decrease in the number of relapses and to a shortening of their duration as well to marked improvement of MRI findings. There are only limited data concerning immunological CSF findings during the interferon therapy in the current literature and changes of OCB patterns mostly have not been described [10].

The aim of the study, which has been realized at the Department of Neurology, University Hospital in Olomouc, Czech Republic, was to find out whether OCB number changes during the DMD therapy. We tried to investigate whether there are chan-

ges in the OCB patterns during the DMD therapy.

Subjects and Methods

The studied patient group (N = 22) consisted of 5 males (aged 19–44, mean 29.8 ± 6.5 years), and 17 females (aged 26–51 years, mean 37.8 ± 6.7 years). The diagnosis of RRMS was established based on the McDonald's criteria [11].

The CSF was collected by a routine lumbar puncture as part of the standard diagnostic process prior to the start of the DMD therapy (0–42 months before, mean 13.5 ± 8.2) and for a second time (after receiving informed consent) 1–16 (mean 6.2 ± 2.1) months after the beginning of the DMD therapy. During the study, some patients were treated with immunosuppressive therapy (Imuran p.o.) or chronic steroid therapy (Medrol p.o., Prednison p.o.). Relapses were treated with bolus of steroids (5g Solu-Medrol i.v.) – see Table 1.

The method of Pharmacia Biotech modified for using of acrylamid gel PhastGel ICF 3–9 and by isoelectric focusing (IEF) with successive affinity immunoblot was used. The number of OCB in the CSF was assessed by the method of isoelectric focusing in a laboratory with the certificate KB/0079, which was blinded to the aim of this study and to the patient's therapy.

Paired-sample t-test (parametric) and Wilcoxon signed-ranks test (nonparametric) were applied when assessing statistical significance, using SPSS-10 software package (SPSS, Chicago, USA).

The whole study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (as revised in 1983) and it was approved by local ethics committee of University Hospital in Olomouc, Czech Republic.

Results

The numbers of OCB before immunomodulation treatment and after the initiation of DMD therapy are summarized in Table 1 and Figure 1.

Only OCB bands present in the CSF and absent in serum were considered. In 18 patients, a reduction in the number of OCB was observed (mean 7.8 ± 5.9), in 2 patients the number of OCB increased by 1 and 3 (mean 2 ± 1) and in 2 patients there were

no changes in the number of OCB. In 10 patients, a regression from 8 to 7 OCB was observed. Overall, the number of OCB between 1st and 2nd examination was significantly low up decreased (median 3.5; $p = 0.001$, paired t-test) (Figure 1).

Considering that the distribution of OCB counts is asymmetrical with lower limit of 0, statistical significance was confirmed using a nonparametric Wilcoxon signed-ranks test ($p = 0.0004$). Sensitivity of OCB prediction was 90.9, specificity 76.9, positive predictive value 99.3, and negative predictive value 99.3.

Discussion

OCB represent the set of antibodies against yet unknown antigens of the CNS, probably of „nonsense“ nature. The dynamics of the appearance and the development of OCB during the course of MS is not generally known yet [12]. In the study by Rudick et al. [13], only two cases (1%) out of 185 CSF samples obtained from patients with MS demonstrated the specificity of OCB antibodies against known CNS antigens. Rudick et al. [14] did not observe changes in the IgG index, light chain ratios nor OCB patterns in 137 re-examined samples of CSF before and 2 years after the beginning of Avonex therapy. Administration of interferon beta intravenously (i.v.) for duration of 2 months did not lead to changes in OCB patterns in the study by Confavreux et al. [15] in 10 patients after 6 months to OCB changes. On the contrary, a characteristic individual „fingerprint“ of the OCB in the CSF was preserved, allowing recognition of the patient to whom the CSF sample belonged. Saiz et al. made similar observations in 10 patients who underwent an autologous hematopoietic stem cell transplantation. The baseline CSF OCB persisted for 12 months following transplantation [16]. Kirshner et al. [17] have found that in 3 out of 6 patients with progressive MS, after interferon therapy lead to increased i.v. synthesis and production of OCB.

Other studies [18–20] described the changes of OCB during the steroid and immunomodulatory therapy where the changes observed in the CSF banding pattern were not statistically significant. On the basis of the above-mentioned findings, it is possible to note that

Table 1. Changes of OCB by patients with DMD and steroids/immunosuppressive therapy.

No.	sex	age by 2. inv.	MS in years to 2. inv.	1. inv.	2. inv.	DMD therapy start	drug	months from 1. inv. therapy	months from start of DMD therapy	immunosuppress. in 6 months to 1. inv.	chronic steroid therapy in 6 months to 1. inv.	bolus of steroids in 6 months to 1. inv.	immunosuppress. in 6 months to 2. inv.	chronic steroid therapy in 6 months to 2. inv.	bolus of steroids in 6 months to 2. inv.	OCB 1. inv.	OCB 2. inv.
1.	F	33	1	X-01	XI-02	IV-02	Betaferon	6	7	0	0	0	Im 25	0	0	8	3
2.	M	25	3	IV-00	X-02	IV-02	Betaferon	30	6	0	Med 4	0	0	0	0	11	14
3.	F	32	4	VII-01	XI-02	X-02	Betaferon	15	2	Im 25	Pred 5	1	Im 50	Pred 35	0	17	8
4.	F	40	29	XI-03	XI-03	X-02	Betaferon	0	8	Im 25	Med 16	0	Im 50	Med 8	0	12	4
5.	F	46	8	XI-02	XI-03	XI-02	Betaferon	0	8	Im 25	Med 4	1	0	0	0	3	0
6.	M	29	2	IX-01	XI-02	X-02	Betaferon	13	2	0	Med 4	0	0	Med 4	0	22	4
7.	F	34	3	IV-00	IV-02	XI-01	Avonex	19	5	Im 25	Med 4	0	0	Med 8	0	12	12
8.	F	51	14	VII-01	XI-02	IV-02	Betaferon	9	7	0	0	1	0	0	0	5	4
9.	F	49	27	IV-00	XI-02	IV-02	Copaxone	24	7	0	0	1	0	0	1	14	0
10.	F	43	5	VI-01	III-03	II-03	Avonex	20	1	0	Med 32	1	0	0	0	3	0
11.	F	34	1	IV-00	IX-01	IV-01	Rebif 22	12	5	Im 25	Pred 5	1	Im 50	Pred 5	0	12	6
12.	M	19	1	XI-00	XI-01	IV-01	Betaferon	5	7	0	0	1	0	1	0	11	8
13.	F	39	23	VII-00	XI-01	IV-01	Copaxone	9	7	0	0	1	0	Pred 20	0	23	0
14.	F	26	4	X-98	XI-01	IV-02	Rebif 44	42	7	0	0	0	Im 25	Med 16	0	20	0
15.	F	37	18	VI-00	V-02	I-01	Rebif 22	7	16	0	Med 16	0	0	0	0	16	17
16.	M	44	1	II-00	XI-01	VII-01	Betaferon	17	4	0	0	1	0	Pred 5	0	1	0
17.	F	46	3	III-00	XI-02	IV-02	Avonex	25	9	0	0	0	0	Med 8	0	16	0
18.	F	46	2	VIII-00	XI-02	IV-02	Copaxone	20	8	0	0	0	0	Med 8	0	12	8
19.	F	26	2	I-01	I-02	VII-01	Avonex	6	6	0	0	0	Im 50	Pred 10	1	21	20
20.	M	32	1	VII-03	II-04	X-03	Avonex	3	4	Im 25	0	1	0	0	0	6	2
21.	F	32	3	IV-03	II-04	X-03	Betaferon	6	4	Im 50	Pred 10	1	Im 25	Med 4	0	0	0
22.	F	29	1	VI-00	X-01	IV-01	Rebif 22	10	6	0	0	0	Im 50	Med 16	1	17	16

inv. - investigation (CSF assessment), immunosuppress. - immunosuppressive therapy, Im - Imuran, Pred - Prednison, Med - Medrol

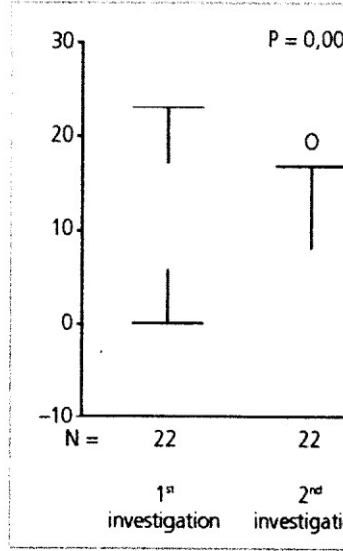


Figure 1. Changes of OCB from 1st to 2nd examination. P = 0,00

DMD therapy, the number of OCB in CSF may change - in our group of patients we found a tendency to decrease or disappearance of OCB - similar to what were described in study of Andersson et al. [14] who found disappearance of OCB during methylprednisolone treatment in MS patients in 3 patients out of 10. The disappearance of OCB was described in patients with other autoimmune neurological diseases - in study of Bergsäter et al. [21] OCB have been found in 10 patients with Devic's neuromyelitis optica and by repeated CSF assessment always disappeared. The results in our study significantly decreased numbers of OCB but this study has some limitations: the group of patients was relatively small with absence of control group (patients with RRMS without DMD therapy constitute an ethic problem). Secondly, the possible influences of bolus of steroids on relapses of MS and immunosuppressive therapy - can accelerate the suppression of inflammatory process and oligoclonal synthesis. Thirdly, the pathogenesis of OCB is still obscure and the final picture of oligoclonal synthesis is based on manifold the different participations both of T and B-cells on autoimmune response. The variability in intrathecal synthesis. The synthesis on T cells has derived from the de

of activated T cells in MS plaques. Currently the role of B cells, plasma cells and immunoglobulins in MS have been re-examined, and findings indicate that humoral immunity also plays a major role in MS pathogenesis. According to Coreale et al. [3], B cells and their products could exert several potential effects during the course of MS – autoantibodies against specific myelin antigens could mediate damage to myelin membranes, some studies suggest that natural autoantibodies could enhance remyelination, antibodies directed against myelin components can participate in anti-idiotypic networks, which may regulate the course of MS. Therefore, a critical task is to clearly describe this issue and follow-up studies are necessary considering the pathophysiological aspects of OCB changes in MS.

References

- Andersson M, Alvarez-Carmeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 897–902.
- Caudie C, Allauzen O, Bancel J, Later R. Diagnostic usefulness of oligoclonal immunoglobulin G bands in cerebro-spinal fluid using isoelectric focusing in early diagnosis of multiple sclerosis. *Annales de Biologie Clinique* 2000; 2(58): 187–193.
- Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurol* 2002; 249: 375–389.
- Miller JR, Burke AM, Bever CT. Occurrence of oligoclonal bands in multiple sclerosis and other CNS diseases. *Ann Neurol* 1983; 13(1): 53–58.
- Dale RC, de Sousa C, Chong WK, Cox TC, Harding B, Neville BG. Acute disseminated encephalomyelitis, multiphasic disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis in children. *Brain* 2000; 123: 2407–2422.
- Kruger H, Englert D, Pflughaupt KW. Demonstration of oligoclonal immunoglobulin G in Guillain-Barre syndrome and lymphocytic meningo-radculitis by isoelectric focusing. *J Neurol* 1981; 226(1): 15–24.
- Janssen JC. The prevalence of oligoclonal bands in the CSF of patients with primary neurodegenerative dementia. *J Neurol* 2004; 251(2): 184–188.
- Sindic CHJM, Van Antwerpen MP, Goffette S. The Intrathecal Humoral Immune Response: Laboratory Analysis and Clinical Relevance. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(4): 333–340.
- Barry A, Singer MD. Diagnosis and Monitoring of Multiple Sclerosis: Focus on Cerebrospinal Fluid Analysis and Brain Imaging. [online] *Ectrim* 2006. Dostupné z URL: <http://doctor.medscape.com/viewarticle/548062>
- Rudick RA, Cookfair DL, Simonian NA, Ransohoff RM, Richert JR, Jacobs LD et al. Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFNβ-1a) for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *J Neuroimmunol* 1999; 93(1–2): 8–14.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121–179.
- Antel JP, Birnbaum G, Hartung HP. *Clinical neuroimmunology*. London: Blackwell Science 1998.
- Kaiser R, Obert M, Kaufmann R, Czygan M. IgG-antibodies to CNS proteins in patients with multiple sclerosis. *Eur J Med Res* 1997; 2(4): 169–172.
- Anderson TJ, Donaldson IM, Sheat George PM. Methylprednisolone in multiple sclerosis exacerbation: changes in CSF parameters. *Aust N Z J Med* 1990; 20(6): 794–797.
- Confavreux C, Chapuis-Cellier C, Arnould P, Robert O, Aimard G, Devic M. (1986) Oligoclonal „fingerprint“ of CSF IgG in multiple sclerosis patients is not modified following intrathecal administration of natural beta-2-interferon. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986; 49(11): 1308–1312.
- Saiz A, Carreras E, Berenguer J, Yaguez Martinez C, Marin P et al. MRI and CSF oligoclonal bands after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology* 2001; 56(8):1084–1089.
- Kinnunen E, Timonen T, Pirttila T, Kallunki P, Ketonen L, Matikainen E et al. Effect of recombinant alpha-2b-interferon therapy in patients with progressive MS. *Acta Neurol Scand* 1993; 87(6): 457–460.
- Caputo D, Zaffaroni M, Ghezzi A, Zullo CL. Azathioprine reduces intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1987; 75(2): 84–86.
- Durelli L, Cocito D, Riccio A, Barile C, Bergamasco B, Baggio GF et al. High-dose intravenous methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis: clinical-immunologic correlations. *Neurology* 1986; 36(2): 238–243.
- Sipe JC, Romine JS, Koziol JA, McKeown R, Zyffoff J, Beutler E. Cladribine in treatment of chronic progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1994; 344: 9–13.
- Bergamaschi R, Toniatti S, Franciotti C, Candeloro E, Tavazzi E, Piccolo G et al. Oligoclonal bands in Devic's neuromyelitis optica and multiple sclerosis: differences in cerebrospinal fluid examinations. *Mult Scler* 2004; 10(1): 2–4.

7.5 Publikace č. 5

Mareš J, Herzig R, Urbánek K, **Sládková V**, Opavský R, Hluštík P, Kollárová K, Podivínský J, Sklenářová J, Bekárek V, Schneiderka P, Zapletalová J, Kaňovský P. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the CSF of patients with multiple sclerosis. *Čes a slov Neurol N* 2007; 70/103(4):392-394, IF₂₀₀₅ 0,070.

Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the CSF of patients with multiple sclerosis

Korelace mezi indexem IgG a oligoklonálními pásy při CSF vyšetření u pacientů s roztroušenou sklerózou

Abstract

Objective: The aim of this study was to assess the correlation between IgG index values and the number of the oligoclonal IgG bands (OCB) in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with multiple sclerosis (MS). **Material and Methods:** The set of 150 patients consisted of 41 males and 109 females (aged 18–68, mean 36.6 ± 10.1 years). The CSF collected by a lumbar puncture was examined evaluating intrathecal synthesis using the IgG index and determining OCB. The number of alkaline OCB in the CSF was assessed using the method of isoelectric focustion. Pearson's correlation analysis, and homogeneity χ^2 test, Mann-Whitney test, paired-sample t-test (parametric) and Wilcoxon signed-ranks test (nonparametric) were used to evaluate the statistical significance of the results. **Results:** No positive correlation between the IgG index and the number of OCB was found. Mann-Whitney test also did not demonstrate any significant difference of the IgG index values in patients both with the OCB number ≥ 2 and < 2 . **Conclusion:** This study did not confirm the correlation between the IgG index values and the OCB number in the CSF of MS patients.

Souhrn

Cíl: Cílem studie bylo vyhodnotit vztah mezi hodnotami indexu IgG a počtem oligoklonálních IgG pásů (OCB) v mozkomíšním moku (CSF) pacientů s roztroušenou sklerózou (SM). **Materiál a metodika:** Soubor 150 pacientů sestával ze 41 mužů a 109 žen (ve věku od 18 do 68 let, průměrný věk byl $36,6 \pm 10,1$ let). U mozkomíšního moku odebraného lumbální punkcí byla posouzena intratekální syntéza s využitím indexu IgG a stanovením OCB. Počet alkalických OCB v CSF byl stanoven metodou izoelektrické fokusace. K vyhodnocení statistické významnosti výsledků byla rovněž použita Pearsonova korelační analýza, χ^2 test homogenity, Mannův-Whitneyův test, párový t-test (parametrický) a jednovýběrový Wilcoxonův test (neparametrický). **Výsledky:** Pozitivní korelace mezi IgG indexem a počtem OCB nebyla nalezena. Ani Mannův-Whitneyův test neprokázal podstatný rozdíl v hodnotách indexu IgG u pacientů s OCB ≥ 2 a < 2 . **Závěr:** Studie nepotvrdila korelaci mezi hodnotami IgG indexu a počtem OCB v CSF u pacientů s roztroušenou sklerózou.

J. Mareš¹, R. Herzig¹, K. Urbánek¹, V. Sládková¹, R. Opavský¹, P. Hlušík¹, K. Kollárová¹, J. Podivínský², J. Sklenářová³, V. Bekárek³, P. Schneiderka³, J. Zapletalová⁴, P. Kaňovský¹

¹Department of Neurology, Palacký University Medical School and University Hospital, Olomouc, Czech Republic

²Neurology Geriatric Medical Institution, Moravský Beroun

³Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Olomouc, Czech Republic

⁴Institute of Biophysics, Palacký University Medical School, Olomouc, Czech Republic



MUDr. Jan Mareš

Centrum pro diagnostiku a léčbu demyelinizačních onemocnění
Neurologická klinika
Fakultní nemocnice
I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
e-mail: maresja@seznam.cz

Přijato k recenzi: 19. 12. 2006

Přijato do tisku: 27. 2. 2007

Key words

oligoclonal bands – cerebrospinal fluid
IgG index – multiple sclerosis

Klíčová slova

oligoklonální pásy – mozkomíšní mok
IgG index – roztroušená skleróza

Introduction

Immunoglobulins are glycoproteins produced by plasmocytes. In contrast to the known and characteristic reaction in the serum, where antibody production switches from the IgM to IgG class in the subacute and chronic phase of the disease, such a transition is not present in the intrathecal synthesis. The characteristic immunoglobulin pattern in classes IgG, IgM and IgA existing in the central nervous system (CNS) remains relatively constant already at the disease onset. Intrathecal IgG synthesis represents local IgG production within the CNS compartment, originates from perivascular infiltrates of B lymphocytes. Quantitative assessment of the intrathecal IgG synthesis is based on the relationship between IgG and albumin concentrations in the CSF and serum. Oligoclonal IgG immunoglobulins represent a primarily polyspecific and only subsequently an oligoclonal type of immune response. This produces an extensive spectrum of non-specific antibodies of „non-sense“ nature.

Information obtained by a detailed assessment of the CSF is currently unreplaceable for the diagnostics and monitoring of MS development. In all MS stages, increased IgG levels, which after correction for the function of the blood-brain barrier show their intrathecal synthesis, can be found. It is possible to demonstrate it as OCB by which the immunoglobulins participating in a destruction of the myelin covering of axons are lining up to special patterns. OCB assessment is the most specific CSF test for MS diagnosis [1] – their presence provides a significant support for this diagnosis, because they are not found in the serum of these patients and are therefore a proof of antibody production directly in the CNS. OCB are present (in the number of 2 or more) in the CSF of 95–100% of MS patients [2,3]. OCB can be present

even in the case, when the CSF IgG level is normal. Finally, OCB are not specific only for MS – they are also found in various inflammatory disorders as well as in the chronic CNS infections. On the other hand, they are usually not present in neurodegenerative diseases, acute disseminated encephalomyelitis, Guillain-Barré syndrome, vascular, toxic, metabolic, traumatic or psychiatric disorders, radicular syndromes or in the majority of peripheral neuropathies [4]. OCB have a predictive value in the case of a negative magnetic resonance imaging finding (MRI), but there is no direct correlation between the OCB in the CSF and the demyelinating process as assessed by the MRI.

Determination of IgG index represents a quantitative detection of intrathecal synthesis. In the case of higher concentration of CSF IgG with normal levels of IgG in serum is the IgG index value elevated, regarding to the blood-brain barrier function. The limit for intrathecal synthesis detection is rated for 0.7. OCB represent a qualitative detection of intrathecal synthesis – OCB are detected by IEF usually in alkaline spectrum (event. neutral or para-neutral section) and are characterized by polyspecificity and oligoclonality.

The aim of this study was to assess the correlation between IgG index values and the OCB number in the CSF of patients with MS.

Material and Methods

The set of 150 MS patients (aged 18–68, mean 36.6 ± 10.1 years) consisted of 41 males and 109 females. The diagnosis of RRMS was established based on the McDonald's criteria. All patients were treated at the Department of Neurology, University Hospital, Olomouc, Czech Republic, between 2001 and 2005.

In all patients, the CSF was collected by a routine lumbar puncture as part of the

standard diagnostic process. The assessment of the IgG index and of the OCB was used for the evaluation of the intrathecal synthesis. IgG method of Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) modified for use of acrylamid gel PhastGel ICF 3–9 and by isoelectric focusing (IEF) [5] with successive affinity immunoblot was used. The number of OCB in the CSF was assessed by the method of isoelectric focusing (IEF). The samples were examined in a laboratory with the international certificate for the method (KB/0079). The IgG index was calculated from IgG and albumin measurements performed in CSF and serum. The calculation takes the following form: Index IgG = $(\text{IgG}_{\text{CSF}}/\text{IgG}_{\text{Serum}}) \cdot (\text{Alb}_{\text{CSF}}/\text{Alb}_{\text{Serum}}) = Q_{\text{IgG}}/Q_{\text{Alb}}$

Pearson's correlation analysis, and homogeneity χ^2 test, Mann-Whitney test, paired sample t-test (parametric) and Wilcoxon signed-ranks test (nonparametric) were used to evaluate the statistical significance of the results, using SPSS-10 software package (SPSS, Chicago, USA). Sensitivity and specificity of the IgG index and the OCB number for the prediction of MS diagnosis were also assessed.

The whole study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (as revised in 1983) and it was approved by local ethics committee of University Hospital in Olomouc, Czech Republic.

Results

Only OCB present in the CSF and absent from serum were considered. IgG index and the OCB number are summarized in the Tables 1 and 2.

No positive correlation between the IgG index and the number of OCB was found by the Pearson's correlation and nonparametric Spearman correlation. Using Mann-Whitney also test did not demonstrate any significant difference of the IgG index values in patients both with the OCB number ≥ 2 and < 2 .

Table 1. IgG Index values.

IgG Index	Frequency	Percent	Valid Percent
$\leq 0,7$	91	60,7	61,9
$> 0,7$	56	37,3	38,1
Total	147	98,0	100,0
Unlisted	3	2,0	
Total	150	100,0	

Table 2. Number of oligoclonal IgG bands.

IgG Index	Frequency	Percent	Valid Percent
≥ 2	97	64,7	70,3
< 2	41	27,3	29,7
Total	138	92,0	100,0
Unlisted	12	8,0	
Total	150	100,0	

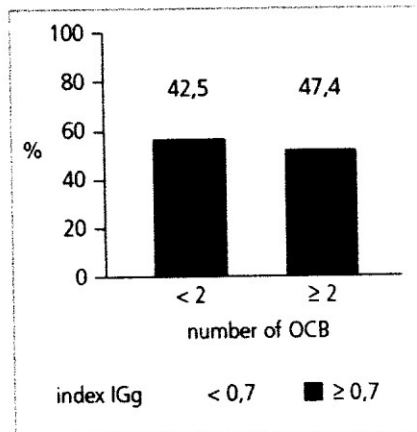


Figure 1. Correlation of the IgG index a OCB number.

We also have determined the sensitivity and the specificity of the technique used in our laboratory: characteristics of diagnostic test of IgG index $> 0,7$ for prediction of MS diagnosis: sensitivity – 38,1%, specificity – 91,7 %, accuracy – 77,6 %, positive predictive value – 62,2 %, negative predictive value – 80,5 %. Characteristics of diagnostic test of OCB number ≥ 2 for prediction of MS diagnosis: sensitivity – 70,3 %, specificity – 76,1 %, accuracy – 74,4 %, positive predictive value – 53,3 %, negative predictive value – 86,8 %. Characteristics of diagnostic test both of IgG index $> 0,7$ and oligoclonal IgG bands number ≥ 2 for prediction of MS diagnosis: sensitivity – 77,0 %, specificity – 73,7 %, accuracy – 74,6 %, positive predictive value – 51,1 %, negative predictive value – 90,0 %.

Discussion

The dynamics of the appearance and the development of OCB during the course of MS are not yet generally known [6]. In the study performed by Kaiser et al [7], only two cases (1%) out of the 185 CSF samples obtained from MS patients demonstrated the specificity of OCB antibodies against known CNS antigens. Livrea et al [8] did not find any correlation was found between the OCB pattern or amounts and age, duration, clinical course or therapy of the disease.

Concerning to correlation between the IgG index and OCB there is a lack of data in current literature – in study of Kaiser et al [9] were used two quantitative methods of determining the intrathecal synthesis of

IgG for their usefulness in deciding about the necessity of further investigations of OCB in the CSF. While OCB could be detected in no patient with an IgG index $< 0,45$, OCB were always demonstrated in patients with an index $> 0,80$. Even though arrange of IgG index 0.45–0.8 values OCB was only detected in 268 out of 1316 patients (20.4%), in 190 out of 268 samples (70.8%)

Mayringer et al [10] found a positive correlation between the IgG index and the frequency of OCB as well as the probability of demyelinating CNS disease in patients with demyelinating CNS disease.

On the contrary we did not find any positive correlation between both parameters of intrathecal synthesis which is in accordance with study of Rochelli et al [11] – 63 out of 70 patients with definite MS and 24 out of 35 with probable MS had oligoclonal bands in the CSF and in the 18 patients with normal OCB pattern did not show any statistically significant difference as concerns the quantitative CSF parameters (IgG index, IgG synthesis and serum/CSF albumin quotient) compared to the patients with the OCB in CSF. Also in study of Poloni [12], in a group of 120 MS patients the group of 20 patients with normal IgG profile has been compared with a group of 22 patients selected by random out of the 100 with IgG oligoclonal bands and no statistically significant difference was discovered between these groups.

On the basis of our findings we can support the opinion about unsubstitutability of quantitative and qualitative methods in CSF assessment for use in differential diagnostics of MS. Because of lower diagnostic sensitivity, IgG index assessment cannot be recommended as replacement of IEF. Quantitative assessment of IgG in CSF is easier and quicker but qualitative method by IEF is the most sensitive method for detecting of abnormal intrathecal synthesis.

Conclusion

This study did not confirm the correlation between the IgG index values and the OCB number in the CSF of MS patients and support the opinion about unsubstitutability both of methods in MS diagnostics. Further studies are needed to assess this topic.

References

- Andersson M, Alvarez-Carmeno J, Bern G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 897–902.
- Caudie C, Allauzen O, Bancel J, Later R. Diagnostic usefulness of oligoclonal immunoglobulin G bands in cerebro-spinal fluid using electric focusing in early diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Biol Clin (Paris)* 20002; 58: 187–191.
- Miller JR, Burke AM, Bever CT. Occurrence of oligoclonal bands in multiple sclerosis and other diseases. *Ann Neurol* Jan 1983; 13(1): 53–57.
- Sindic CHJM, Van Antwerpen MP, Gofin L, et al. The Intrathecal Humoral Immune Response. *Laboratory Analysis and Clinical Relevance*. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(4): 333–340.
- Correale J, de los Milagros Bassani M. Oligoclonal bands and antibody response in multiple sclerosis. *J Neurol* 2002; 249: 375–380.
- Antel JP, Birnbaum G, Hartung HP. *Clinical neuroimmunology*. London: Blackwell Science 1998: 423.
- Kaiser R, Obert M, Kaufmann R, Czornyj M. IgG-antibodies to CNS proteins in patients with multiple sclerosis. *Eur J Med Res* 2001; 2(4): 169–172.
- Livrea P, Trojano M, Simone IL, Zimone G, Lamontanara G, Leante R. Intrathecal synthesis in multiple sclerosis: comparison between isoelectric focusing and quantitative estimation of cerebrospinal fluid IgG. *J Neurol* 1981; 224(3): 159–169.
- Kaiser R, Czygan M, Kaufmann R, Luder CH. Intrathecal IgG synthesis: when does the termination of oligoclonal bands occur? *Nervenarzt* 1995; 66(8): 618–23.
- Mayringer I, Timeltaler B, Deisenhammer H. Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases. *Eur J Neurol* 2005; 12(7): 527–530.
- Rocchelli B, Poloni M, Mazzarello P, Rodolico M. Clinical and CSF findings in multiple sclerosis patients with or without oligoclonal bands at isoelectric focusing: correlation of CSF and serum proteins. *Eur J Neurol* 1983; 22(1): 35–42.
- Poloni M, Rocchelli B, Mazzarello P, Rodolico M. Relation between the clinical and cerebrospinal fluid parameters in multiple sclerosis, with special reference to patients without oligoclonal IgG in the cerebrospinal fluid. *Riv Neurol* 1981; 51(2): 69–80.