

LEKÁRSKA FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO
V OLOMOUCI

Zápalové markery v sére a likvore u pacientov s roztrúsenou
mozgovomiechovou sklerózou

Dizertačná práca

odbor: Neurológia

MUDr. Zuzana Matejčíková

Olomouc 2017

Autorské prehlásenie

Prehlasujem, že som dizertačnú prácu vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

V Olomouci dňa 15.5. 2017

MUDr. Zuzana Matejčíková

Pod'akovanie

Chcela by som sa pod'akovať predovšetkým školiteľovi prof. MUDr. Janovi Marešovi, Ph.D. za erudované vedenie pri spracovaní zadanej témy a cenné pripomienky počas celého doktorandského štúdia. Moje pod'akovanie patrí aj Mgr. Jane Zapletalovej, Dr. za štatistické spracovanie dát a pomoc pri interpretácii výsledkov. V neposlednej rade som vd'ačná prof. MUDr. Petrovi Kaňovskému, CSc. za iniciáciu a vytvorenie podmienok počas štúdia a vytvorenie podmienok k tejto práci.

Obsah

Zoznam použitých skratiek.....	6
1 Úvod.....	8
2 Roztrúsená skleróza.....	10
2.1 Definícia RS.....	10
2.2 Epidemiológia, genetika a rizikové faktory RS.....	10
2.3 Etiopatogenéza RS.....	12
2.3.1 Základný prehľad autoimunitných pochodov u RS.....	12
2.3.2 Úloha T lymfocytov u RS.....	14
2.3.3 Úloha B lymfocytov u RS.....	15
2.4 Formy RS.....	16
2.5 Symptómy RS.....	17
2.6 Paraklinické vyšetrenia.....	21
2.7 Liečba RS.....	23
2.7.1 Liečba CIS a RR RS.....	23
2.7.1.1 DMD terapia 1. línie.....	23
2.7.1.1.1 Interferóny.....	24
2.7.1.1.2 Glatiramer acetát.....	25
2.7.1.1.3 Teriflunomid.....	26
2.7.1.2 DMD terapia 2. línie.....	28
2.7.1.2.1 Dimethyl fumarát.....	28
2.7.1.2.2 Fingolimod.....	29
2.7.1.2.3 Natalizumab.....	30
2.7.1.2.4 Alemtuzumab.....	32
2.7.1.3 Ďalšie možnosti.....	34
2.7.2 Pripravované nové možnosti terapie MS.....	35
2.7.3 Liečba progresívnych foriem RS.....	35
2.7.3.1 Liečba primárne progresívnej formy RS.....	35
2.7.3.2 Liečba sekundárne progresívnej formy RS.....	36
2.7.4 Liečba ataky RS.....	36
2.7.5 Symptomatická a podporná terapia.....	37
3 Hladiny vybraných zápalových markerov v likvore a sére u pacientov s RS.....	40
3.1 Cieľ výskumu a hypotéza.....	40

3.2 Súbtor pacientov a metodika.....	41
3.2.1 Meranie hladín biomarkerov.....	41
3.2.2 Štatistická analýza.....	42
3.3 Výsledky.....	42
3.4 Interpretácia výsledkov pilotnej štúdie.....	46
4 Hladiny vybraných zápalových markerov v likvore a sére u pacientov s RS (extenzia štúdie).....	47
4.1 Cieľ výskumu a hypotéza.....	47
4.2 Súbtor pacientov a metodika.....	48
4.3 Výsledky.....	48
4.4 Interpretácia výsledkov rozč'širenej štúdie.....	53
5 Hladiny interleukínu 8 v sére a likvore a jeho korelácia s Q alb.....	54
5.1 Cieľ výskumu.....	54
5.2 Súbtor pacientov a metódy.....	55
5.2.1 Stanovenie hladiny biomarkerov.....	55
5.2.2 Štatistické spracovanie.....	56
5.2.3 Výsledky.....	57
6 Diskusia.....	58
7 Záver.....	63
8 Súhrn.....	64
8.1 Súhrn slovenský.....	64
8.2 Summary.....	66
9 Použitá literatúra.....	68
10 Publikácie.....	77
10.1 Práce súvisiace s dizertačnou prácou.....	77
10.1.1 Původné vedecké publikácie uverejnené in extenso v recenzovaných vedeckých časopisoch s IF.....	77
10.1.2 Prehľadné vedecké publikácie in extenso uverejnené v recenzovaných vedeckých časopisoch.....	77
10.1.3 Publikované abstrakty.....	78
11 Prílohy.....	80

Zoznam použitých skratiek

CIS	klinicky izolovaný syndróm
CLA+ T	pamäťové s antigénom asociované T- lymfocyty
CNS	centrálny nervový systém
CSF	cerebrospinal fluid
DMD	disease modifying drug
EAE	experimentálna autoimunitná encefalomyelitída
EBV	vírus Epstein- Barovej
EDSS	expended disability status scale- rozšírená škála k posúdeniu disability
HHV-6	ľudský herpesvírus- 6
IL 6	interleukín 6
IL 8	interleukín 8
IL 10	interleukín 10
IL 23	interleukín 23
IVIG	intravenózne imunoglobulíny
i.v.	intravenózne
JCV	John Cunningham vírus
MBP	bázický proteín myelínu
MHC	hlavný histokompatibilný komplex
MOG	s myelínom asociovaný glykoproteín
MR	magnetická rezonancia
MS	multiple sclerosis
MxA	myxovírus rezistencie proteínu A

NAbs neutralizačné protilátky

PLP proteolipid protein

PML progresívna multifokálna leukoencefalopatia

PP RS primárne progresívna forma RS

RIS rádiologicky izolovaný syndrom

RP RS relabujúca progredujúca forma RS

RR RS relabujúca remitentná RS

RS roztrúsená skleróza

SP RS sekundárne progresívna forma RS

TLR toll-like receptor

Q alb albumínový kvocient

VEP zrakové evokované potenciály

1 Úvod

Práca má teoreticko-empirický charakter. V prvej časti (teoretickej) sa nachádza analýza roztrúsenej sklerózy, vrátane jej epidemiológie, etiopatogenézy, foriem, klinických príznakov a paraklinických vyšetrení. Ďalej sú spracované súčasné možnosti terapie a diferenciálna diagnostika RS.

Dizertačná práca sa v empirickej časti zaoberá v prvej fáze vybranými zápalovými markermi v likvore a sére pacientov s novodiagnostikovanou roztrúsenou sklerózou (RS) v porovnaní s kontrolnou skupinou. V druhej fáze sa zaoberá porovnaním týchto markerov s ostatnými parametrami.

Empirická časť je založená na vstupne stanovenej hypotéze, že niektoré zápalové markery v sére a likvore by mohli mať zmenenú hladinu v čase prvých symptómov RS v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zároveň by mohli vyjadrovať intenzitu zápalu a predikovať priebeh choroby. Výskumná časť je zameraná v prvej fáze na analýzu vybraných markerov, t.j. interleukínu 6 (IL 6), interleukínu 8 (IL 8), interleukínu 10 (IL 10), beta-2-mikroglobulínu a orosomukoidu. V druhej fáze je analyzovaná korelácia s albumínovým kvocientom (Q alb).

Výsledky nášho výskumu môžu poslúžiť ako podklad k rozšírenejšiemu výskumu zaoberajúceho sa hľadaním súvislosti medzi likvorovým, event. sérovým obrazom a klinickým priebehom RS.

Všeobecná část'

2 Roztrúsená skleróza

Táto kapitola sa zaoberá popisom roztrúsenej sklerózy, t.j. jej epidemiológiou, patofyziológiou, klinickým obrazom a v neposlednej rade aj možnosťami súčasnej liečby.

2.1 Definícia RS

Roztrúsená skleróza je autoimunitné zápalovo-demyelinizačné ochorenie centrálného nervového systému (CNS). Zápalové procesy sa uplatňujú najmä v počiatočných štádiách RS. V neskorších štádiách prevažujú neurodegeneratívne procesy.

2.2 Epidemiológia, genetika a rizikové faktory RS

RS je najčastejšou príčinou neurologickej invalidity mladých dospelých ľudí. Prvé príznaky sa väčšinou objavujú medzi 20. - 40. rokom života. Častejšie sú postihnuté ženy (70%). Bolo zistené, že výskyt choroby rastie so stúpajúcou zemskou šírkou. Na základe tohto zistenia môžeme rozdeliť zem podľa výskytu RS na oblasť vysoko rizikovú s prevalenciou choroby nad 30/100 000 obyvateľov (severná Európa, sever USA, Kanada, južná Austrália, Nový Zéland), oblasť stredne rizikovú s prevalenciou 5 - 29/100 000 obyvateľov (južná Európa, juh USA, severná Austrália) a oblasť nízko rizikovú s prevalenciou pod 5/100 000 obyvateľov (1). Tento fakt sa dáva do súvislosti so slnečným svitom a vplyvom vitamínu D na imunitný systém. V niekoľkých štúdiách bolo dokázané, že vysoká sérová koncentrácia vitamínu D koreluje so zníženou aktivitou MS a naopak, že nízka sérová koncentrácia koreluje s vyššou aktivitou choroby (2).

V súčasnosti sa predpokladá, že rozvoj RS spúšťajú faktory vonkajšieho prostredia u geneticky predisponovaných jedincov. Gén zodpovedný za klasický mendelovský prenos nebol zistený. V štúdiách zameraných na genetické faktory bolo zistené, že výskyt RS u jednovaječných dvojčiat je cez 25 %, u dvojvaječných dvojčiat je výskyt okolo 2 - 3 %. Doteraz bolo popísaných cca 60 genetických faktorov podieľajúcich sa na vzniku RS (3).

Štúdie na dvojčatách ukázali, že genetická vnímavosť je výrazne ovplyvnená environmentálnymi vplyvmi (4). Dôležitými ovplyvňujúcimi faktormi sú vplyvy životného štýlu (diétne opatrenia, fajčenie) a dôležitý je aj vplyv infekcií. Ďalšími rizikovými faktormi sú hormonálne vplyvy a stres. Relatívne novozisteným rizikovým faktorom je aj obezita v dospievaní. Ďalšími potencionálne rizikovými faktormi sú organické rozpúšťadlá a práca na smeny. Na druhej strane sa predpokladá, že cytomegalovírusy, alkohol a kofeín znižujú riziko rozvoja choroby (5).

Z infekcií bola zistená asociácia medzi rozvojom RS a ľudským herpesvírusom - 6 (HHV-6) a vírusom Epstein Barrovej (EBV). Podiel EBV infekcie na rozvoji RS bol dokumentovaný na pacientovi so sekundárne progresívnou RS, ktorý dosiahol remisiu po podaní infúzie s cytotoxickými T bunkami. Táto terapia mala zničiť EBV infikované B-lymfocyty (6). Všeobecne, pacienti s RS majú sérovú pozitivitu EBV (7). Predpokladá sa, že CD4 + T-lymfocyty rozpoznávajú EBV a myelínové epitopy. Tým by mohla EBV infekcia spustiť prozápalový vplyv T-lymfocytov na myelín CNS. Ďalšia teória predpokladá, že nekontrolovaná produkcia protilátok spôsobená EBV infikovanými autoreaktívnymi B-lymfocytmi môže viesť k rozvoju RS prostredníctvom opsonizácie myelínu pre cytopatické reakcie makrofágov a faktorov komplementu. V neposlednej rade sa predpokladá indukcia ektopických lymfatických štruktúr EBV infikovanými B-lymfocytmi, ktoré vstupujú do CNS (8). Hoci presný mechanizmus účinku EBV u RS nie je známy, je vysoko pravdepodobné, že zohráva v patogenéze tejto choroby dôležitú úlohu.

Ďalším dôležitým faktorom je zistenie významného podielu črevnej mikroflóry v patogenéze RS. Výskumy poukazujú na to, že populácia efektorových a regulačných buniek zahrnutých v patogenéze RS môže byť spojená s lymfatickým systémom čreva (9). Vzťah medzi CNS, imunitným systémom a mikrobiomom (črevnou flórou) vedie k vplyvu mikroorganizmov na rozvoj RS. Nedávne štúdie ukázali, že určitá mikrobiálna populácia v čreve spôsobuje prozápalový stav, čo môže viesť k rozvoju RS. Na druhej strane, iné druhy baktérií a ich antigénne produkty môžu ochrániť CNS pred rozvojom zápalových procesov. V prenose bakteriálnych antigénov z tráviaceho traktu až k CNS hrá dôležitú úlohu systém GALT (gut-associated lymphoid tissue). Jedná sa o najväčší imunitný systém v tele. Črevné baktérie prechádzajú cez lymfatický systém, ktorý je spojený s tráviacim traktom. Boli skúmané rôzne baktérie, ktoré sú súčasťou črevnej mikroflóry (9). Špecifické bakteriálne antigény, ako napríklad PSA z *Bacteroides fragilis*, prostredníctvom migrácie do CNS sprostredkujú interakcie medzi črevnou mukózou a mozgom (10). Ďalší výskum ukázal zníženú koncentráciu *Faecalibacterium* u pacientov s RS.

Na základe doteraz zistených skutočností sa teda predpokladajú pri rozvoji RS vzájomné interakcie faktorov životného prostredia s faktormi genetickými, epigenetickými a štrukturálnymi variantami DNA.

2.3 Etiopatogenéza RS

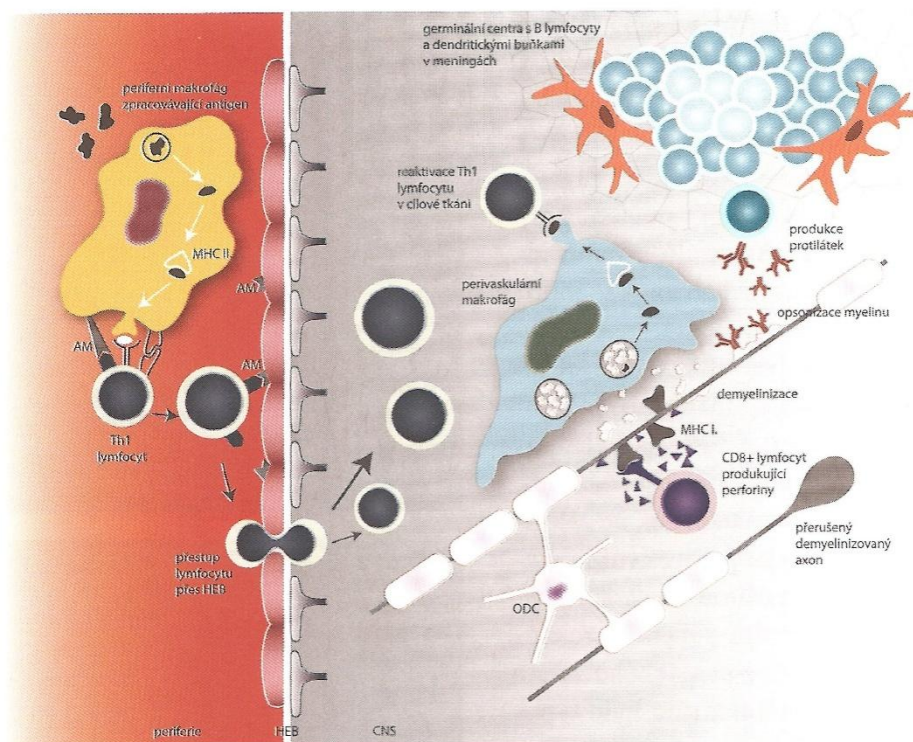
Presná etiopatogenéza RS nie je stále známa. V tejto kapitole bude pojednávané o známych mechanizmoch podieľajúcich sa na RS. A taktiež o procesoch, ktoré sa na rozvoji RS podieľajú pravdepodobne.

2.3.1 Základný prehľad autoimunitných pochodov u RS

Zápal u RS je spôsobený autoimunitnými procesmi prebiehajúcimi hlavne v skorých fázach choroby. Neurodegeneratívne procesy sa objavujú najmä v neskorších štádiách RS. Pre toto ochorenie sú typické zápalové infiltráty, predovšetkým v bielej hmote mozgu, kde sa nachádzajú aktivované T-lymfocyty, makrofágy a menej aj B-lymfocyty. T-lymfocyty sú pravdepodobne aktivované už na periférii, predovšetkým v hlbokých krčných uzlinách. Po aktivácii týchto autoreaktívnych T-lymfocytov (napr. i banálnou infekciou) dochádza k ich proliferácii a prestupu do cieľového tkaniva (t.j. v prípade RS do CNS), kde spúšťajú zápalové procesy, vrátane produkcie prozápalových cytokínov (11). Výsledkom týchto zápalových procesov je poškodenie myelínu a oligodendrocytov v lézii. Takto demyelinizované vlákno stráca schopnosť viesť elektrické impulzy správne (12) a exprimujú sa na ňom bunky hlavného histokompatibilného komplexu (MHC I). Vlákno sa zároveň stáva viditeľné pre CD8 + cytotoxické T-lymfocyty, ktoré ďalej poškodzujú nervové vlákno. Taktiež aktivované B-lymfocyty prestupujú cez hematoencefalickú bariéru, infiltrujú perivaskulárne priestory a produkujú antigén - špecifické protilátky (13).

Neurodegeneratívne procesy sú spôsobené aktiváciou mikroglií a sprostredkované oxidačným stresom a excitotoxicitou. Strata axónov v bielej a šedej hmote CNS je prítomná už v skorých štádiách RS a koreluje s kognitívnym deficitom a trvalým postihnutím.

Obr. č. 1 Základný prehľad patofyziológie RS (14)



Obr. 8-1: Schéma patogeneze RS. K aktivaci antigen-spezifických T lymfocytů (Th1) dochází na periférii, nejspíše v hlubokých krčních uzlinách, rozpoznáním antigenu zpracovaného makrofágy a prezentovaného ve štěrbině MHC molekuly II. třídy (MHC II). Aktivovaný lymfocyt exprimuje adhezivní molekuly (AM); těmi je schopen kontaktu s hematoencefalickou bariérou (HEB), překračuje ji a v cílové tkáni je reaktivován přítomností antigenu. Produkci prozánětlivých cytokinů aktivuje perivaskulární makrofágy a mikroglii, iniciuje vytvoření zánětlivého ložiska a atrahuje do tkáně další zánětlivé buňky včetně B lymfocytů, které vytvářejí v meningách dlouhodobé shluky podobné lymfatickým uzlinám. Působky makrofágů a lymfocytů vedou k destrukci myelinu, který je obalen protilátkami a pohlcován makrofágy, čímž se dostávají další antigeny z rozpadající se tkáně lymfocytům (antigenní šíření - antigen spreading). Demyelinizované axony exprimují na svém povrchu MHC molekuly I. třídy (MHC I.) a jsou díky tomu rozpoznatelné pro CD8 pozitivní lymfocyty. Ty produkují perforiny, vedoucí k prasknutí axonu nasátím extracelulární tekutiny rozšířenými póry v membráně axonu.

Vysvětlivky: trimolekulární komplex (MHC molekula - antigen - receptor lymfocytu).

ODC - oligodendrocyt, CNS - centrální nervový systém.

2.3.2 Úloha T-lymfocytov u RS

To, že u RS hrajú T-lymfocyty dôležitú úlohu, je známe už dlho. Základná hypotéza sa opiera o existenciu autoreaktívneho T-lymfocytu, ktorý má receptory pre antigény CNS. Ku styku autoagresívnych T-lymfocytov s antigénmi CNS dochádza v hlbokých krčných uzlinách. Predpokladané antigény sú súčasťou myelínu, t.j. bázický proteín myelínu (MBP), proteolipid proteín (PLP), s myelínom asociovaný glykoproteín (MOG). Autoreaktívny T-lymfocyt pretrváva v lymfatickom systéme na periférii v inaktivovanom stave. Po aktivácii napr. banálnou infekciou autoreaktívny T-lymfocyt prestupuje cez hematoencefalickú bariéru a putuje k cieľovému ložisku. V mozgu reaguje na cieľový antigén, aktivuje mikrogliu a spúšťa prozápalové procesy. Následne dochádza k deštrukcii myelínu v CNS. Takto demyelinizované nervové vlákno stráca schopnosť vedenia elektrického impulzu. Na demyelinizovanom vlákne sa exprimujú molekuly hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) I. triedy. Vlákno sa stáva viditeľné pre cytotoxické T-lymfocyty triedy CD8+, ktoré ďalej poškodzujú vlákno vyplavovaním perforínov. Perforíny rozširujú póry bunkovej membrány a tým dochádza k prieniku extracelulárnej tekutiny do bunky. Výsledkom týchto procesov je vysoká energetická náročnosť prenosu informácií vláknom (15). Okrem CD8+ T-lymfocytov sú v aktívnych léziách prítomné aj pomocné indukčné CD4+ T-lymfocyty (16).

Počas niekoľkoročných štúdií boli diferencované subtypy T-lymfocytov, pričom lymfocyt Th0 má potenciál sa rozvíjať do akéhokoľvek subtypu. Boli diferencované subtypy Th1 a Th2, ktoré majú protichodné regulačné účinky. Th1 produkuje ako kľúčový cytokín interferon gama s cytotoxickou funkciou pri vírusových alebo bakteriálnych infekciách. Th2 produkuje napr. interleukíny 4 a 5, zodpovedá za reguláciu B-lymfocytov a produkciu protilátok. U RS dochádza k akumulácii Th1 lymfocytov a aktivovaných makrofágov v léziách v CNS (16).

V súčasnej dobe je veľa dôkazov o tom, že RS je najmä CD4+ Th1/Th17 sprostredkovaná choroba. Toto tvrdenie je založené najmä na výsledkoch zo štúdie experimentálnej autoimunitnej encefalomyelitídy (EAE) na zvieratách (myšiach, potkanoch, opiciach). EAE je navodená subkutánnou imunizáciou aktivovanými neuroantigénmi (myelín špecifický CD4+ Th1) alebo blastickými bunkami Th17. Tieto autoreaktívne CD4+ T-lymfocyty sú dostačujúce k vyvolaniu zápalovej demyelinizačnej choroby podobnej RS (17).

Dôležitými lymfocytmi v patogenéze RS sú vyššie zmienené lymfocyty Th17, ktoré boli nájdené v aktívnych léziách u pacientov s RS. Pre vyzrievanie lymfocytov do tohto subtypu je nutná prítomnosť prozápalových a regulačných cytokínov, napr. IL 6, IL 17, IL 21, IL 23 atď.

Aktivita lymfocytu Th17 je regulovaná ďalším subtypom T-lymfocytov, tzv. Treg lymfocytom. V léziách RS sa však tieto T reg lymfocyty nevyskytujú (16).

Postupne pribúda stále viac štúdií zaoberajúcich sa úlohou melatonínu u RS a s tým súvisiaca ďalšia úloha T-lymfocytov. Koža je hlavným orgánom, ktorý je citlivý na expozíciu slnečného žiarenia. Hladina melatonínu je závislá na expozícii svetla. Skúma sa súvislosť medzi expozíciou svetlom a rizikom rozvoja RS. V koži u predisponovaných jedincov cytokíny priťahujú pamäťové s antigénom asociované T-lymfocyty (tzv. CLA+ T-lymfocyty), ktoré sa potom podieľajú na udržiavaní lokálneho zápalu. Po odoznení tohto zápalu však CLA + lymfocyty pretrvávajú v cirkulácii a niektoré z nich môžu prestupovať cez hematoencefalickú bariéru do mozgu a spustiť tým zápalovú odpoveď v CNS. Prostriedkom na skúmanie súvislosti medzi zápalovým ložiskom na koži a rozvojom RS je skúmanie sérových hladín chemokínu CCL27. CCL27 je uvoľňovaný aktivovanými keratinocytmi a je zvýšený u zápalových postihnutí kože (18). Práca, ktorá dokladuje zvýšené hladiny tohto chemokínu u pacientov s RS, bola publikovaná v januári 2017 Nataliyou L. Blatt a kol. Táto skupina autorov predpokladá tiež, že vyššie hladiny CCL27 u MS súvisia so sezónnymi zmenami slnečného žiarenia a jeho vplyvu na kožu.

2.3.3 Úloha B-lymfocytov u RS

V minulosti bola úloha B-lymfocytov v patogenéze autoimunitných chorôb, vrátane roztrúsenej sklerózy, považovaná za minoritnú. Až relatívne nedávno bola, okrem úlohy T-lymfocytov, v imunopatogenéze RS zistená aj významná úloha B-lymfocytov.

B-lymfocytárna odpoveď je regulovaná T-lymfocytmi. Predpokladá sa, že u autoimunitných chorôb dochádza k nesprávnej kontrole dozrievania B-lymfocytov už v germinálnych centrách a tým je poskytnutý priestor pre vznik autoreaktívnych B-lymfocytov. Ďalej je možné, že pri dozrievaní B-lymfocytov kooperácia medzi receptormi imunitného systému (ako sú toll-like receptory-TLR) a receptormi B-lymfocytov umožňuje B-lymfocytom dosiahnuť aktivačný prah a prekročiť tým toleranciu imunity (19).

Štúdie ukázali, že B-lymfocyty u RS sú lokalizované vo viacerých subkompartmentoch CNS, t.j. v mozgomiechovom moku, v parenchýme a meningách (20). U RS dochádza lokálne k diferenciácii B-lymfocytov. Tieto B-lymfocyty u RS exprimujú v mozgomiechovom moku a v mozgových léziách predovšetkým antigén CD 20 (16). B-lymfocyty sa nachádzajú v aktívnych infiltrátoch u skorého štádia RS. Sú lokalizované jednak perivaskulárne a jednak v okolitom parenchýme. Akumulácia B-lymfocytov na leptomeningách je typická pre

progresívne formy RS (21). Štúdie zaoberajúce sa cytológiou likvoru zistili, že vzťah medzi počtom B-lymfocytov a ostatnými bunkami v likvore môže byť spojený so závažnosťou RS a progresiou choroby. Najmä, že vyšší počet B-lymfocytov (prevaha B-lymfocytov v likvore) je spojený s rýchlejšou progresiou choroby, zatiaľ čo nižší počet B-lymfocytov (prevaha monocytov v likvore) je spojená s pomalšou progresiou choroby (22).

Stále však ostáva otázka, aká je presná úloha B-lymfocytov u RS. Na patogenéze RS sa môžu podieľať produkciou protilátok, transportom autoantigénov z tkaniva k sekundárnym orgánom imunitného systému, ďalej prezentáciou autoantigénov T-lymfocytom a sekréciou cytokínov (23). B-lymfocyty sú obzvlášť efektívne v prezentácii antigénov T-lymfocytom.

T-lymfocytom perzentujú antigény, ktoré sú najskôr rozpoznané B cell receptorom (BCR).

B-lymfocyty ďalej regulujú lokálnu zápalovú odpoveď T-lymfocytov aj myeloidných buniek, a to sekréciou prozápalových aj protizápalových cytokínov (24).

Ďalším zaujímavým faktom je, že komplementový C2 receptor exprimovaný CD27 B-lymfocytmi je tiež koreceptorom u vírusu Epstein- Barovej (EBV), kde sa uplatňuje pri infikovaní B buniek (25). Väčšina buniek v MS léziách sú CD27 antigén pozitívne, a tým sa teda aj vysvetľuje súvislosť a úloha EBV infekcie u RS (26).

Autoreaktívne T-lymfocyty aj B-lymfocyty a ostatné zložky autoimunitných pochodov sú terčom biologickej liečby RS, či už súčasnej alebo výskumnej.

2.4 Formy RS

RS má niekoľko foriem. Sú to klinicky izolovaný syndróm (CIS), relabujúca remitentná RS (RR RS), sekundárne progresívna forma RS (SP RS), primárne progresívna forma RS (PP RS), relabujúca progredujúca forma RS (RP RS). CIS je v podstate prvý atak RS, s rizikom konverzie do definitívnej RS. Najčastejšou formou je relabujúca remitentná RS, kedy po ataku s fokálnym alebo multifokálnym postihnutím dochádza k remisii ochorenia. Po prvom ataku dochádza k relapsu ochorenia cca u 25 % pacientov, u 50 % pacientov v priebehu 3 rokov. U niektorých pacientov konvertuje RR RS do štádia sekundárnej progresie, kedy už nedochádza k relapsom a remisiám, ale k postupnému zhoršovaniu neurologickej symptomatiky. U PP RS nedochádza po prvom ataku k úprave neurologickej symptomatiky, tá postupne progreduje a nemá atakovitý charakter. U vzácnej formy RP RS dochádza postupne k progresii neurologického deficitu, ale súčasne dochádza k rozvoju atakov. Pri

relapse sa väčšinou neurologický deficit ešte prehĺbi. Okrem týchto klasických foriem, ktoré sa prejavia klinickým deficitom, či už pri ataku alebo pri progresii choroby, rozlišujeme ešte rádiologicky izolovaný syndrom (RIS). Pacient s RIS má vysoko suspektný nález na MR z demyelinizačného ochorenia typu RS, ale bez akýchkoľvek klinických symptómov svedčiacich pre RS. U týchto pacientov sú väčšinou prítomné oligoklonálne IgG v likvore (33).

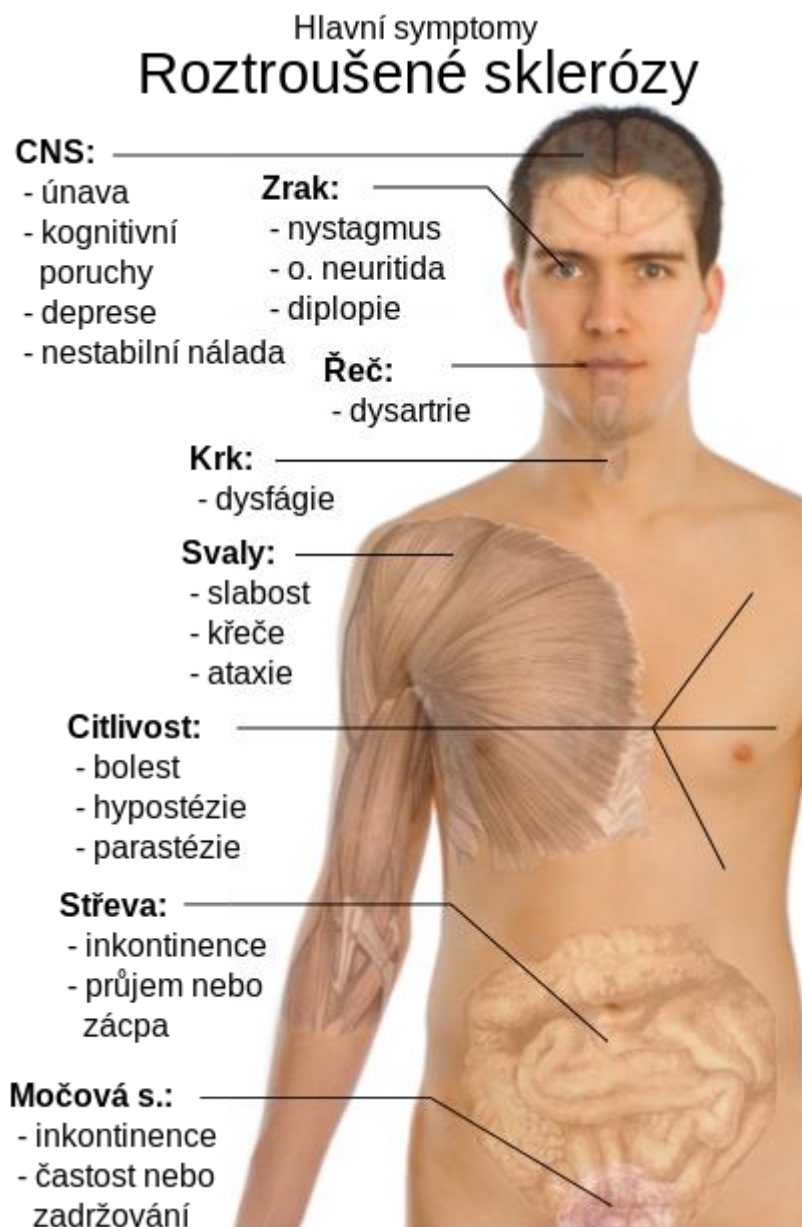
2.5 Symptómy RS

Klinická symptomatika u RS je rôznorodá a závisí na lokalizácii demyelinizačných ložísk mozgu a miechy. Jedným z najčastejších prvých príznakov je retrobulbárna neuritída prejavujúca sa zahmleným videním, bolesťami pri pohybe bulbu, výpadkami zorného poľa, poruchou farbcitu. Ďalšími častými iniciálnymi príznakmi sú poruchy citlivosti rôzneho charakteru (hypestézie, parestézie, dysestézie). Poruchy hybnosti bývajú centrálného typu s vyššími reflexami a pozitívnymi patologickými kožnými reflexami, a najmä v neskorších štádiách sprevádzané spasticitou. Často bývajú demyelinizačné ložiská lokalizované infratentoriálne v oblasti mozgového kmeňa, a preto môžu byť prítomné príznaky postihnutia rôznych hlavových nervov. Najčastejšie sa vyskytujú poruchy oko-hybných nervov sprevádzané nystagmom a diplopiou. Menej často sa vyskytuje postihnutie nervus trigeminus a nervus facialis. Ďalším častým príznakom je cerebelárny syndróm vyjadrený poruchou koordinácie pohybov, poruchou rovnováhy, dysartriou, atypickou sakadovanou mozočkovou rečou, intenčným tremorom a nystagmom. Pokiaľ sa tieto príznaky vyskytujú v úvode choroby, možno predpokladať agresívnejší priebeh RS. U chorých sa ďalej vyskytujú sfinkterické poruchy, a to u niektorých už pri prvých príznakoch. Bývajú rôzneho charakteru: časté nutkanie na močenie, urgentné močenie, inkontinencia, retardácia alebo retencia moču. Vzhľadom k tomu, že ide o chorobu mladých ľudí, je veľmi invalidizujúci výskyt sexuálnych dysfunkcií u žien aj mužov.

U niektorých pacientov dochádza k rozvoju epileptických záchvatov a dysautonómnych porúch (napr. dysfagia, obstipácia, ortostatická hypotenzia a porucha srdcového rytmu).

RS je často spojená aj s psychiatrickými symptómami. Najčastejšie sú to depresie a anxieta. Môže sa vyskytnúť emočná inkontinencia, kedy sa striedajú nekontrolované stavy šťastia, smútku bez zjavnej vyvolávajúcej príčiny. S progresiou choroby dochádza k rozvoju kognitívnych porúch. Vysoké percento pacientov si sťažuje na únavu, ktorá je u RS

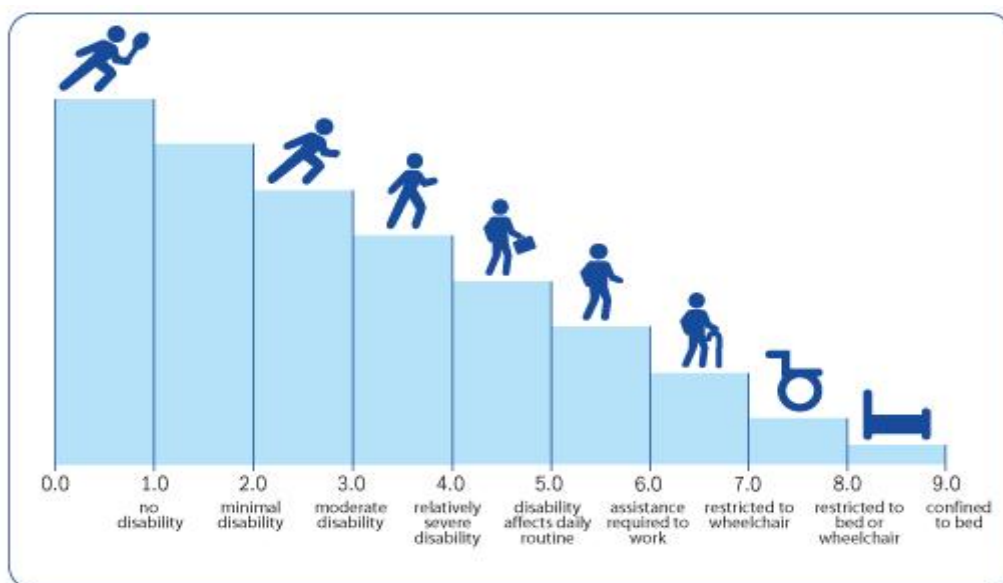
multifaktoriálna. Podieľa sa na nej prenos nervového vzruchu menším počtom nervových vlákien, prítomnosť zápalových cytokínov a protilátok difúzne v CNS a vplyv týchto protilátok na normálnu neurotransmisiu (15). Na obrázku 2 sú prehľadne znázornené najčastejšie klinické príznaky RS.



Obr. 2 Klinické příznaky RS (27)

K posúdeniu a vyjadreniu závažnosti neurologického deficitu používame v dnešnej dobe škálu EDSS (expanded disability status scale - rozšírená škála k posúdeniu disability), tzv. Kurtzkeho škála. Táto škála má 10 stupňov a hodnotí jednotlivé funkčné systémy, t.j. zrakový, kmeňový, motorický, mozočkový, senzitivny, sfinkterový a mentálny (28).Prehľad škály EDSS je na obrázkoch 3 a 4.

Obr. 3 Grafické znázornenie škály EDSS (29)



Obr. 4 Kurtzkeho škála EDSS (30)

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 se střední 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 FS stupně 0 nebo 1)
4	schopnost chůze bez pomůcky a odpočinku na alespoň 500 m, činnost 12 h denně 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 300 m, 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 200 m (ekvivalentem FS je 1x stupeň 5 a ostatní 0 nebo 1 nebo kombinace nižších stupňů překračující definici pro stupeň 4,5)
5,5	schopnost ujít bez pomoci a odpočinku 100 m
6	nutná jednostranná opora (hůl, berle) k ujití alespoň 100 m bez přestávky nebo s přestávkou
6,5	chůze s oboustrannou oporou (hole, berle) na alespoň 20 m bez přestávky
7	pacient není schopen ujít ani 20 m s oporou, převážně odkázán na vozík, na kterém se přepravuje sám, tráví na vozíku bděle alespoň 12 h
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

2.6 Paraklinické vyšetrenia

RS je podľa McDonaldových revidovaných kritérií predovšetkým diagnóza klinická. (Obr.5). Ale štandardne sa využívajú aj paraklinické vyšetrenia. Pomocnou vyšetrovacou metódou v diagnostike RS je najmä zobrazenie mozgu a miechy pomocou magnetickej rezonancie (MR), kde nájdeme demyelinizačné ložiská, ktoré sú v T2 vážených obrazoch a v sekvenciách FLAIR hyperintenzívne. Typické uloženie je suprantenoriálne v mozgových hemisférach periventrikulárne a juxtakortikálne, ďalej infratentoriálne v ktorejkoľvek časti mozgového kmeňa a mozočku. Ložiská RS bývajú prítomné aj v mieche, a to najčastejšie v krčnej.

Obr. 5 McDonalddove revidované kritéria (31)

Tab. 1 Revidovaná McDonalddova diagnostická kritéria roztroušenej sklerózy (Polman, 2010)		
Klinický obraz ATAKY	Klinický obraz OBJEKTIVNÉ LÉZIE	Doplňujúce údaje potrebné k dg RS
2 alebo viac*	2 alebo viac	žiadne, klinická symptomatika je dostatočná
2 alebo viac	1	- diseminácia v priestore dle MR mozku: ≥ 1 T2 lézie minimálne vo 2 z 4 MS typických oblastí CNS (periventrikulárne, juxtakortikálne, infratentoriálne alebo v mieše) nebo - ďalšia klinická ataka z inej lokalizácie
1	2 alebo viac	- diseminácia v čase podľa MR (súčasná prítomnosť asymptomatickej Gd-enhancujúcej lézie a neenhancujúcej lézie) alebo nová T2 a/nebo Gd-enhancujúca lézia na nasledujúcom MR v srovnaní k MR vstupní nebo druhá klinická ataka
1	1	- diseminácia v priestore podľa MR mozku: ≥ 1 T2 lézie minimálne vo 2 z 4 MS typických oblastí CNS (periventrikulárne, juxtakortikálne, infratentoriálne alebo v mieše) - diseminácia v čase podľa MR (súčasná prítomnosť asymptomatickej Gd-enhancujúcej lézie a neenhancujúcej lézie alebo nová T2 a/nebo Gd-enhancujúca lézia na nasledujúcom MR v srovnaní k MR vstupní nebo - ďalšia klinická ataka z inej lokalizácie
0 (progrese od počiatku)	1	progrese nemoci po 1 rok (retro- či prospektívne) a najmenej 2 z 3 nasledujúcich: • pozitívny MR mozku: ≥ 1 T2 lézie minimálne vo 2 z 4 MS typických oblastí CNS (periventrikulárne, juxtakortikálne, infratentoriálne alebo v mieše) s pozitívnymi VEP • pozitívny MR miechy (2 a viac fokálnych T2 lézií) • pozitívny likvor na OCB a/nebo IgG syntéza

*Ataka (relaps) je definovaná ako pacientom udávané alebo objektívne pozorovateľné objavenie sa nových neurologických obtíží, event. zhoršenie príznakov stávajúcich, typická pre akútne vzplanutí demyelinizačného ochorenia, trvajúci minimálne 24 hodín trvale mimo infekčného ochorenia a febrilie.

Zlatým štandardom je vyšetrenie mozgovomiechového moku (likvoru) a zhodnotenie syntézy oligoklonálnych IgG pásov (pomocou elektroforézy zhodnotením ich prítomnosti alebo neprítomnosti v sére a likvore). V súčasnosti je už štandardne zavedené aj vyšetrenie voľných ľahkých reťazcov kappa a lambda.

Na základe prítomnosti alebo neprítomnosti oligoklonálnej syntézy IgG rozlišujeme 5 vzorcov (Obr.6):

Vzorec I - neprítomnosť oligoklonálnej syntézy, jedná sa o normálny nález,

Vzorec II - oligoklonálna syntéza prítomná iba v likvore, jedná sa o lokálnu syntézu IgG, typický vzorec pre RS,

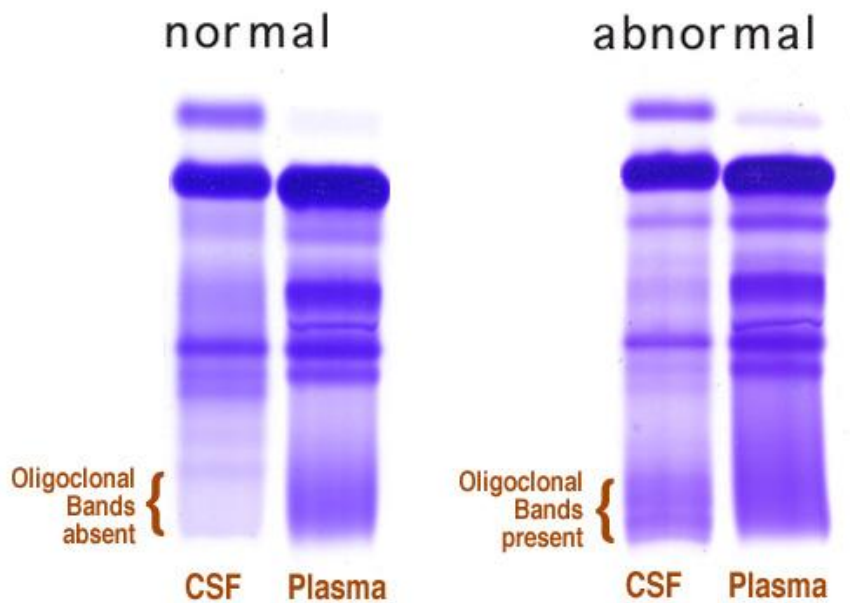
Vzorec III - prítomnosť oligoklonálnej syntézy IgG v likvore aj sére, ale v likvore je prevaha pásov, tiež u roztrúsenej sklerózy alebo chronických infekcií CNS,

Vzorec IV- identický počet oligoklonálnych IgG pásov v sére aj livore, typické pre systémové ochorenia,

Vzorec V- prítomnosť monoklonálneho paraproteínu v likvore, typický nález pre myelom a monoklonálne gamapatie.

Obr.6 Obrázok porovnávajúci normálny a patologický nález (RS) pri elektroforéze (32)

Oligoclonal Bands in CSF



Poslednou bežne využívanou pomocnou metódou je vyšetrenie zrakových evokovaných potenciálov (VEP). U pacientov s RS, ktorí mali atak s retrobulbárnou neuritídou, nájdeme pri tomto vyšetrení predĺženú latenciu vlny P100.

2.7 Liečba RS

Liečba RS závisí na jej forme a priebehu.

2.7.1 Liečba CIS a RR RS

Na liečbu RS vo forme CIS alebo RRRS je v súčasnej dobe k dispozícii tzv. DMD (disease modifying drug) terapie. Rozdeľuje sa na terapiu prvej a druhej línie. Keďže sa jedná o finančne nákladnú liečbu, pri jej nasadzovaní musia pacienti splniť určité kritéria podľa úhradovej vyhlášky.

2.7.1.1 DMD terapia 1. línie

K preparátom liečby prvej línie patria: interferon beta 1a (preparáty Avonex, Rebiff 22 a Rebiff 44), interferon beta 1b preparáty Extavia, Betaferon), glatiramer acetát (preparát Copaxone) a teriflunomid (preparát Aubagio). Pre liečbu CIS sa môžu požívať všetky uvedené preparáty okrem Rebiffu 22, ktorý nemá schválenú úhradu. Pre liečbu RR RS sa môžu používať všetky uvedené preparáty.

Nasadiť terapiu z indikácie CIS a RR RS podľa úhradovej vyhlášky platnej v Českej republike je možné:

1. u pacientov s aktívnym zápalovým procesom s vysokým rizikom prechodu do klinicky definitívnej RS, u ktorých bol prvý atak tak závažný, že k jeho liečbe bolo nutné podať kortikoidy intravenózne a zároveň bola vylúčená iná možná diagnóza.
2. pre liečbu pacientov s istou diagnózou atakovitej formy RS v remitentnom štádiu choroby, pokiaľ je prítomná vysoká aktivita choroby (t.j. 2 dokumentované a liečené relapsy za 1 rok alebo 3 relapsy za posledné 2 roky) a invalidita nepresahuje stupeň EDSS 4.5.

Liečba sa ukončuje pri neefektivite, t.j. 2 ťažké relapsy za rok, EDSS zvýšené o 1 stupeň behom 12 mesiacov, alebo pri strate schopnosti chôdze.

Dlhodobú liečbu (dlhšie ako 2 - 4 roky) musí schváliť a zároveň garantovať vedúci lekár špecializovaného pracoviska, t.j. Centra pre diagnostiku a terapii demyelinizačných ochorení. (informácie o úhradách čerpané z webovej stránky www.sukl.cz)

2.7.1.1.1 Interferóny

Do tejto skupiny patria preparáty:

Avonex- jedná sa o interferon beta 1 a, aplikuje sa intramuskulárne 1x týždenne

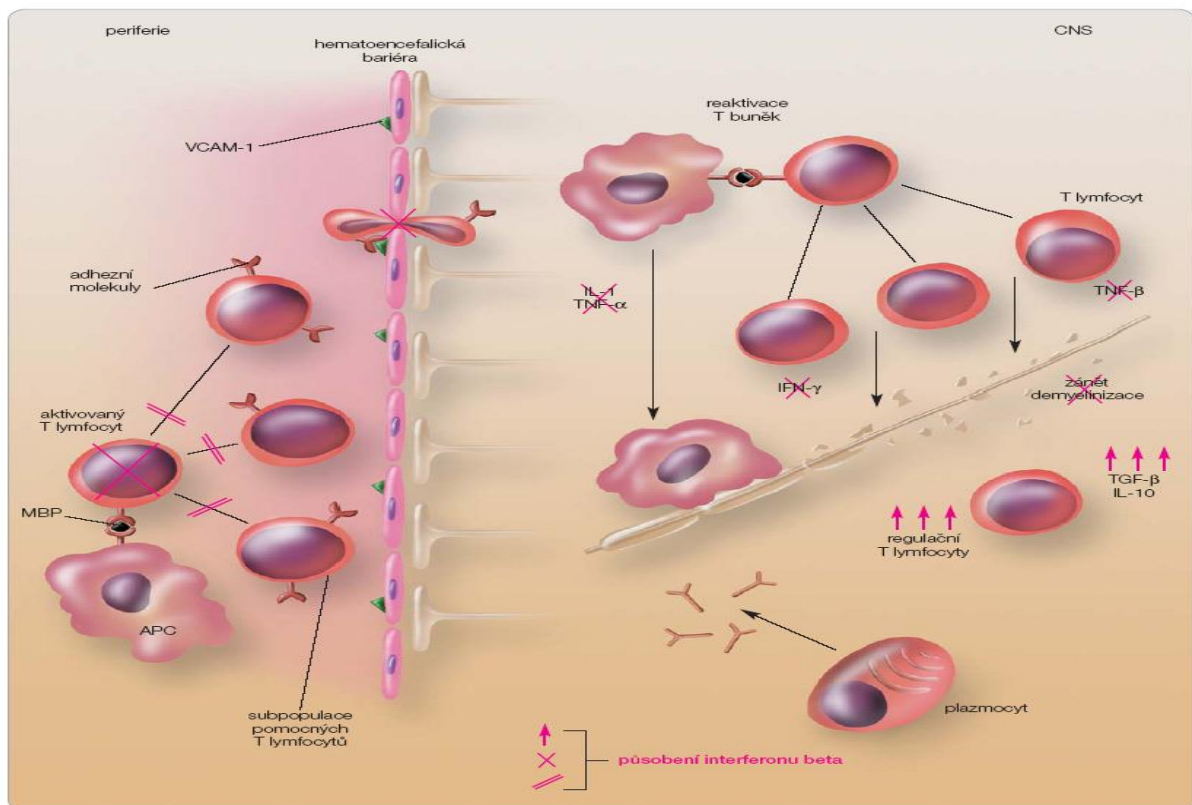
Rebiff 22 a Rebiff 44 - sú taktiež interferony beta 1a, aplikujú sa subkutánne 3x týždenne

Extavia, Betaferon- jedná sa o interferony beta 1b a aplikujú sa subkutánne obdeň

Interferóny sú telu vlastné látky.

Popis mechanizmu účinku interferónov je súčasťou obrázku 7.

Obr. 7 Grafické znázornenie mechanizmu účinku interferónu beta (34)



Obr. 1 Schematické znázornění patogeneze roztroušené sklerózy a místa zásahu interferonu beta.

T lymfocyt je aktivovaný na periférii rozpoznáním antigenu předkládaného makrofágem, množí se a přestupuje hematoencefalickou bariéru. Ve tkáni rozpoznává specifický antigen a produkovanými prozánětlivými cytokiny aktivuje makrofágy a mikroglia. Do CNS jsou přitahovány i B lymfocyty a cytotoxické lymfocyty, které se podílejí na ničení myelinu a axonů. Interferon beta omezuje aktivaci a proliferaci specifických T lymfocytů, kterým makrofág nabízí antigen, zavírá hematoencefalickou bariéru, a tím omezuje zánět v CNS: produkci prozánětlivých cytokinů (IL-1, TNF- α , TNF- β , IFN- γ) a demyelinizaci. Zvyšuje naopak přítomnost regulačních lymfocytů produkujících IL-10 a TGF- β .

MBP – myelinový bazický protein

Tieto preparáty znižujú počet atakov o 40%. Účinnosť liečby je monitorovaná prostredníctvom neutralizačných protilátok (NAbs), klinicky význam je pri hodnotách nad 100 TRU/ml. Ku stanoveniu biologickej účinnosti interferónov pri vysokých titroch NAbs sa stanovuje hladina myxovírus rezistencie proteínu A (MxA). Uplatňuje sa v procese antivírusovej rezistencie a je indukovaný interferónmi. Nízka hodnota MxA (pod 160) znamená malú biologickú účinnosť.

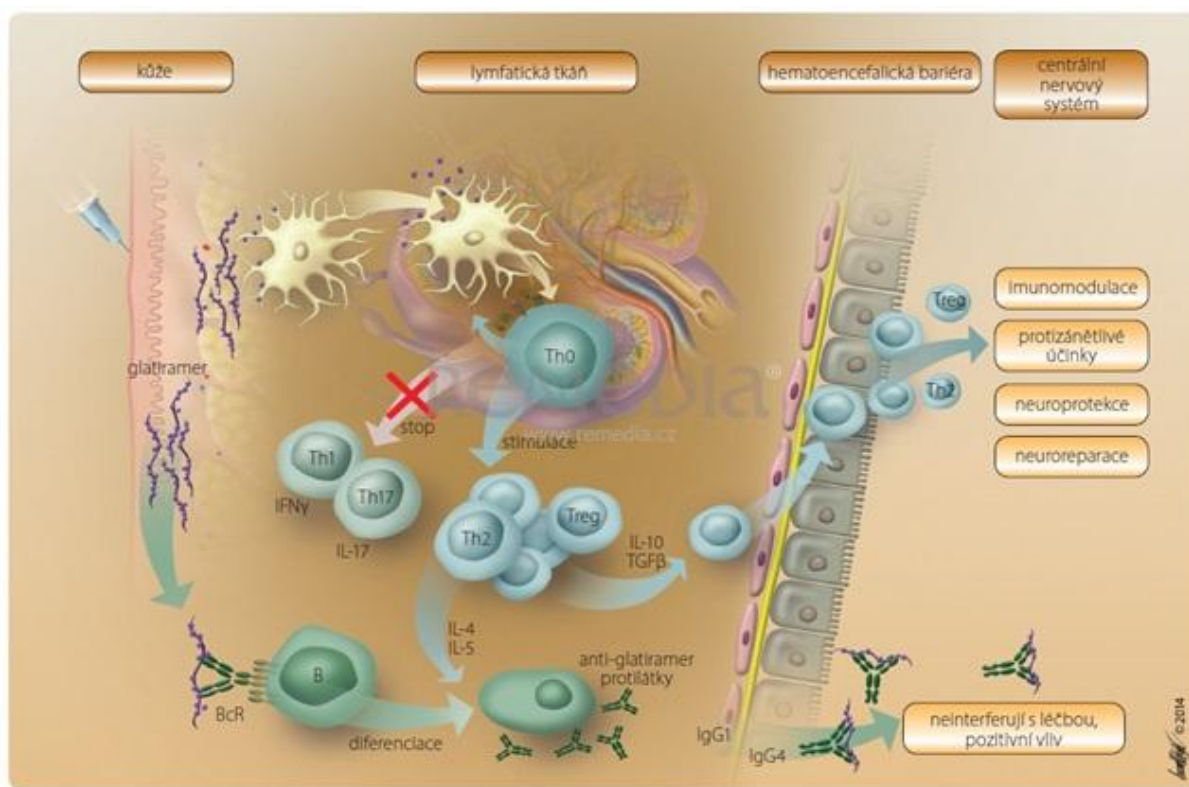
Najčastejšie nežiaduce účinky tejto terapie sú flu-like syndróm (chrípke podobný syndróm), lokálne reakcie po aplikácii, zmeny nálad, depresie, elevácia pečenej enzýmov, lymfopénia, trombocytopénia, tvorba protilátok proti štítnej žľaze a liekmi indukovaný systémový lupus erythematosus.

2.7.1.1.2 Glatiramer acetát

Do tejto skupiny patrí jediný preparát s rôznou dávkou účinnej látky, a to Copaxone 40 mg, ktorý sa aplikuje subkutánne 3x týždenne alebo Copaxone 20 mg, ktorý sa aplikuje každý deň subkutánne.

Chemicky je glatiramer acetát zmes peptidov, ktoré sú zložené z aminokyselín alaninu, lyzínu, tyrozínu a kyseliny glutamovej. Tieto peptidy napodobňujú autoreaktívne epitopy MBP. Mechanizmus účinku nie je presne známy. Predpokladá sa ale indukcia antigénne špecifických imunoregulačných Th2 lymfocytov v periférii s ich následným prestupom cez hematoencefalickú bariéru do CNS. V CNS pôsobia ako inhibítory poškodzujúcich Th1 lymfocytov a predpokladá sa aj produkcia neutrofných faktorov, ktoré sú schopné chrániť bunky pred poškodením zápalom (35). Mechanizmus účinku glatiramer acetátu je znázornený na obr.8.

Obr. 8 Mechanizmus účinku glatiramer acetátu (36)



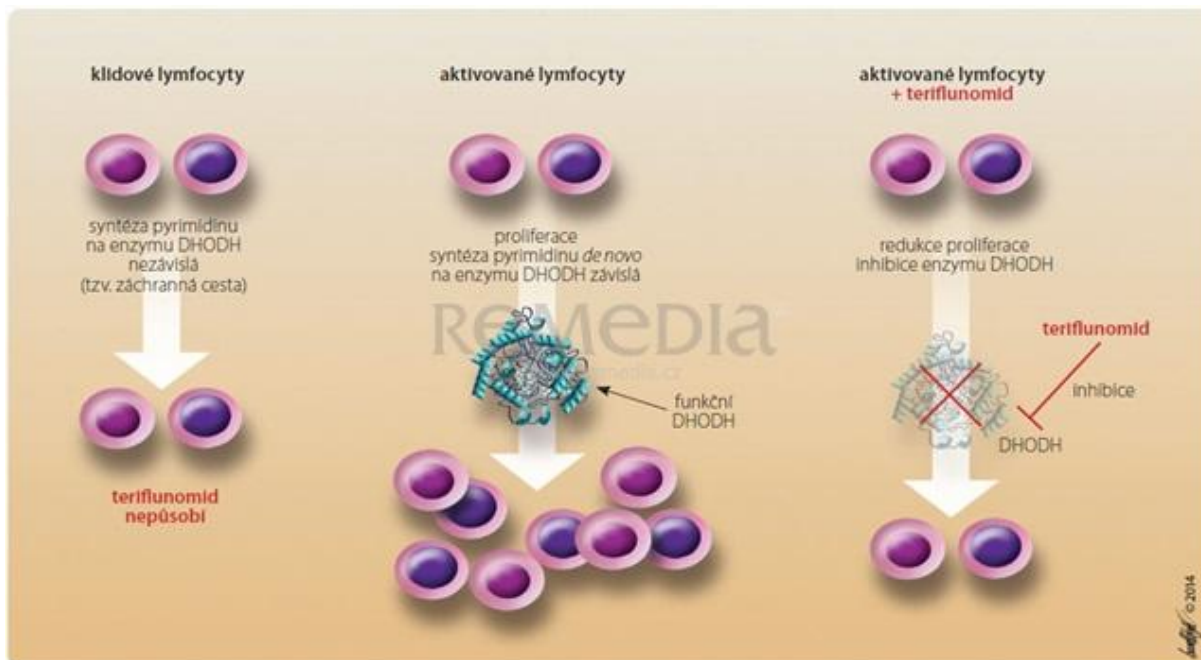
Najčastejším nežiaducim účinkom tejto liečby sú lokálne reakcie charakteru zatvrdlín až lipodystrofií. Ďalším možným nežiaducim účinkom je systémová postinjekčná reakcia s vazodilatáciou, návalmi tepla, bolesťou na hrudi, dušnosťou, palpitáciami alebo tachykardiou.

2.7.1.1.3 Teriflunomid

Preparátom z účinnou látkou teriflunomid je Aubagio. Užíva sa 14 mg teriflunomidu denne, je jediným perorálnym preparátom v DMD terapii 1. línie.

Jedná sa o aktívny metabolit leflunomidu, ktorý sa používa v terapii revmatoidnej artritídy. Viaže sa na mitochondriálny enzým dihydroortát dehydrogenázu, čím inhibuje syntézu pyrimidínov u rýchlo proliferujúcich buniek. Pyrimidín je potrebný pre rýchlo sa deliace aktívne T-lymfocyty a B-lymfocyty k replikácii DNA (37). Mechanizmus účinku teriflunomidu je znázornený na obr. 9.

Obr. 9 Mechanizmus účinku teriflunomidu (38)



Teriflunomid je všeobecne tolerovaný dobre, ale môžu sa vyskytnúť nežiaduce účinky. Medzi nežiaduce účinky patria gastrointestinálne ťažkosti, elevácia pečeňových testov, útlm kostnej drene, vypadávanie vlasov a zvýšenie krvného tlaku. U niektorých pacientov sa zvyšuje frekvencia infekcií, najmä horných dýchacích ciest. V úvode liečby sa môže vyskytnúť aj vypadávanie vlasov, ale podľa štúdií sa kvalita aj množstvo vlasov v priebehu prvého polroka obnovia (37).

Zvýšenú opatrnosť je potrebné mať pri liečbe žien vo fertilnom veku, pretože tento preparát má teratogénny potenciál a zároveň má dlhý eliminačný polčas, 8 mesiacov až 2 roky. Ženy vo fertilnom veku by preto mali užívať počas liečby teriflunomidom účinnú antikoncepciu (39).

V prípade nežiadúcich účinkov alebo zistenia gravidity je možná zrýchlená eliminácia teriflunomidu z organizmu. K dispozícii sú dve možnosti. Prvou je užívanie cholestyramínu v dávke 8 g 3x denne po dobu 11 dní. Druhou možnosťou je užívanie aktívneho uhlia v dávke 50 g denne po dobu 11 dní. Častejšie používanou je prvá možnosť. Kontrolné odbery hladiny teriflunomidu v krvi sa robia 12. deň od začiatku užívania cholestyramínu a ďalšia kontrola

s odstupom ďalších 14 dní. Obidva výsledky musia byť negatívne, t.j. hladina teriflunomidu pod 0,02 mg/l. Pokiaľ by bola jedna alebo obidve skúšky pozitívne, musí sa eliminačný proces opakovať (40).

2.7.1.2 DMD terapia 2. línie

K preparátom liečby druhej línie patria: dimethyl fumarát (preparát Tecfidera), fingolimod (Gilenya), natalizumab (Tysabri) a alemtazumab (Lemtrada). Každý z týchto preparátov má podľa úhradovej vyhlášky rozdielne podmienky nasadenia a preto budú popísané úhradové podmienky pri každom preparáte zvlášť.

2.7.1.2.1 Dimethyl fumarát

Nasadiť túto terapiu podľa úhradovej vyhlášky platnej v Českej republike je možné:

1. U pacientov s RR RS, u ktorých sú známky nepriaznivej prognózy ochorenia, a u ktorých došlo aj napriek liečbe DMD 1. línie k rozvoju aspoň jedného stredne ťažkého alebo ťažkého relapsu.
2. U pacientov s rýchlo progredujúcou závažnou formou RR RS, ktorí prekonal najmenej dva relapsy behom jedného roku a súčasne vykazujú jednu alebo viac gadolínium enhancujúcich lézií na MR mozgu alebo zvýšenie objemu T2 lézií v porovnaní s predchádzajúcou MR.

Podľa úhradovej vyhlášky k liečbe dimethyl fumarátom nie sú indikovaní pacienti s hodnotou EDSS nad 5.0. Liečba je ukončená alebo prerušená pri výskyte závažných infekcií až do okamihu ich vyriešenia. Ďalej, pokiaľ je inefektivita liečby, napr. pri progresii disability (zvýšenie EDSS o 1 stupeň behom 12 mesiacov) alebo ak pacient prekonal pri tejto terapii dva ťažké relapsy za rok.

(informácie o úhradách čerpané z webovej stránky www.sukl.cz)

Jedná sa o perorálny preparát s užívaním v dávke 240 mg 2x denne. V štúdiách bolo dokázané zníženie počtu relapsov za rok o 32 % a 69 % aktívnych lézií na MR v porovnaní s placebom.

Presný mechanizmus účinku dimethyl fumarátu nie je známy. Isté je, že po užití je metabolizovaný esterázami črevných buniek na svoju aktívnu formu, ktorou je monomethyl fumarát. Ďalej sa predpokladá aktivácia transkripčného faktoru Nrf2. Prostredníctvom tohto faktoru sa zvyšuje expresia proteínov napomáhajúcich ochrane bunky pred oxidatívnym stresom. Ďalej inhibuje produkciu prozápalových cytokínov a chemokínov (41). Mechanizmus účinku je znázornený na obrázku 10.

Najčastejšie nežiaduce účinky vyskytujúce sa najmä v úvode terapie sú návaly tepla v tvári, niekedy s nutnosťou užívania súčasnej terapie kyselinou acetylsalicylovou. Ďalšími častými nežiaducimi účinkami sú gastrointestinálne problémy s nauzeou, vomitom, bolesťami brucha a hnačkami. Preto by sa v rámci preventívnych opatrení mal dimethyl fumarát užívať s jedlom alebo počas jedla. Ďalším preventívnym opatrením je postupné nasadenie terapie, kedy liečbu začíname polovičnou dávkou 2x 120 mg denne po dobu 1 - 4 týždňov a až potom prechádzame na plné dávkovanie 2x 240 mg denne. Do mesiaca tráviace ťažkosti vo väčšine prípadov ustupujú. Niekedy symptomaticky podávame antacída, omeprazol alebo iné inhibítory protónovej pumpy (43). Z odberov je nutné sledovať hladiny pečeňových enzýmov a lymfocytov. V štúdiách bol pozorovaný pokles absolútneho počtu lymfocytov asi o 30 % v porovnaní s hodnotami pred nasadením terapie, ale vo väčšine prípadov boli hodnoty v medziach normy. Pri poklese absolútneho počtu lymfocytov pod $0,5 \times 10^9/l$ je doporučené liečbu prerušiť (44).

2.7.1.2.2 Fingolimod

Nasadiť túto terapiu podľa úhradovej vyhlášky platnej v Českej republike je možné:

1. U pacientov s RR RS, u ktorých sú známky nepriaznivej prognózy ochorenia a u ktorých došlo aj napriek liečbe DMD 1. línie k rozvoju aspoň jedného stredne ťažkého alebo ťažkého relapsu.
2. U pacientov s rýchlo progredujúcou závažnou formou RR RS, ktorí prekonalí najmenej dva relapsy behom jedného roku a súčasne vykazujú jednu alebo viac gadolínium enhancujúcich lézií na MR mozgu alebo zvýšenie objemu T2 lézií v porovnaní s predchádzajúcou MR.

Podľa úhradovej vyhlášky k liečbe fingolimodom nie sú indikovaní pacienti s hodnotou EDSS nad 5.5. Liečba je ukončená pokiaľ je inefektivita liečby, napr. pri trvalej progresii disability (zvýšenie EDSS o 1 stupeň behom 12 mesiacov mimo ataku alebo pri strate schopnosti chôdze, t.j. dosiahnutie EDSS nad 6.5), alebo ak pacient prekonal pri tejto terapii dva ťažké relapsy za rok.

(informácie o úhradách čerpané z webovej stránky www.sukl.cz)

Jedná sa o perorálny preparát, podávaný v dávke 0,5 g 1x denne. Fingolimod je modulátor sfingosin 1- fosfátového receptora, je metabolizovaný sfingosin kinázou na aktívny metabolit fingolimod fosfát, ktorý sa viaže na S1P₁ receptor v lymfocytoch. Mechanizmus jeho účinku spočíva v inhibícii infiltrácie autoreaktívnych lymfocytov z lymfatických uzlín do CNS (45, obr.10). Dochádza vlastne k zadržaniu lymfocytov v lymfatických uzlinách a tým nastane ich deplécia v krvnom obehú až na 30 % pôvodných hodnôt. Tento efekt je reverzibilný a po vysadení fingolimodu z liečby sa počet lymfocytov vracia do pôvodných hodnôt (46). V štúdiách bol zistený pokles relapsov za rok o 55 % a taktiež pokles aktivity v magnetickorezonančných parametroch v porovnaní s placebom. Vzhľadom k vyššie uvedenému mechanizmu účinku je jedným z nežiaducich účinkov liečby aj lymfopénie. Pokiaľ poklesne absolútny počet lymfocytov pod 0,2 g/l je nutné liečbu ukončiť. S lymfopéniou súvisí aj ďalší nežiaduci účinok a tým je rozvoj infekcií najmä horných ciest dýchacích a herpetických infekcií. Pred nasadením terapie je štandardné odobrať krv na protilátky proti vírusu varicella zoster a v prípade negativity IgG protilátok je nutné podstúpiť očkovanie pred zahájením liečby. Ďalším nežiaducim účinkom je rozvoj makulárneho edému a preto by sa fingolimod nemal nasadzovať u pacientov s anamnézou uveitídy a u diabetikov, u ktorých bol dokázaný zvýšený výskyt makulárneho edému. Sfingosin fosfátové receptory sa nachádzajú okrem imunitného systému, aj v CNS a v kardiovaskulárnom systéme. Pôsobením na kardiovaskulárny systém môže fingolimod vyvolať závažné bradyarytmie, preto je jeho nasadenie u pacientov s už známou bradyarytmiou kontraindikované. Taktiež je nasadenie kontraindikované u pacientov užívajúcich betablokátory alebo antiarytmika triedy Ia (napr. chinidin, prokainamid, disopyramid) a triedy III. (napr. amiodaron, sotalol). Vzhľadom k týmto skutočnostiam je pred nasadením terapie nutné doplniť EKG vyšetrenie a v Českej republike je zavedená monitorácia pomocou EKG Holter v trvaní 6 hodín pri nasadení terapie, to znamená pri užití prvej tabletky fingolimodu. Ďalej sú nutné pravidelné odbery pečeneých enzýmov (46,47).

2.7.1.2.3 Natalizumab

Nasadiť túto terapiu podľa úhradovej vyhlášky platnej v Českej republike je možné:

1. U pacientov s RR RS, u ktorých sú známky nepriaznivej prognózy ochorenia a u ktorých došlo aj napriek liečbe DMD 1.1 ínie k rozvoju aspoň jedného stredne ťažkého alebo ťažkého relapsu.

2. U pacientov s rýchlo progredujúcou závažnou formou RR RS, ktorí prekonal najmenej dva relapsy behom jedného roku a súčasne vykazujú jednu alebo viac gadolínium enhancujúcich lézií na MR mozgu alebo zvýšenie objemu T2 lézií v porovnaní s predchádzajúcou MR.

Liečba natalizumabom je ukončená pokiaľ je inefektivita liečby, napr. pri trvalej progresii disability (zvýšenie EDSS o 1 stupeň behom 12 mesiacov mimo ataku, alebo pri strate schopnosti chôdze, t.j. dosiahnutie EDSS nad 6.5) alebo ak pacient prekonal pri tejto terapii dva ťažké relapsy za rok.

(informácie o úhradách čerpané z webovej stránky www.sukl.cz)

Natalizumab sa podáva v infúzii, ktorá obsahuje 300 mg účinnej látky. Infúzia sa aplikuje raz za 4 - 6 týždňov intravenózne. Natalizumab je humanizovaná anti alfa 4 integrín monoklonálna protilátka, ktorá viaže alfa 4 subjednotku $\alpha 4\beta 1$ a $\alpha 4\beta 7$ integrínov, blokuje ich väzbu k endoteliálnym receptorom hematoencefalickej bariéry, čím zabraňuje prestupu lymfocytov do CNS a tým zmierňuje zápal CNS. Natalizumab taktiež inhibuje interakcie medzi $\alpha 4$ pozitívnymi leukocytmi, fibronektínom a osteopontínom (48 a obr.10). Podľa štúdií dochádza k zníženiu výskytu relapsov za rok o 68 % a zníženiu progresie postihnutia o 54 %. U niektorých pacientov sa po podaní vyskytuje hypersenzitívna reakcia, nauzea, zvracanie a bolesti hlavy. Extrémne vzácna je elevácia pečeňových enzýmov.

Ako najzávažnejší nežiaduci účinok je rozvoj progresívnej multifokálnej leukoencefalopatie (PML). PML môže byť smrteľná a je spôsobená JC (John Cunningham) vírusom (JCV). Vírus JCV má asi polovica ľudí v organizme a nákaza sa objaví ako bezpríznaková infekcia v detstve. Vírus potom pravdepodobne prežíva v obličkách, v kostnej dreni a lymfatickom tkanive. Natalizumab ovplyvňuje imunitný dohľad v CNS tým, že bráni vstupu lymfocytov cez hematoencefalickú bariéru. Doteraz nie je jasný mechanizmus, vďaka ktorému dochádza k mutácii nutnej k získaniu neurovirulencie a vstupu vírusu do CNS. Po vstupe do CNS dochádza k nekontrolovateľnému množeniu JCV v oligodendrocytoch a astrocytoch. Klinicky sa PML môže spočiatku podobáť akútnemu ataku RS s rôznorodými symptómami. Najväčšie riziko preto spočíva v nerozpoznaní PML a jeho zámenu za relaps RS. Pri objavení sa epileptických záchvatov, fatických porúch a porúch kognitívnych funkcií u pacientov v terapii natalizumabom je nutné myslieť na možnosť PML. Riziko rozvoja tejto závažnej komplikácie stúpa s dĺžkou podávania terapie (za bezpečné sa považuje podávanie prvé 2 roky). Vyššie riziko je aj pri predchádzajúcom podávaní imunosuoresívnej terapie a pri pozitívite protilátok proti JCV (49). V rámci zachovania, čo najvyššej bezpečnosti pri podávaní tejto terapie sa

doporučuje kontrola protilátok proti JCV. A to nielen bežná hladina protilátok, ale dnes existuje už senzitivnejší marker označovaný ako protilátkový index JCV. Riziko rozvoja PML výrazne stúpa, pokiaľ je jeho hodnota väčšia ako 1,5 (50). Pri liečbe natalizumabom je doporučená kontrola tohto indexu každých 6 mesiacov, v prípade nárastu každé 3 mesiace. Súčasne sa doporučuje doplniť MR v rovnakom režime, najcitlivejšie na dôkaz PML sú FLAIR sekvencie. V prípade vyslovenia podozrenia na PML sa ďalej dopĺňa vyšetrenie likvoru, kde v prípade prítomnosti tejto závažnej infekcie je pozitivita JCV. Liečbu natalizumabom je nutné vysadiť už pri podozrení na PML alebo pri vysokej hodnote protilátkového indexu JCV.

2.7.1.2.4 Alemtuzumab

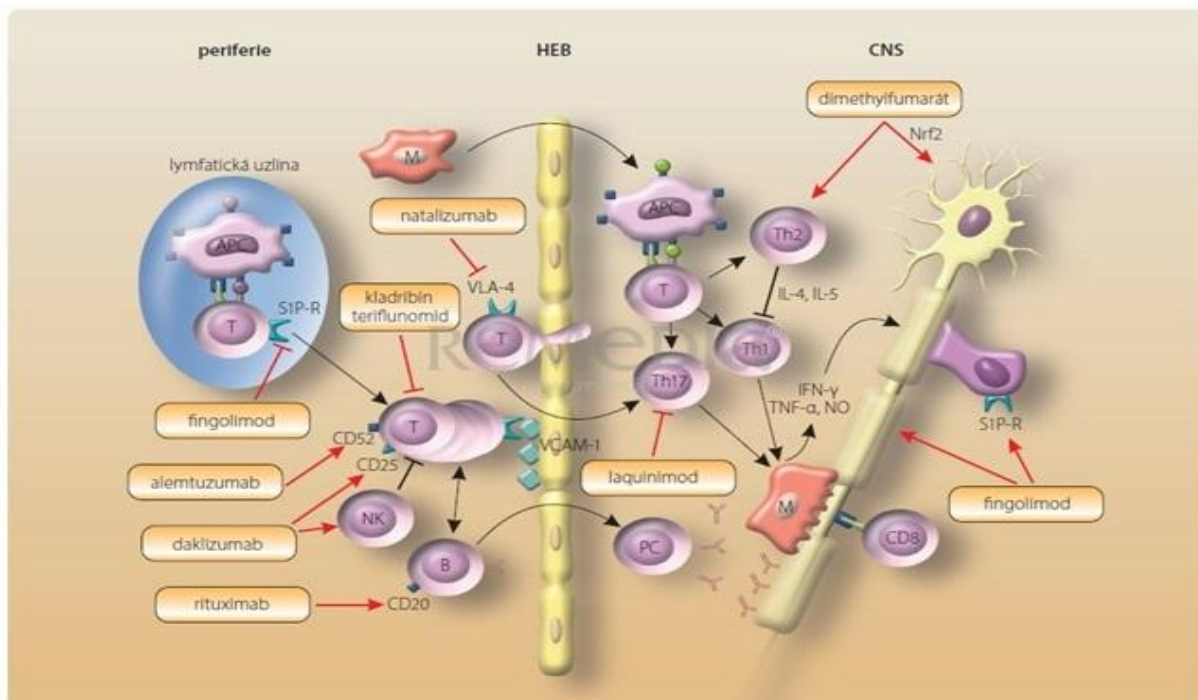
Alemtuzumab je posledným z používaných DMD liekov. Jeho úhrada v súčasnosti nie je presne vymedzená na www.sukl.cz. Liečbu týmto preparátom je nutné dať schváliť individuálne. Je zaradená medzi DMD terapiu 2. línie a používa sa u pacientov s vysoko aktívnou RS. Terapie sa podáva v dvoch intervaloch. V prvom roku sa podá 5x12 mg alemtuzumabu v infúzii 5 dní idúcich po sebe. Druhý rok sa podá 3x 12 mg alemtuzumabu 3 dni idúce po sebe.

Alemtuzumab je monoklonálna protilátka proti povrchovému proteínu CD 52, ktorý sa vyskytuje na mnohých bunkách, vrátane monocytov, T-lymfocytov a B-lymfocytov (51). Fyziologická úloha proteínu CD 52 nie je doteraz známa. Po naviazaní alemtuzumabu na povrchovú molekulu CD 52 dochádza k rýchlej a efektívnej eliminácii cirkulujúcich buniek nesúcich proteín CD 52 a to aj prostredníctvom komplementom sprostredkovanej deplécie. Mechanizmus účinku je znázornený na obr. 10. Za krátku dobu po aplikácii alemtuzumabu dochádza k poklesu lymfocytov v krvi. Dynamika repopulácie u jednotlivých buniek po liečbe alemtuzumabom je rôzna. Ako prvé sa v periférnej krvi objavia B-lymfocyty a monocyty, a to v priemere 3 - 6 mesiacov od začatia liečby. K repopulácii T-lymfocytov, a najmä CD4+ T-lymfocytov, dochádza pomalšie. Normálne hladiny dosiahnu za 2 - 3 roky a pôvodnú hladinu, aká bola pred liečbou až za 5 rokov od zahájenia liečby (52). Účinnosť alemtuzumabu bola v štúdiách porovnávaná s interferonom beta 1a. Výsledkom týchto štúdií je menší počet relapsov za rok u pacientov liečených alemtuzumabom v porovnaní s interferónom beta 1a. Zníženie výskytu počtu atakov za rok pri liečbe alemtuzumabom sa udáva v rozmedzí 49 %

v štúdiu Care MS II a 55 % v štúdiu Care MS I v porovnaní s liečbou interferónom beta 1a. V týchto štúdiách bola zistená menšia progresia disability u pacientov liečených alemtuzumabom. V neposlednej rade bol dokázaný vplyv tejto monoklonálnej protilátky na magnetickorezonančné parametre. 82 - 85 % pacientov nemalo žiadnu gadolínium enhancujúcu léziu, 52 - 54% pacientov nemalo žiadne nové ložisko na T2 vážených obrazoch, takisto bola zistená menšia miera atrofie mozgu (52, 53, 54, 55).

Najčastejším nežiaducim účinkom liečby je infúzna reakcia sprevádzaná bolesťou hlavy, exantémom, zimnicou, teplotou, pruritom a pocitom dušnosti. Vďaka premedikácii (podanie methylprednisolonu intravenózne, antipyretík a antihistaminík pred každou infúziou) bývajú však prejavy minimálne. V štúdiách bol dokázaný zvýšený výskyt herpetických infekcií, preto sa podáva v priebehu liečby alemtuzumabom a následné týždne po nej acyklovir, čím výskyt herpetických infekcií významne klesol. Pred začatím liečby je nutné pacientovi vyšetriť krvný obraz vrátane diferenciálneho rozpočtu bielych krviniek, hladinu hormónov štítnej žľazy, sérové hladiny urey a kreatinínu, močový sediment a panel protilátok proti hepatitídam. Ďalej je vhodné vyšetriť protilátky proti HIV a doplniť tuberkulínový test. Vzhľadom k vyššiemu výskytu ďalších autoimunitných chorôb pri liečbe alemtuzumabom je nutná monitorácia pacienta po dobu 4 rokov od posledného podania alemtuzumabu. Každý mesiac sa kontroluje krvný obraz a diferenciálny rozpočet, sérové hladiny urey a kreatinínu, moč. Každé tri mesiace sa kontroluje hodnota TSH (thyroid- stimulujúci hormón) (56).

Obr. 10 Mechanizmy účinku dimethyl fumarátu, fingolimodu, natalizumabu, alemtazumabu a niektorých ďalších preparátov (42)



2.7.1.3 Ďalšie možnosti liečby

Ďalšími možnosťami liečby pacientov s RR RS a CIS sú možnosti využitia tzv. klasických imunosupresív. Už niekoľko desiatok rokov sa k spomaleniu progresie choroby a eliminácii atakov používa **azathioprin**. U RS však jeho indikácia nebola nikdy schválená, a to aj napriek tomu, že sa využíva pri liečbe mnohých iných autoimunitných chorôb. Jeho používanie u RS je teda „of label“. Azathioprin je purínový derivát s lymfostatickým efektom, je cytotoxický aj pre prekurzory hematopoetických buniek. Ďalej sa v liečbe RS využíva **metotrexát**. Jedná sa o antagonistu kyseliny listovej. Spôsobuje kompetitívnu inhibíciu enzýmu dihydrofolát reductázy a tým inhibuje syntézu DNA. Následne dochádza k poklesu počtu B-lymfocytov aj T-lymfocytov. Ďalším z tejto skupiny liečiv je **mofetil mykofenolát**, ktorý suprimuje lymfocytárnu proliferáciu a expresiu povrchových T bunkových antigénov (61). Vzhľadom k riziku rozvoja závažných nežiaducich účinkov

(trombocytopenia, lymfopenia, anémia, infekcie atď.) sa v dnešnej dobe od ich nasadzovania upúšťa.

V prípade neefektivity DMD terapie 1. alebo 2. línie alebo v prípade ich intolerancie, pristupujeme k liečbe **intravenóznymi imunoglobulínmi (IVIG)** v dávkovaní 0,4 g/kg/deň 1x mesačne. Mechanizmus účinku IVIG je komplexný a rozsiahly. Blokujú a modulujú Fc receptory na makrofágoch, neutralizujú antiidiotypové protilátky, inhibujú tvorbu autoprotilátok, modulujú funkciu cytokínov, redukujú komplementom sprostredkované tkanivové poškodenie a modulujú T celú funkcie (62).

2.7.2 Pripravované nové možnosti terapie MS

Niekoľko ďalších liečiv z kategórie DMD je stále vo výskumnom procese a niektoré z nich snáď budú v dohľadnej dobe uvedené na trh. Aj preparáty, ktoré sa ešte v bežnej praxi nevyužívajú, majú za úlohu zníženie aktivity autoreaktívnych buniek a väčšina z nich spôsobuje pokles absolútneho počtu lymfocytov v sére. **Cladribine** znižuje počet B-lymfocytov aj T-lymfocytov. Je to purínový cytotoxický analóg. **Ocrelizumab** primárne znižuje počet B buniek a jedná sa o monoklonálnu anti CD 20 protilátku. **Daclizumab** inhibuje aktívne T bunky, je to protilátka proti znaku CD 25, čo je alfa podjednotka receptoru pre IL-2 (57). Miesta pôsobenia v imunitnom systéme sú u týchto preparátov rozdielne, niektoré z ich sú zobrazené na obr.10.

2.7.3 Liečba progresívnych foriem RS

Pre liečbu progresívnych foriem RS nemáme doteraz spoľahlivé preparáty a názory na liečbu sa líšia.

2.7.3.1 Liečba primárne progresívnej formy RS

Do dnešnej doby nebola zistená spoľahlivá a hlavne účinná liečba PPRS. Prebehli menšie štúdie s rôznymi preparátmi. Nebol zatiaľ dokázaný presvedčivý efekt pri liečbe cyklofosfamidom, metylprednisolonom, mitoxoantrónom, azatioprínom alebo metotrexátom. Účinnosť DMD terapie 1. a 2. línie používanej pri terapii CIS a RR RS taktiež nebola doteraz spoľahlivo dokázaná, okrem fingolimodu. Priebežné výsledky štúdie u PP RS s týmto preparátom sa javili byť sľubné, ale zatiaľ nebola schválená terapia fingolimodom u PP RS (58).

V štúdií hodnotiacej efekt podávania **intravenózných imunoglobulínov (IVIG)** 1x mesačne u progresívnych foriem RS bol dokázaný efekt IVIG u PPRS, aj keď výsledky boli skôr na spodnej hranici významnosti. U pacientov bola oddialená progresia ochorenia priemerne o 13 týždňov ($p = 0,036$) a takisto bola znížená progresia disability hodnotená pomocou EDSS (59). Táto liečba sa v dnešnej dobe používa už bežne.

V bežnej praxi sa používa aj pulzné podávanie metylprednisolonu i.v. podľa rôznych schém, ale je skôr založená na empirických skúsenostiach, validné dáta o efektívite kortikoidov u PP RS chýbajú (60).

2.7.3.2 Liečba sekundárne progresívnej formy RS

Účinnosť terapie IVIG u SPRS nebola na rozdiel od PP RS dokázaná. Na rozdiel od PP RS bol v štúdiách dokázaný efekt podávania imunosupresívnej terapie, a to mitoxantronu a cyklofosfamidu v rôznych dávkovacích schémach. Keďže sa ale jedná o liečbu, ktorá môže mať závažné nežiaduce účinky, je nutné nasadenie takejto terapie starostlivo zvážiť. **Cyklofosfamid** môže spôsobiť rozvoj hemoragickej cystitidy, alopeciu, infertilitu alebo indukované malignity. Liečba **mitoxantronom** je zase spojená s rizikom kardiotoxycoty (60). Vzhľadom k týmto možným nežiaducim účinkom je nutné pred nasadením vylúčiť akúkoľvek malignitu (odbery na onkomarkery, ultrazvukové vyšetrenie brucha, RTG srdca a pľúc, u žien gynekologické vyšetrenie). Dôležité behom liečby je sledovať absolútny počet lymfocytov v sére. Najčastejšie používané dávkovacie schémy sú Harvardské schéma (podanie 1g metylprednisolonu i.v. (1.deň) + cyklofosfamid 800 mg/m^2 1x mesačne počas prvého roku, 1x za 6 týždňov počas 2. roku a 1x za dva mesiace počas 3.roku), Edanovo schéma (1g metylprednisolonu + 20 mg mitoxantronu i.v. 1x mesačne po dobu 6 mesiacov) Hartungovo schéma (1g metylprednisolonu + 5 - 12 mg mitoxantronu/ m^2 každé 3 mesiace).

2.7.4 Liečba ataku RS

Zlatým štandardom liečby ataku je podávanie pulzov **methylprednisolonu** v dávke 3-5g intravenózne v 3-5 dňoch po sebe idúcich (t.j. 1g denne). U pacientov s horšou toleranciou metylprednisolonu môžeme podávať menšiu dávku denne rozdelenú do viacerých dní. U pacientov, u ktorých nedošlo k regresii neurologického deficitu po podaní i.v. kortikoidov, nasadzujeme perorálne kortikoidy zostupne (opäť metylprednisolon alebo prednisolon). Vzhľadom k možným nežiaducim účinkom kortikoidov preventívne nasadzujeme antacída alebo blokátory protónovej pumpy k ochrane zažívacieho traktu, substituujeme vápnik a vitamín D v rámci prevencie osteoporózy. Ďalej je dôležitá monitorácia krvného tlaku

a glykémií (najmä u diabetikov). Pri intolerancii alebo alergii na kortikoidy volíme alternatívnu liečbu ataku, ktorou je podávanie **IVIG** v dávke 0,4g/kg/deň a taktiež 3-5 dní po sebe idúcich. V prípade ťažkého ataku nereagujúcej na podávanie kortikoidov je metódou voľby podanie **plazmaferézy**, ktorá má podľa niektorých dostupných zdrojov až 85% efekt na regresiu neurologického deficitu (63).

2.7.5 Symptomatická a podporná terapia

Dôležitou a neodmysliteľnou súčasťou terapie RS je symptomatická a podporná terapia. Častým príznakom u RS najmä pri progresii choroby je spasticita. K jej zmierneniu môžeme požívať centrálnu myorelaxanciu (napr. baclofen, tizanidin alebo tetrazepam). V súčasnosti sa často pristupuje k lokálnej terapii s aplikáciou botulotoxínu do spastického svalu. U závažnejšej formy spasticity dolných končatín možno zvážiť zavedenie baclofenovej pumpy (64).

Pacienti s RS majú často problémy s chôdzou. Existuje zatiaľ jediný liek, ktorý dokáže týmto pacientom pomôcť a tým je fampridin, ktorý sa používa u pacientov v rozmedzí EDSS 4-7, dávkovanie je 10mg 1-0-1. Fampridin je 4 aminopyridín, ktorý blokuje draslíkové iónové kanály a zabraňuje prestupu draslíka cez tieto kanály, čím predlžuje repolarizáciu a zvyšuje akčný potenciál na demyelinizovaných axónoch. Týmto procesom môže byť viac impulzov prenesených do CNS, a tým sa zlepšuje rýchlosť chôdze a redukuje sa pocit rigidity a spasticity. Efekt bol v štúdiách objektivizovaný, napr. použitím známeho 25 foot walk testu, ktorý pacienti podstúpili pred zahájením liečby a počas liečby fampridinom. (65). V štúdiách bolo dokázané, že u pacientov, ktorí užívali fampridin došlo k poklesu užívania myorelaxancií, kortikosteroidov i antidepresív (66).

Často sa vyskytujú neuropatické bolesti, ktoré je možné ovplyvniť podaním gabapentínu, pregabalínu alebo krabamazepínu.

Ďalším život nepríjemným symptómom sú sfinkterické poruchy, ktoré je možné zmerniť podávaním anticholinergik, myorelaxanciami alebo lokálnou aplikáciou botulotoxínu. U niektorých pacientov je nutná pravidelná autokatetrizácia k úplnému vyprázdneniu močového mechúra.

Vysoké percento pacientov trpí psychickými poruchami, najčastejšie anxiózne depresívnymi syndrómami. Je dôležité tieto príznaky zachytiť včas a nasadiť pacientovi (ideálne

v spolupráci s psychiatrom) vhodnú antidepresívnu medikáciu a zabezpečiť pacientovi podpornú psychoterapiu.

Ďalšou neoddeliteľnou súčasťou je pravidelná rehabilitácia v prevencii spasticity alebo jej zmierneníu, s nácvikom koordinácie pohybov a posilnením svalstva. Súčasťou komplexnej starostlivosti o pacienta by malo byť aj sociálne poradenstvo. (64,67)

Špeciálna časť

3 Hladiny vybraných zápalových markerov v likvore a sére u pacientov s RS (pilotná štúdia)

V kapitole číslo tri bude predstavená pilotná štúdia, jej cieľ, použité metódy a interpretácia výsledkov. Zber dát bol zahájený na Neurologickej klinike Fakultnej nemocnice Olomouc v r. 2011.

3.1 Cieľ výskumu a hypotéza

Cieľom pilotnej štúdie bolo zistiť rozdiely v hladinách vybraných zápalových markerov u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou. Na začiatku výskumu sme predpokladali na základe preštudovania dostupnej literatúry, že hladiny niektorých markerov môžu byť u pacientov s RS už v období prvých klinických príznakov RS, t.j. v období prebiehajúcich zápalových procesov. Pre náš výskum sme zvolili päť markerov, a to interleukín 6 (IL-6), interleukín 8 (IL-8), interleukín 10 (IL 10), beta-2 mikroglobulín a orosomukoid.

3.2 Súbor pacientov a metodika

Štúdia bola schválená etickou komisiou. Všetci pacienti pred vykonaním lumbálnej punkcie podpísali informovaný súhlas. Výskum bol založený na vyšetrení séra a likvoru pacientov s RS a pacientov z kontrolnej skupiny. Do kontrolnej skupiny boli zaradení pacienti s nezápalovým postihnutím CNS, napr. s bolesťami hlavy, vertigom, bolesťami chrbta atď. Lumbálna punkcia bola u týchto pacientov indikovaná z diferenciálne diagnostických dôvodov, k vylúčeniu patologických procesov v oblasti CNS. U pacientov so suspektnou RS bola lumbálna punkcia vykonaná v čase prvých klinických príznakov kompatibilných s RS. Diagnóza RS bola na základe splnenia McDonaldových revidovaných kritérií stanovená u všetkých pacientov zaradených do výskumu. Žiadny z týchto pacientov nebol pred vykonaním lumbálnej punkcie liečený kortikoosteroidmi ani inou dostupnou liečbou, ktorá by mohla skresliť hladiny vyšetrovaných markerov v sére alebo likvore. Lumbálna punkcia bola vykonaná atraumatickou ihlou za aseptických podmienok. Každému účastníkovi štúdie bolo odobraných 10 ml likvoru a 10 ml séra v rovnakom čase. Odbery boli predmetom hematologického, imunologického a biologického testovania. U všetkých pacientov v základnom vyšetrení likvoru bol počet buniek v medziach normy, tak ako aj hladina bielkoviny, t.j. bez známok neuroinfekcie. U pacientov neboli ani žiadne iné známky prebiehajúceho zápalu v čase vykonania lumbálnej punkcie.

3.2.1 Meranie hladín biomarkerov

Pre meranie hladiny IL-6 sme v našej štúdiu použili metódu ELISA (chemiluminiscenčná sekvenčná imunometrická analýza s pevnou fázou, značená enzýmom, IMMULITE®/IMMULITE® 1000 IL-6, katalógové číslo LK6PZ, LK6P1). Inkubačné cykly: 2x 30 minút. Analytická citlivosť: 2 pg/ml. Referenčné medze: likvor 0-18 pg/ml, sérum 0-5,9 pg/ml.

Pre meranie hladiny IL-8 bola tiež použitá metóda ELISA (IMMULITE®/IMMULITE® 1000 IL-8, katalógové číslo LK8P1). Inkubačné cykly: 1x30 minút. Analytická citlivosť: 2 pg/ml. Referenčné medze: likvor 0-62 pg/ml, sérum 0-62 pg/ml.

Tá istá metóda bola použitá aj pre meranie hladiny IL-10, a to IMMULITE®/IMMULITE® 1000 IL-10, katalógové číslo LKXPZ, LKXP1. Inkubačné cykly: 1x60 minút. Analytická citlivosť: 1 pg/ml. Referenční medze: likvor 0-39 pg/ml, sérum 0-9,1 pg/ml.

Hladiny beta-2-mikroglobulinu boli merané imunonefelometriou zosilnenou časticami za použitia systému BN* II a BN ProSpec®. Referenčné medze: likvor 0,2-2 mg/l, sérum 1-3 mg/l. Variačný koeficient (CV): likvor 2,7%, sérum 2,7 %.

Hladiny orosomukoidu boli tiež merané imunonefelometriou zosilnenou časticami za použitia systému BN* II a BN ProSpec®. Referenčné medze: likvor 1,8-4,5 mg/l, sérum 0,3-1,3 g/l. Variačný koeficient (CV): likvor 3,3%, sérum 3,8%.

3.2.2 Štatistická analýza

Výsledky boli štatisticky spracované. Bol použitý software SPSS verzia 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Súborné v kategóriách parametroch porovnávané pomocou Fisherovho exaktného testu. K porovnaniu kvantitatívnych parametrov bol použitý Mann-Whitney U test. Vek bol porovnávaný Studentovým t-testom. Normalita dát bola kontrolovaná Shapiro-Wilkovým testom. Testy boli vykonané na hladine významnosti 0,05.

3.3 Výsledky

Do výskumu bolo v pilotnej štúdií zaradených 66 pacientov. Vyšetrenie likvoru a séra podstúpilo 38 pacientov s novodiagnostikovanou RS, spĺňujúcich revidované McDonalldove kritéria (25 žien; 13 mužov; medián 35,8 ± 9,1 rokov) a 28 pacientov z kontrolnej skupiny (20 žien, 8 mužov; medián 39,7 ± 13,0 rokov). Neboli zistené žiadne štatisticky významné rozdiely v demografických údajoch medzi pacientmi s RS a kontrolnou skupinou. Demografické údaje sú uvedené v Tabuľke 1.

V skupine s RS boli v likvore nájdené štatisticky významne vyššie hladiny IL-8 (52,8 (41,6-68,3); $p < 0,001$, Mann-Whitney U test) a beta-2-mikroglobulinu (1,26 (1,03-1,37); $p = 0,007$, Mann-Whitney U test). Žiadne rozdiely medzi skupinami neboli nájdené u ostatných markerov (IL-6, IL-10 a orosomukoid) v likvore ani v sére (Tabuľka 2 a 3, graf 1 a 2).

Tab.1 Charakteristika pacientov

	RS (n=38)	Kontroly (n=28)	p
--	-----------	-----------------	---

Ženy	25 (65.8%)	20 (71.4%)	0.790
Vek	35.8 ± 9.1	39.7±13.0	0.182

Tab. 2 Hladiny vyšetovaných markerov v likvore

Hladiny	RS Median ± SD (min- max)	Kontrolná skupina Median ± SD (min- max)	p
IL-6 (pg/ml)	2.1 ± 1.48 (2.0-9.1)	2.1 ± 0.83 (2.0-5.8)	0.607
IL-8 (pg/ml)	52.8 ± 15.65 (32.5-92.3)	36.8± 9.11 (24.1-60.2)	<0.0001
IL-10 (pg/ml)	5.0 ± 0.58 (5.0-8.4)	5.0 ± 0.12 (5.0-5.6)	0.841
Beta-2-microglobulin (mg/l)	1.26 ± 0.22 (0.91-1.82)	0.96 ± 0.34 (0.6-2.03)	0.007
Orosomucoid (mg/l)	4.57 ± 2.57 (0.0-9.29)	5.00 ± 2.44 (0.0-10.1)	0.348

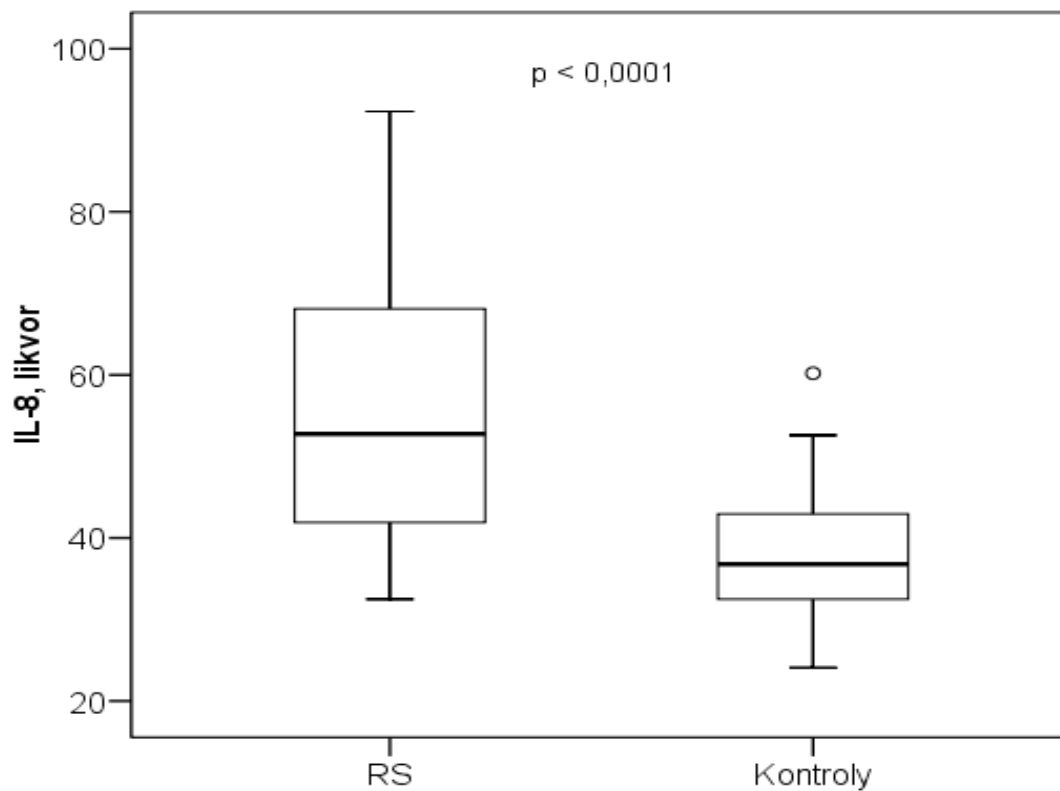
SD – smerodatná odchýlka

Tab.3 Hladiny vyšetovaných markerov v sére

Hladiny	RS Median ± SD (min- max)	Kontrolná skupina Median ± SD (min- max)	p
IL-6 (pg/ml)	2.0 ± 1.54 (2.0-9.5)	2.0 ± 0.78 (2.0-5.0)	0.489
IL-8 (pg/ml)	7.7 ± 36.74 (5.0-232.0)	7.2 ± 7.16 (5.0-42.3)	0.896
IL-10 (pg/ml)	5.0 ± 2.36 (5.0-18.1)	5.0 ± 1.09 (5.0-10.7)	0.228
Beta-2-microglobulin (mg/l)	1.53 ± 0.63 (1.26-5.12)	1.61 ± 0.56 (1.02-3.97)	0.626
Orosomucoid (g/l)	0.76 ± 0.24 (0.41-1.28)	0.77 ± 0.24 (0.47-1.58)	0.311

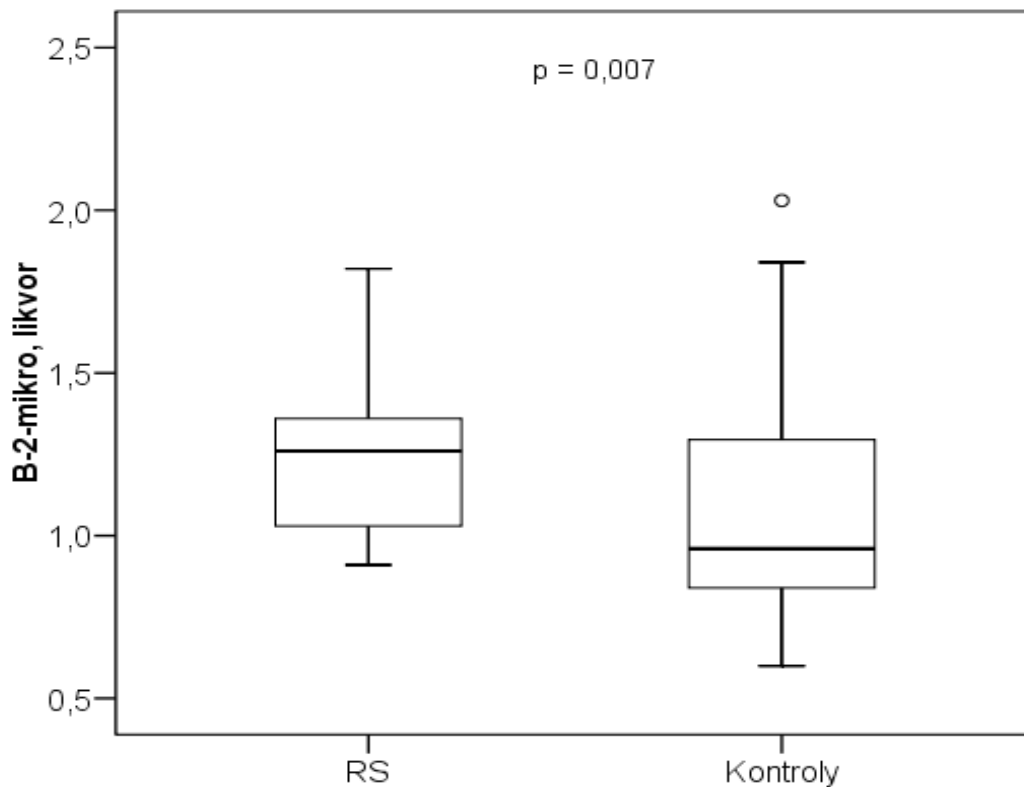
SD – smerodatná odchýlka

Kvartilový box graf 1 znázorňujúci hladinu IL-8 u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnu skupinou



Poznámka: Horizontálne hrany obdĺžnikov reprezentujú 25.-75.percentil, horizontálne tučné línie vnútri obdĺžnikov predstavujú medián. Vertikálne čiary kolmé na obdĺžniky maximálne a minimálne datové hodnoty v rozmedzí 1,5interkvartlovej vzdialenosti. Koliečka a hviezdičky symbolizujú odľahlé a extrémne datové hodnoty.

Kvartilový box graf 2 znázorňujúci hladinu beta 2 mikroglobulinu u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou



Poznámka: Horizontálne hrany obdĺžnikov reprezentujú 25.-75.percentil, horizontálne tučné línie vnútri obdĺžnikov predstavujú medián. Vertikálne čiary kolmé na obdĺžniky maximálne a minimálne datové hodnoty v rozmedzí 1,5interkvartlovej vzdialenosti. Koliečka a hviezdičky symbolizujú odľahlé a extrémne datové hodnoty.

3.4 Interpretácia výsledkov pilotnej štúdie

Zistili sme štatisticky významne zvýšené hladiny IL-8 a beta-2 mikroglobulínu v likvore u pacientov s RS v čase prvých klinických príznakov RS, čo potvrdilo našu hypotézu, že už skoré zápalové procesy u RS sa odrážajú v zmenených hladinách likvorových markerov. Zmeny v hladinách ostatných študovaných biomarkeroch (IL-6, IL-10, orosomukoid) v likvore neboli zistené. Taktiež neboli zistené zmeny v sérových hladinách vyšetrovaných markerov.

4 Hladiny vybraných zápalových markerov v likvore a sére u pacientov s RS (extenzia štúdie)

V kapitole číslo 4 sú predstavené výsledky rozšírenej štúdie. Extenzia spočívala v rozšírení počtu pacientov v skupine s RS a taktiež v kontrolnej skupine.

4.1 Cieľ výskumu a hypotéza

Cieľom extenzie štúdie bolo potvrdiť výsledky z pilotnej štúdie na väčšom počte pacientov, aby bolo možné s výsledkami pracovať v ďalšom výskume.

4.2 Súbor pacientov a metodika

Bola použitá rovnaká metodika a rovnaká analýza biomarkerov ako v prípade pilotnej štúdie (viď. kapitola 3.2). Menšie rozdiely boli iba v štatistickom spracovaní, keď pri štatistickej analýze pohlavia bol použitý Chí-kvadrát test.

4.3 Výsledky

Do výskumu bolo zaradených 204 pacientov. Vyšetrenie likvoru a séra podstúpilo 102 pacientov s novodiagnostikovanou RS, splňujúcich revidované McDonaldove kritéria (70 žien; 32 mužov; medián 37,5 rokov) a 102 pacientov z kontrolnej skupiny (79 žien, 23 mužov; medián 40 rokov). Neboli zistené žiadne štatisticky významné rozdiely v demografických údajoch medzi pacientmi s RS a kontrolnou skupinou. Demografické údaje sú uvedené v Tabuľke 4.

V skupine s RS boli v likvore nájdené štatisticky významne vyššie hladiny IL-8 (medián 59 vs. 43, $p < 0,0001$, Mann-Whitney U test) a beta-2-mikroglobulinu (medián 1,27 vs. 1,09, $p < 0,0001$, Mann-Whitney U test). Zaujímavým výsledkom bolo štatisticky významné zníženie hladiny IL-8 v sére (medián 8,0 vs. 9,7, $p = 0,018$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Žiadne rozdiely medzi skupinami neboli nájdené u ostatných markerov (IL-6, IL-10 a orosomukoid) v likvore ani sére neboli zistené (Tabuľka 5 a 6, graf 3,4 a 5).

Tab. 4 Charakteristika pacientov

	RS (n=102)	Kontrolná skupina (n=102)	p
Vek median (min-max)	37.5 (16-59)	40 (18-74)	0,145
Ženy	70 (68.6%)	79 (77.5%)	0.156

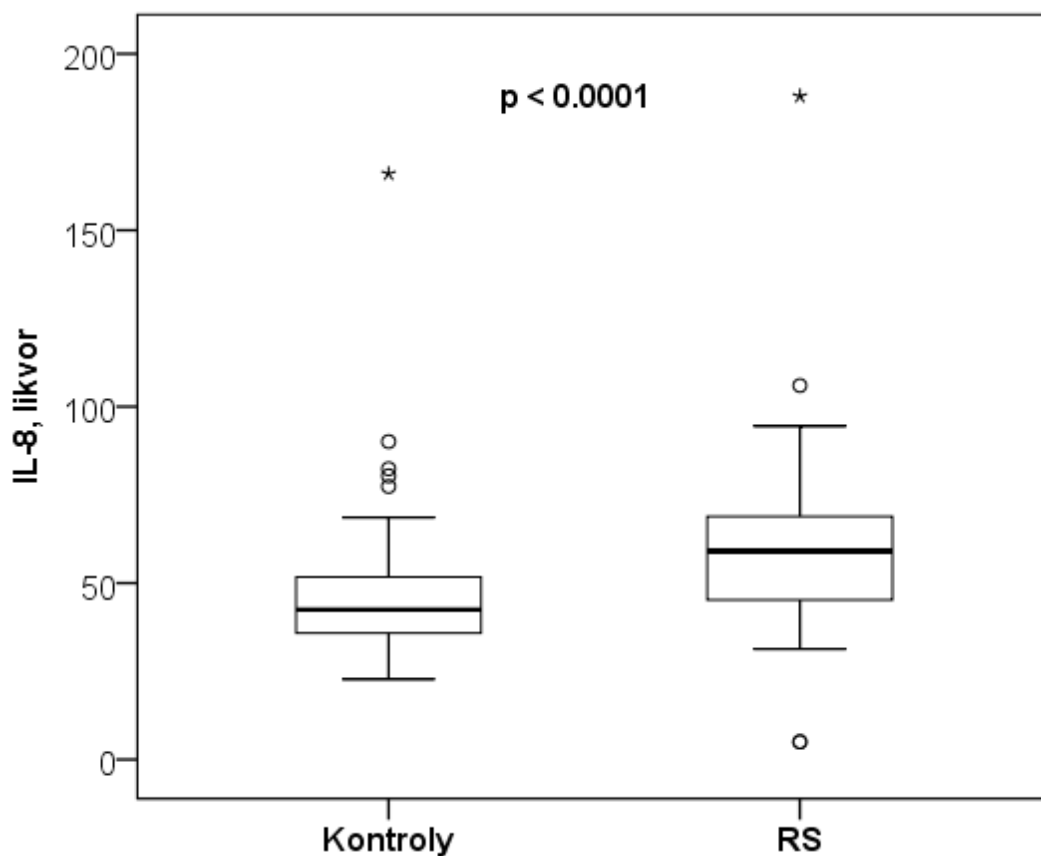
Hladiny	RS Median (min-max)	Kontrolná skupina Median (min-max)	p
Likvor beta 2 mikro (pg/ml)	1,27 (0,69-5,49)	1,09 (0,38-2,59)	<0.0001

Tab.5 Hladiny IL-8 v likvore a sére

Tab. 6 Hladiny beta-2-mikroglobulínu v likvore

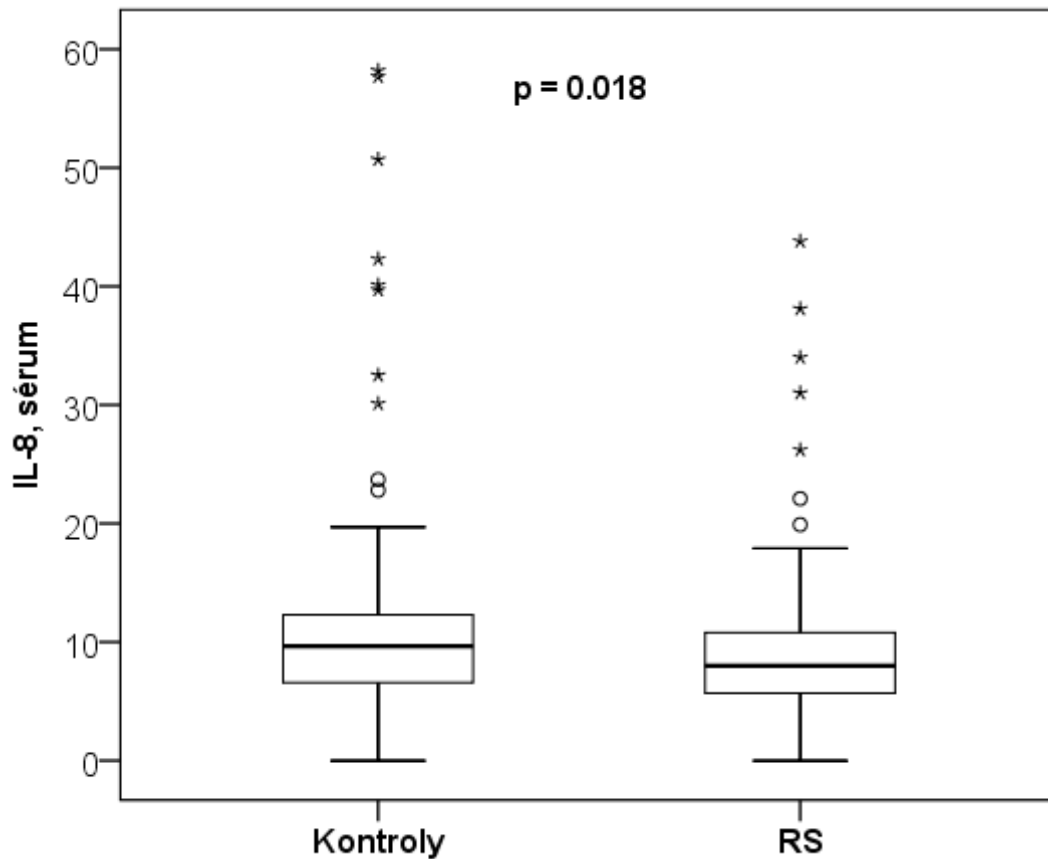
Hladiny	RS Median (min-max)	Kontrolná skupina Median (min-max)	p
Likvor IL-8 (pg/ml)	59.1 (5.0-188.0)	42.5 (22.8-166.0)	<0.0001
Sérum IL-8 (pg/ml)	8.0 (0-43.8)	9.65 (0-58.2)	0.018

Kvartilový box graf 3 znázorňujúci hladiny IL-8 v likvore u RS v porovnaní s kontrolnou skupinou



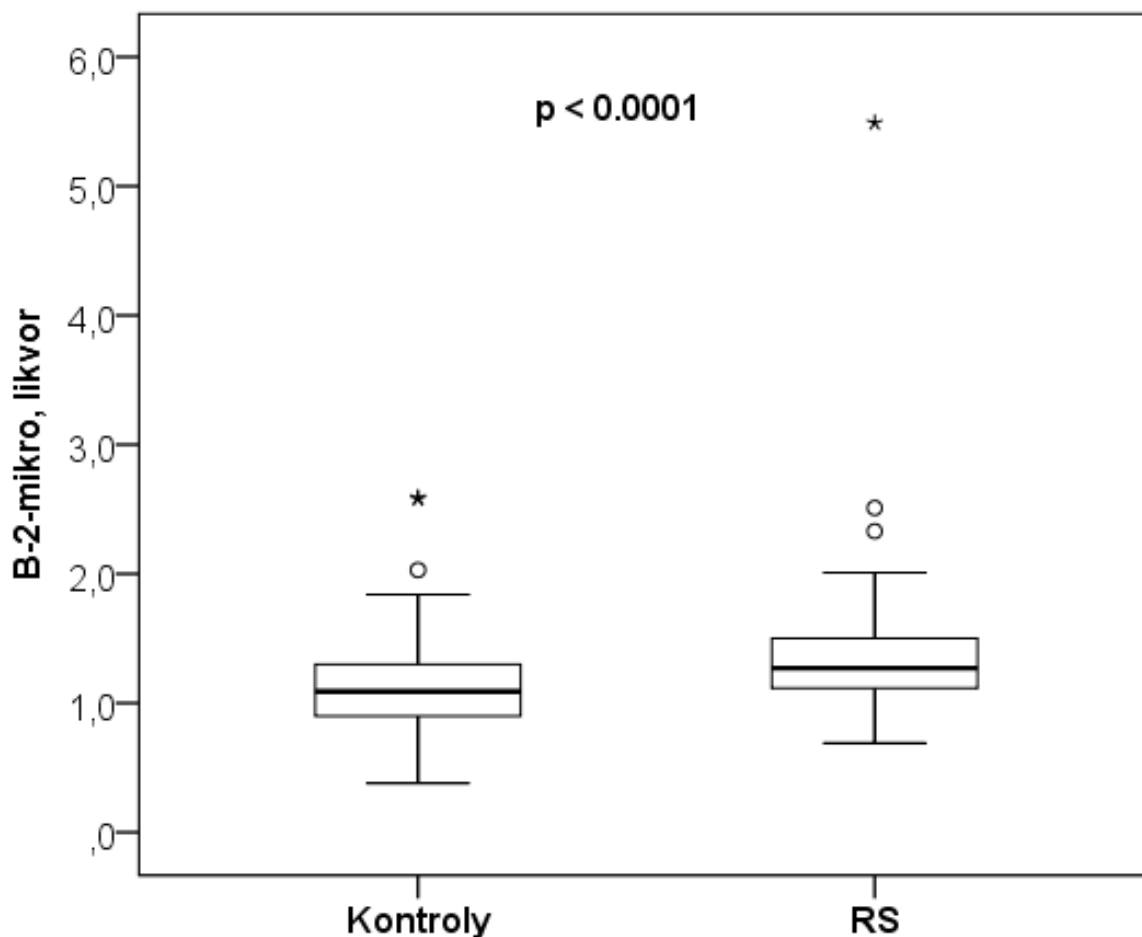
Poznámka: Horizontálne hrany obdĺžnikov reprezentujú 25.-75.percentil, horizontálne tučné línie vnútri obdĺžnikov predstavujú medián. Vertikálne čiary kolmé na obdĺžniky maximálne a minimálne datové hodnoty v rozmedzí 1,5interkvartlovej vzdialenosti. Koliečka a hviezdičky symbolizujú odľahlé a extrémne datové hodnoty.

Kvartilový box graf 4 znázorňujúci hladinu IL-8 v sére u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou



Poznámka: Horizontálne hrany obdĺžnikov reprezentujú 25.-75.percentil, horizontálne tučné línie vnútri obdĺžnikov predstavujú medián. Vertikálne čiary kolmé na obdĺžniky maximálne a minimálne datové hodnoty v rozmedzí 1,5interkvartlovej vzdialenosti. Koliečka a hviezdičky symbolizujú odľahlé a extrémne datové hodnoty.

Kvartilový box graf 5 znázorňujúci hladiny beta-2-mikroglobulínu v porovnaní s kontrolnou skupinou



Poznámka: Horizontálne hrany obdĺžnikov reprezentujú 25.-75.percentil, horizontálne tučné línie vnútri obdĺžnikov predstavujú medián. Vertikálne čiary kolmé na obdĺžniky maximálne a minimálne datové hodnoty v rozmedzí 1,5interkvartlovej vzdialenosti. Koliečka a hviezdičky symbolizujú odľahlé a extrémne datové hodnoty.

4.4 Interpretácia výsledkov rozšírenej štúdie

Boli zistené štatisticky významne zvýšené hladiny IL-8 a beta-2-mikroglobulínu v likvore u pacientov s RS, čo potvrdilo výsledky pilotnej štúdie. Hladiny ostatných študovaných markerov v likvore boli v norme. Zaujímavým však bolo zistenie, že hladina IL-8 u pacientov s RS v sére je signifikantne znížená. Ostatné hladiny vyšetovaných markerov v sére neboli významne zmenené u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Výsledky zmenených hladín IL-8 v sére aj likvore nastolili ďalšiu otázku: Či nemôže časť IL-8 do CNS prechádzať cez porušenú hematoencefalickú bariéru, a preto je v sére jeho znížená hladina. Na tejto hypotéze bola založená ďalšia časť výskumu.

5 Hladiny interleukínu 8 v sére a likvore a jeho korelácia s Q alb

V kapitole číslo 5 budú predstavené výsledky zatiaľ poslednej fázy výskumu. V tejto fáze sme predpokladali poškodenie hematoencefalickej bariéry v počiatočných štádiách RS.

5.1 Cieľ výskumu

Na základe výsledkov z pilotnej štúdie a z fázy extenzie sme si stanovili ďalší cieľ, tj. koreláciu IL-8 s Q alb. Pred začatím tejto fázy sme stanovili hypotézu: Vzhľadom k tomu, že u pacientov s RS bola zistená v extenzívnej štúdii nižšia hladina IL-8 v sére a vyššia hladina IL-8 v likvore, sme vyslovili predpoklad, že časť IL-8 môže do CNS prestupovať z periférie a časť sa tvoriť de novo v CNS. Na základe toho sme vyslovili ďalší predpoklad a to, že hematoencefalická bariéra je porušená už počas prvých štádií rozvoja RS, keďže lumbálna punkcia u našich pacientov bola vykonaná v čase prvých klinických symptómov choroby. Ako marker dysfunkcie hematoencefalickej bariéry sme zvolili Q alb.

5.2 Súbor pacientov a metódy

Aj táto časť štúdie bola schválená etickou komisiou a všetci pacienti podpísali informovaný súhlas. Súbor pacientov tvorili pacienti z extenzívnej fázy štúdie a do súboru sme pridali aj niekoľko nových pacientov s novodiagnostikovanou RS. Nikto z pacientov nebol pred vykonaním lumbálnej punkcie liečený kortikosteroidmi ani inou liečbou, ktorá by mohla zmeniť hladiny vyšetovaných markerov.

Cieľom bolo zistiť koreláciu medzi hladinami IL-8 v likvore a Q alb. Q alb je bezrozmerná veličina a vyjadruje pomer hladiny albumínu v likvore a sére:

$Qalb = \frac{\text{albumín(CSF)}}{\text{albumín (sérum)}}$

Albumínový kvocient je závislý na veku (Tabuľka 7).

Tab.7 Normálne rozmedzie Q-albumínu v závislosti na veku

Vek	Primerná hodnota	rozmedzie
18-30	3.7	1.7-5.7
31-40	4.0	1.8-6.2
41-50	4.6	2.0-7.2
51-60	5.5	2.1-8.9

5.2.1 Stanovenie hladiny biomarkerov

Pre meranie hladiny IL-8 bola použitá metóda ELISA (IMMULITE®/IMMULITE® 1000 IL-8, katalógové číslo LK8P1). Inkubačné cykly: 1x30 minút. Analytická citlivosť: 2 pg/ml.

Referenčné medze: likvor 0-62 pg/ml, sérum 0-62 pg/ml

Q albumín je bezrozmerná veličina. Hladiny albumínu v sére a likvore sú stanovené nefelometricky. Kvocient je stanovený výpočtom.

5.2.2 Štatistické spracovanie

Pri štatistickom spracovaní bol použitý software IBM SPSS Statistics 22 and SPSS software version 15. Spermanova korelačná analýza a Chi-square test boli použité pri spracovaní korelácie medzi IL-8 a Q alb. Testy boli vykonané na hladine signifikancie 0,05.

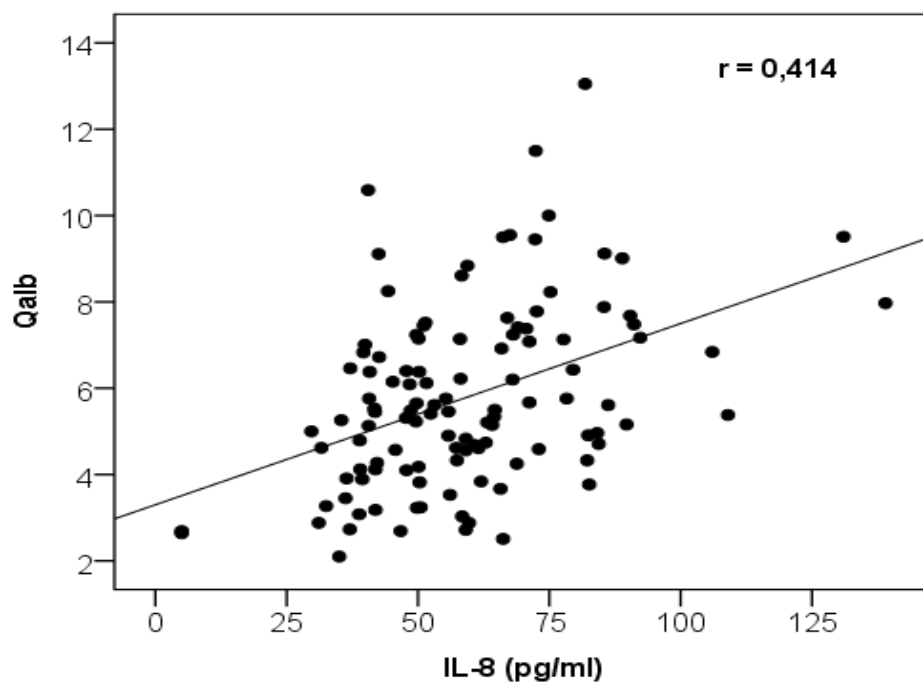
5.3 Výsledky

Do tejto štúdie bolo zaradených 115 pacientov s novodiagnostikovanou RS splňujúcich McDonalдове revidované diagnostické kritéria. Spermanovou korelačnou analýzou bola zistená silná korelácia medzi hladinami interleukínu 8 v likvore a Q albumínom ($r=0.414$, $p<0.0001$) (Tabuľka 8, graf 6)

Tabuľka 8 Korelácia medzi IL-8 a Q albumínom

IL-8		Q- alb
	Correlation coefficient (r)	0.414
	p	<0.0001
	n	115

Graf 6. Bodový korelačný graf korelácie medzi IL-8 v likvore a Q albumínom



5.4 Interpretácia výsledkov korelácie IL-8 a Qalb

Štatistickým spracovaním bola dokázaná významná korelácia medzi IL-8 a Qalb, čo by mohlo zodpovedať porušenej hematoencefalickej bariére už v počiatočných štádiách RS. Čas IL-8 by mohla teda prestupovať cez porušenú hematoencefalickú bariéru do CNS.

6 Diskusia

Výsledkom z pilotnej štúdie boli signifikantne zvýšené hladiny IL8 a beta-2 mikroglobulínu v likvore. Tieto výsledky potvrdzujú prítomnosť zápalových procesov v čase prvých klinických príznakov u pacientov s RS. Existuje niekoľko štúdií zaoberajúcich sa vyšetrením zápalových markerov v sére a likvore pacientov s RS. Výsledky štúdií nie sú jednotné, čo je pravdepodobne spôsobené klinickou rôznorodosťou študovaných populácií. Niektoré štúdie sa zaoberali skúmaním iných biomarkerov ako my a majú veľmi zaujímavé výsledky. Martin TB a kol. (68) analyzoval sérové koncentrácie 13 prozápalových a protizápalových markerov. U 7 z nich boli zistené štatisticky významné zmeny hladín u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou. Stále viac diskutovaným markerom je interleukín 23 (IL-23). Wen SR (69) zistil jeho zvýšenú hladinu. V ďalšom výskume (70) bola zistená zvýšená hladina IL-23, ktorý pochádza z monocytov derivovaných dendritických buniek a následne bola zistená zvýšená mRNA interleukínu 23 u pacientov s RS. Existuje množstvo zaujímavých štúdií s prínosnými výsledkami, ale ďalšia časť diskusie bude venovaná markerom, ktoré sú súčasťou nášho výskumu.

Beta 2- mikroglobulín je súčasťou histokompatibilných antigénov na povrchu buniek a hrá dôležitú úlohu v medzibunkových interakciách. Nachádza sa najmä na povrchu bielych krviniek, predovšetkým na B-lymfocytoch. Bolo zistené, že hladiny beta-2-mikroglobulínu korelujú s aktivitou choroby u viacerých autoimunitných ochorení. Je používaný aj ako farmakodynamický marker interferonu beta, ktorý sa používa v liečbe RS (71, 72). Toto tvrdenie koreluje s naším výsledkom. Na druhej strane, niektoré ďalšie štúdie zmeny v hladinách beta 2 mikroglobulínu u RS nepotvrdili (12, 73). Na základe týchto skutočností môžeme povedať, že úloha u beta 2 mikroglobulínu u RS nie je stále jasná.

IL-8 je zápalový chemokín, ktorý priťahuje a aktivuje neutrofilu a subpopulácie lymfocytov. Má silný angiogénny efekt. Je produkovaný mnohými bunkami, ako sú napr. monocyty, lymfocyty, granulocyty, fibroblasty, endoteliálne bunky a astrocyty. V likvore sú jeho hladiny elevované u zápalových procesov v CNS (74). IL-8 je tiež zodpovedný za poškodenie hematoencefalickej bariéry a migráciu imunitných buniek do CNS. V jednej štúdií (75) bol zistený efekt podávania vysokodávkovaných kortikoidov na hladiny IL-8, kedy po podaní kortikoidov došlo k poklesu sérových hladín IL-8. Sérové hladiny bývajú znížené tiež u pacientov liečených interferónom beta 1a v porovnaní s neliečenými pacientmi s RS (76). Ďalšie dve publikované štúdie potvrdzujú tieto výsledky a ich autori našli signifikantne vyššie hladiny IL-8 v likvore behom ataku RS relapse (77, 78). Skutočnosť, že IL-8 je spojený

s aktivitou choroby RS bola využitá aj v ďalších výskumoch. Neuteboom RF et al. (79) skúmali hladiny IL-8 u pacientov s RS behom tehotenstva. Vysoké sérové hladiny IL-8 počas prvého trimestra boli spojené s vysokým rizikom rozvoja popôrodného relapsu. Ďalšia štúdia porovnávala hladiny interleukínov u 2 typov RS (optikopínanej formy a formy klasickej). Zvýšené hladiny IL-8 boli zistené u oboch foriem, ale u optikospínanej boli signifikantne vyššie v porovnaní s klasickou formou. Podľa tej istej štúdie IL-8 koreluje aj s mierou disability a teda s EDSS (80).

U ďalších vyšetovaných markerov (IL-6, IL-10, orosomukoid) sme v našej práci nenašli rozdiely v sérových alebo likvorových hladinách.

IL-6 je prozápalový cytokín. Môže byť zodpovedný za syntézu imunoglobulínov v CNS (81). V uvedenej štúdii (81) boli zistené u väčšiny pacientov s RS nízke sérové hladiny IL-6. V rovnakej štúdii boli zistené zvýšené hladiny IL-6 v likvore u pacientov s RS a s inými zápalovými neurologickými chorobami. Výsledky nekorelovali s intrathekálnou syntézou IgG. Určitý stupeň korelácie závislosti sérových koncentrácií IL-6 a EDSS bol zistený v práci Stelmasiaka et al. (82).

IL-10 je protizápalový cytokín. B bunky produkujúce IL 10 regulujú autoimunitné choroby, vrátane RS (83). Existuje niekoľko výskumov zaoberajúcich sa terapiou RS interferónmi a glatiramer acetátom a ich vplyvom na produkciu niektorých cytokínov, vrátane IL-10. Práca Pula R. et al (84) ukazuje efekt glatiramer acetátu na CNS. Okrem iného poukazuje aj na zvýšenú sekréciu IL-10 po terapii glatiramer acetátom.

Malá molekula orosomukoidu je schopná prestupovať cez hematoencefalickú bariéru. Koncentrácia orosomukoidu je zvýšená u maligných procesov postihujúcich CNS (12). Zvýšené hladiny v likvore sa môžu u niektorých pacientov s RS (50 - 60%) objaviť po niekoľkoročnom trvaní choroby (85). V rovnakej štúdií boli zistené znížené hladiny orosomukoidu u sekundárne progresívnej RS.

V ďalšej fáze výskumu bola práca rozšírená zo strany veľkosti súboru, v ktorej sa potvrdili signifikantne vyššie hladiny interleukínu 8 a beta-2 mikroglobulínu u pacientov s RS v porovnaní s pacientmi z kontrolnej skupiny. Na druhej strane, po štatistickom spracovaní sme zistili ďalší zaujímavý výsledok a to zníženie sérových hladín IL-8 u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou. Na základe týchto výsledkov sme vyslovili hypotézu, že u pacientov s RS môže časť IL-8 v CNS pochádzať z periférie a do CNS prestupuje cez porušenú hematoencefalickú bariéru. Časť IL-8 je tvorená v CNS de novo. Výsledky

potvrdzujú prítomnosť zápalových procesov v oblasti mozgu a miechy už v počiatočných štádiách.

Už vyššie bolo uvedené, že IL-8 je produkovaným mnohými bunkami a že práve tento cytokín zohráva dôležitú úlohu v imunopatogenéze RS. Zaujímavá štúdia sa zaoberala vzťahom hladín IL-8 a poškodením zraku po akútnej optickej neuritíde (86). V tejto štúdií boli pacienti sledovaní po dobu 6 mesiacov po rozvoji akútnej optickej neuritídy. Výsledky potvrdzujú, že vyššie hladiny IL-8 korelujú s mierou funkčného postihnutia zraku, vyššie hladiny IL-8 korelujú s nedostatočnou úpravou zraku po ataku. Rovnaká skupina autorov predstavila ďalšiu prácu zaoberajúcu sa IL-8 (87). V tejto práci bolo zistené, že vyššie hladiny IL-8 sú spojené s klinickou progresiou ochorenia u pacientov s radiologicky izolovaným syndrómom. Ďalej zistili, že vyššie hladiny IL-8 u CIS sú spojené s vyšším rizikom konverzie do klinicky definitívnej RS. Podľa štúdie Tomioku a Matsuiho (88) hladiny IL-8 môžu poskytnúť užitočné informácie pre hodnotenie imunitnej reakcie v CNS.

V súčasnosti existuje veľa štúdií zaoberajúcich sa DMD terapiou a efektom týchto preparátov na sérové likvorové hladiny biomarkerovu RS. Jedna z týchto štúdií poukazuje na zníženie sérových hladín 8 cytokínov (TNF α , IFN γ , S100B, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, and IL-23) u pacientov s RS liečených interferónmi a natalizumabom v porovnaní s neliečenými pacientmi s RS (89).

Výskumy zápalových cytokínov nie sú dôležité iba na poli RS, ale taktiež u iných chorôb. Za povšimnutie stojí napr., že likvorové hladiny IL-8 sú vyššie u pacientov s lupus erythematosus postihujúci CNS (90).

Niektoré ďalšie výskumy potvrdili naše výsledky a ich autori našli signifikantne vyššie hladiny IL-8 v likvore počas relapsu RS (77,82).

Na základe doterajších výsledkov úlohy IL-8 u RS jeho funkcia nie je stále známa. Takmer všetky štúdie však potvrdzujú zvýšené hladiny IL-8 behom relapsu. IL-8 je dôležitým chemokínom podieľajúcim sa na zápalových procesoch v CNS. Stále však nie je jasné, či je IL-8 u RS nachádzajúci sa v CNS výlučne de novo, alebo či sa na jeho zvýšenej hladine podieľa aj časť IL-8 z periférie, ktorý by prestupoval do CNS cez porušenú hematollikvorovú bariéru.

Na druhej strane v niektorých štúdiách boli potvrdené vyššie hladiny IL-8 aj v sére u pacientov s RS alebo boli hladiny v medziach normy. Tieto zistenia sú v kontraste

s výsledkami naše práce, v ktorej sme zistili jeho znížené hladiny. Na základe výsledkov sme preto predpokladali i porušenie hematoencefalickej bariéry už v skorých štádiách RS.

Hematoencefalická bariéra je porušená u viacerých postihnutí CNS, vrátane ischemie, roztrúsenej sklerózy, Alzheimerovej choroby. Vyšetrenie hodnoty Q albumínu je najbežnejšie používanou metódou k posúdeniu porušenej funkcie hematolikvorovej bariéry. V práci Chalbota et al. (91) neboli zistené žiadne rozdiely v hodnotách Q alb u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou. Štúdia bola koncipovaná tak, aby do nej boli zaradení pacienti rovnakých vekových skupín v oboch vyšetrovaných skupinách. Neporušená hematoencefalická bariéra je nevyhnutná pre udržanie homeostázy mozgu (92). Iba niektoré substancie sú schopné prestupu hematoencefalickou bariérou. Porušenie tesných spojení hemtoencefalickej bariéry a porušená regulácia transportných mechanizmov vedie k jej zvýšenej permeabilite. Tento proces tak podporuje rozvoj mnohých neurologických ochorení (91). Hodnota Qalb koreluje s hladinami vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru, ktorý sa podieľa na funkcii hematoencefalickej bariéry (93).

Pri prítomnosti aktívnych demyelinizačných ložísk v CNS dochádza k masívnemu zvýšeniu permeability hemtoencefalickej bariéry. Naopak u inaktívnych remyelinizačných lézií je bariéra narušená minimálne alebo vôbec. V štúdiách na zvieratách s aktívnymi demyelinizačnými ložiskami boli pozorované zníženie hodnoty Qalb, u zvierat s neaktívnymi léziami boli hodnoty Qalb v normálnom rozmedzí (94). V minulosti aj v súčasnej dobe prebieha pomerne veľa štúdií zaoberajúcich sa poškodenou hematoencefalickou bariérou. Zaujímavý výskum sa zaoberá delíriom a jeho súvislosti s dysfunkciou bariéry (95), ale nepotvrdila sa súvislosť medzi študovanými parametrami. Väčšina pacientov (88%) mala intaktnú integritu hematoencefalickej bariéry. U ďalších chorôb, ako sú nádorové postihnutia mozgu, syndróm Guillain-Barre a chronická zápalová demyelinizačná polyneuropatia, bola dysfunkcia bariéry dokázaná (96). Z rovnakej štúdie vyšiel zaujímavý výsledok významnej korelácie Qalb s váhou body mass indexom.

Na základe výsledkov vyššie uvedených štúdií môžeme povedať, že porušená hematpenecefalická bariéra by mohla korelovať s mierou prebiehajúcich zápalových procesov. Na druhej strane výskumy zaoberajúce sa neurodegeneratívnymi chorobami zistili taktiež porušenú funkciu heatoencefelickej bariéry, a to u progresívnej suoranukleárnej paralýzy, multisystémovej atrofie (97), ako aj u amyotrophickej laterálnej sklerózy (98). Zaujímavé výsledky priniesla štúdia Uhera et al. (99), ktorá popisuje, že zvýšené hodnoty

Qalb v období prvých klinických príznakov RS sú spojené so zväčšením postranných komôr a atrofiou mozgu v priebehu 48 mesiacov. V tej istej štúdií bolo zistené, že vyššie hodnoty Qalb korelujú s väčšou mierou progresie disability a dosahujú vyšších hodnôt EDSS v priebehu 48 mesiacov. Táto práca zároveň potvrdzuje porušenie integráciu hematoencefalickej bariéry v skorých štádiách RS.

7 Záver

Na základe výsledkov našej štúdie nemôžeme povedať, že cytokín IL-8 má hlavnú úlohu v etiológii RS, pretože rozdiely hladín v likvore sú iba 1,39 (t.j. o 39 %) a v sére iba 0,83 (t.j. o 17 % nižšie) u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou. Korelácia IL-8 a Qalb je asi 16 %. Na základe týchto skutočností môžeme povedať, že IL-8 pravdepodobne nehrá primárnu úlohu v patogenéze RS, ale ako súčasť celého komplexu dejov má určite v etiopatogenéze RS význam.

Na základe našich výsledkov, vyššie uvedených štúdií a mnohých ďalších prác môžeme vo všeobecnosti povedať, že prozápalové aj protizápalové cytokíny hrajú dôležitú úlohu v patogenéze RS. Keďže procesy u RS sú komplexné deje, bude nutné hľadať aj hladiny ďalších biomarkerov, ktoré môžu byť u RS zmenené. Je dôležité taktiež hľadať súvislosti medzi hladinami biomarkerov a mierou progresie disability v čase, čo by mohlo byť predmetom ďalšieho výskumu na našej klinike.

Je dôležité, aby naďalej prebiehali štúdie zaoberajúce sa etiopatogenézou RS a úlohou sérových a likvorových hladín v nej. Výsledky týchto štúdií nás krok po kroku posúvajú k pochopeniu tejto invalidizujúcej choroby mladých ľudí. V súčasnej dobe už existujú možnosti zmiernenia priebehu a progresie RS a to len vďaka prebiehajúcim výskumom, vďaka ktorým bolo možné DMD terapiu zacieliť na konkrétnu časť imunitného systému.

Ďalším prínosom týchto výskumov je na základe hladín niektorých biomarkerov predikovať priebeh choroby. Zmenené hladiny niektorých biomarkerov (ako napr. IL-8) a zmenené hodnoty iných parametrov, ako napr. zmenené hodnoty Qalb, korelujú s rýchlejšou progresiou choroby, či už vyjadrenou progresiou v škále EDSS alebo zhoršením magnetickorezonančných parametrov (predovšetkým progredujúca atrofia mozgu).

8 Súhrn

V tejto časti dozertačnej práce je stručné zhrnutie našich výsledkov.

8.1 Súhrn slovenský

Roztrúsená skleróza je chronické zápalové demyelinizačné autoimunitné ochorenie centrálného nervového systému. Je najčastejšou príčinou invalidity mladých ľudí. Vo všeobecnosti platí, že v prvej fáze sa uplatňujú hlavne zápalové procesy a neskôr nastupujú neurodegeneratívne procesy. Základná hypotéza sa opiera o existenciu autoreaktívneho T-lymfocyту, ktorý prichádza do styku s antigénmi CNS na periférii, a to najmä v hlbokých krčných uzlinách. Týmito antigénmi sú zložky myelínu. Po styku s nimi pretrváva autoreaktívny T-lymfocyt v inaktivovanom stave v lymfatickom systéme na periférii. Po jeho aktivácii napr. banálnou infekciou dochádza k proliferácii týchto lymfocytov a následne k prestupu cez hematoencefalickú bariéru. V CNS reaguje na cieľový antigén, aktivuje mikroglie a spúšťa zápalové procesy. Výsledkom týchto dejov je demyelinizácia nervového vlákna, ktorej výsledkom je spomalenie vedenia elektrického impulzu. Dochádza k spusteniu celej kaskády dejov, ktoré postupne vedú k deštrukcii nervového vlákna.

Až relatívne nedávno bola zistená aj úloha B-lymfocytov v patogenéze RS. Ich presná funkcia nie je známa. Na patogenéze RS sa pravdepodobne podieľajú produkciou protilátok, transportom autoantigénov z tkaniva k sekundárnym orgánom imunitného systému, ďalej prezentáciou autoantigénov T-lymfocytom. Bolo zistené, že B-lymfocyty sú lokalizované v rôznych subkompartmentoch CNS (v likvore, parenchýme aj meningách).

Všetky tieto procesy sú sprevádzané produkciou cytokínov. V našom výskume sme sa zamerali na zisťovanie hladín niektorých z nich v čase prvých klinických príznakov RS. Predmetom nášho skúmania bolo vyšetrenie séra a mozgovomiechového moku pacientov s novodiagnostikovanou RS a pacientov z kontrolnej skupiny, ktorí boli hospitalizovaní na Neurologickej klinike Fakultnej nemocnice Olomouc v rokoch 2011-2016. Kontrolnú skupinu tvorili pacienti s nezápalovým postihnutím CNS (napr. pacienti s vertigom, bolesťami hlavy alebo chrbta). U týchto pacientov bolo likvorologické vyšetrenie indikované z diferenciálne diagnostických dôvodov. Pacienti zaradení do skupiny s RS splnili McDonaldove revidované kritéria pre RS a lumbálna punkcia bola u nich vykonaná v čase prvých klinických príznakov choroby.

Výskum prebiehal v niekoľkých fázach. Pred zahájením výskumu sme si vybrali po preštudovaní dostupnej literatúry 5 zápalových markerov, ktoré by mohli mať zmenené hladiny u pacientov s RS v porovnaní s kontrolnou skupinou. Týmito markermi sú IL-6, IL-8,

IL-10, orosomukoid a beta-2-mikroglobulín. V prvej pilotnej časti výskumu sme vyšetrili 38 pacientov s novodiagnostikovanou RS a 25 pacientov z kontrolnej skupiny, v demografických údajoch neboli po štatistickom spracovaní zistené významné rozdiely. Po štatistickom spracovaní bolo zistené, že u pacientov s RS sú signifikantne vyššie hladiny IL-8 v likvore (52,8 (41,6-68,3); $p < 0,001$, Mann-Whitney U test) a beta-2-mikroglobulínu v likvore (1,26 (1,03-1,37); $p = 0,007$, Mann-Whitney U test). V hladinách ostatných vyšetovaných markerov v likvore ani sére neboli zistené štatisticky významné rozdiely.

Na základe týchto výsledkov bola štúdia rozšírená, čo sa týka počtu pacientov. V ďalšej fáze bolo teda vyšetrených celkom 204 pacientov, 102 s novodiagnostikovanou RS a 102 pacientov z kontrolnej skupiny. V demografických údajoch opäť neboli zistené štatisticky významné rozdiely. V tejto fáze štúdie boli potvrdené výsledky z pilotnej štúdie. V skupine s RS boli v likvore nájdené štatisticky významne vyššie hladiny IL-8 (medián 59 vs. 43, $p < 0,0001$, Mann-Whitney U test) a beta-2-mikroglobulínu (medián 1,27 vs. 1,09, $p < 0,0001$, Mann-Whitney U test). Zaujímavým výsledkom bolo štatisticky významné zníženie hladiny IL-8 v sére (medián 8,0 vs. 9,7, $p = 0,018$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Žiadne rozdiely medzi skupinami neboli nájdené u ostatných markerov (IL-6, IL-10 a orosomukoid) v likvore ani sére neboli zistené.

Vzhľadom k tomu, že u pacientov s RS bola zistená v extenzívnej štúdií nižšia hladina IL-8 v sére a vyššia hladina IL-8 v likvore, sme vyslovili predpoklad, že časť IL-8 môže do CNS prestupovať z periférie a časť sa tvoriť de novo v CNS. Na základe toho sme vyslovili ďalší predpoklad a to, že hematoencefalická bariéra je porušená už počas prvých štádií rozvoja RS. Na zhodnotenie miery poškodenia hematoencefalickej bariéry sme zvolili Qalb a korelovali túto bezrozmernú veličinu s IL-8 v CSF. Po štatistickom spracovaní sme zistili významnú koreláciu medzi týmito dvoma parametrami, čo by mohlo potvrdzovať našu hypotézu.

Niektoré štúdie naše predpoklady potvrdzujú, ale niektoré sú naopak s nimi v kontraste.

Záverom môžeme povedať, že vyšetovanie likvoru a výskum likvorových markerov je dôležitou súčasťou na ceste odhaľovania etiopatogenézy RS. Na základe hladiny niektorých cytokínov v sére a likvore by v budúcnosti mohlo byť možné predikovať priebeh choroby. Ďalším prínosom výskumu biologických markerov a zistenie ich úlohy v etiopatogenéze RS by mohlo priniesť nový pohľad na liečbu tejto závažnej choroby.

Výsledky tohto výskumu by mohli byť podkladom pre ďalšie štúdie na našej klinike.

8.2 Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory-demyelinating disease of central nervous system. MS is the most common neurological reason of disability in young people. The inflammation is caused by autoimmune processes especially appearing in the early stages of MS. The neurodegenerative processes appear mainly in later stages of MS. The basic hypothesis is based on the existence of autoreactive T-lymphocyte, that react with antigens of the central nervous system (CNS) in the periphery, especially in the cervical lymph nodes. These antigens are the part of myelin. After the contact between T-lymphocyte and antigen the inactive autoreactive T-lymphocyte persists in the periphery. After the activation (e.g. by any infection) T-lymphocytes proliferate and pass into the CNS, where T-lymphocytes initiate the inflammatory processes. The result is demyelination of nerve fibers and the spread of electrical impulse is decreased on them.

Relatively recently was found out that also B- lymphocytes have some role in the pathogenesis of MS but the exact function is still unknown. The role of B- lymphocytes in MS is probably the production of antibodies, transport of antigens and presentation of antigens to T- lymphocytes. There was also found out that B lymphocytes are localized in different compartments of CNS (in the cerebrospinal fluid- CSF, in the parenchyma and meninges).

All of these processes are accompanied by production of cytokines. In our study we hypothesized that the levels of some markers could be changed in MS in comparison with controls. We studied five inflammatory markers (interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10), beta-2-microglobulin, orosomucoid). The study was based on CSF and serum examination in patients with MS and the control group, who were hospitalized in our department in years 2011-2016. In the control group were patients with non-inflammatory disease of CNS (e.g. headache, vertigo, back pain etc.). The lumbar puncture was indicated from differential diagnostic reasons, to exclude other pathological processes of CNS. In the MS patients, the lumbar puncture was indicated and performed for diagnostic purposes in cases suggestive of MS, at the time of the first clinical symptoms compatible with MS. The diagnosis of MS was confirmed in all patients included in MS group. All patients included in the MS group fulfilled the McDonald's revised diagnostic criteria.

In the pilot study we investigated a group of 66 patients. CSF and serum examinations were performed in 38 patients with newly diagnosed MS and 28 patients in control group patients. No statistically significant differences in demographic data between MS patients and control group were found. Significantly higher CSF levels of IL-8 (52.8(41.6-68.3); $p < 0.001$, Mann-

Whitney U test) and beta-2-microglobulin (1.26 (1.03-1.37); $p=0.007$, Mann-Whitney U test) in MS patients group were found. No differences in other CSF markers (IL-6, IL-10 and orosomucoid) and serum levels of all markers between both groups were found.

Based on the results from pilot study we decided to perform the extension of the study. We investigated a group of 204 patients. CSF and serum examinations were performed in 102 patients with newly diagnosed MS and 102 control group patients. No statistically significant differences in demographic data between MS patients and control groups were found. Significantly higher CSF levels of IL-8 ($p<0.0001$, Mann-Whitney U test) were found in the MS patient group. There was one interesting result, the statistically significant lower serum levels of IL-8 ($p=0.018$, Mann-Whitney U test) were found in the MS patient group. The serum and CSF levels of IL-8 were in normal range in control group. Based on our results, we hypothesized that IL-8 could partially come from the periphery, and that IL-8 could penetrate through the damaged blood brain barrier. This may be the reason that IL-8 is increased in CSF and decreased in serum in patients with MS. On the other hand, there were general opinions that the IL-8 is produced de novo in the CNS. We chose the dimensionless value Q alb for evaluation of the blood brain barrier damage. Spearman's analysis showed a moderately strong correlation between IL-8 and Q-alb ($r=0.414$, $p<0.0001$). The results could partially confirm our hypothesis.

In conclusion, we could say that the examination of CSF and research of CSF markers are the important part on the way of discovery the MS pathogenesis. Based on levels of some cytokines maybe we could be able to predict the progression of the disease. The knowledge of new biomarkers, that are important in MS pathogenesis, could be also beneficial for the development of new treatment.

The results of this research could be the background for other studies in our clinic.

9 Použitá literatura

1. Havrdová E a kolektiv. Roztroušená skleróza. str. 21-38
2. Kočovská E, Gaughran F, Krivoy A, Meier UC (2017). Vitamin-D Deficiency As a Potential Environmental Risk Factor in Multiple Sclerosis, Schizophrenia, and Autism. *Front Psychiatry*. 2017 Mar 27;8:47. doi: 10.3389/fpsy.2017.00047. eCollection 2017.
3. Havrdová E a kolektiv. Roztroušená skleróza. Praha: Mladá fronta, 2013. Str. 87-101.
4. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K (2017) Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis. *EBioMedicine* 16 (2017) 41–50
5. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2017 Jan;13(1):25-36. doi: 10.1038/nrneurol.2016.187. Epub 2016 Dec 9.
6. Pender MP, Csurhes PA, Smith C, Beagley L, Hooper KD, Raj M, Coulthard A, Burrows SR, Khanna R. Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014 Oct;20(11):1541-4. doi: 10.1177/1352458514521888. Epub 2014 Feb 3.
7. Giovannoni G, Ebers G, 2007. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr. Opin. Neurol*. 20, 261–268.
8. Hart BA, Kap YS, Morandi E, Laman JD, Gran B. EBV Infection and Multiple Sclerosis: Lessons from a Marmoset Model. *Trends Mol Med*. 2016 Dec;22(12):1012-1024. doi: 10.1016/j.molmed.2016.10.007. Epub 2016 Nov 8.
9. Adamczyk-Sowa M, Medrek A, Madej P, Michlicka W, Dobrakowski P. Does the Gut Microbiota Influence Immunity and Inflammation in Multiple Sclerosis Pathophysiology? *J Immunol Res*. 2017;2017:7904821. doi: 10.1155/2017/7904821. Epub 2017 Feb 20.
10. Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Haque-Begum S, Kasper LH. Induction of a regulatory B cell population in experimental allergic encephalomyelitis by alteration of the gut commensal microflora. *Gut Microbes*. 2010 Mar;1(2):103-108. Epub 2010 Feb 15.
11. Kieseier BC (2006) Assessing long-term effects of disease modifying drugs. *J Neurol*; 253:VI/23-VI/30.
12. Sladkova V, Mares J, Lubenova B, Zapletalova J, Stejskal D, Hlustik P, Kanovsky P (2011) 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.* 33(4):415-20.
13. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier BC, Hartung HP (2006) Immunopathogenesis and Immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(4):201-11.
 14. Bednařík J, Ambler Z, Růžička E et al. *Klinická neurologie. Část speciální I.* Praha: Triton, 2010. Str. 511
 15. Bednařík J, Ambler Z, Růžička E et al. *Klinická neurologie. Část speciální I.* Praha: Triton, 2010. Str. 510-512
 16. Havrdová E a kolektiv. *Roztroušená skleróza.* Praha: Mladá fronta, 2013. Str. 39-86.
 17. Martin R, Sopedra M, Rosito M, Engelhardt B. Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *Eur. J. Immunol.* 2016. 46, 2078–2090.
 18. Blatt N, , Khaiboullin T, Lombardi V, Rizvanov A and Khaiboullina S (2017). The Skin–Brain Connection Hypothesis, Bringing Together CCL27-Mediated T-Cell Activation in the Skin and Neural Cell Damage in the Adult Brain. *Front. Immunol.* 7:683. doi: 10.3389/fimmu.2016.00683
 19. Zouali M and Tsay G. Developing Connections among B Lymphocytes and Deregulated Pathways in Autoimmunity. *Molecular Medicine:* 705-712. 2016
 20. Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A (2015). B cells in the multiple sclerosis central nervous system: trafficking and contribution to CNS-compartmentalized inflammation. *Front. Immunol.* 2015. 6, 636.
 21. Wekerle H. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity,* 50:1, 57-60, DOI: 10.1080/08916934.2017.1281914
 22. Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Bøddeker I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain*(2001) 124(Pt 11):2169–76. doi:10.1093/brain/124.11.2169
 23. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2012 Nov 5;8(11):613-23. doi: 10.1038/nrneurol.2012.203
 24. Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B cells in the multiple sclerosis central nervous system: trafficking and contribution to CNS-compartmentalized inflammation. *Front. Immunol.* 2015. 6, 636.

25. Ascherio A, Munger KL. EBV and autoimmunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015 390, 365–385
26. Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, Rosicarelli B, Veroni C, Chiappetta G, Magliozzi R, Reynolds R, Coccia EM, Aloisi F (2010). Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 677–693.
27. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Roztrou%C5%A1en%C3%A1_skler%C3%B3za#/media/File:Symptoms_of_multiple_sclerosis_cs.svg (aktualizované 25.4. 2017, použité 26.5. 2017).
28. Dufek M. Roztroušená skleróza – EDSS (expanded disability status scale), tzv. Kurtzkeho škála. *Neurol. praxi* 2011; 12(Suppl. G): 6–9
29. Dostupné z: https://www.google.sk/search?q=%C5%A1k%C3%A1a+edss&rlz=1C1EJFA_enSK672SK672&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiY3pyDmJHUAhXCL8AKHbLBBpkQ_AUIBigB&biw=1366&bih=613#imgrc=FyIbTHdpZiwcKM (aktualizované 31.1. 2013, použité 26.5. 2017)
30. Bednařík J, Ambler Z, Rôžička E et al. *Klinická neurologie. Část speciální I.* Praha: Triton, 2010. Str. 517
31. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/roztrousena-skleroza-neuromyelitis-optica-a-antifosfolipidovy-syndrom-z-diferencialnediagnostickeho-pohledu-neurologa-461281> (aktualizované 6.9. 2011, použité 26.5. 2017)
32. Dostupné z: https://www.google.sk/search?q=izoelektroforegramy&rlz=1C1EJFA_enSK672SK672&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi2yZntpJHUAhVJKsAKHZdQAYAQ_AUIBigB&biw=1366&bih=613#tbm=isch&q=elektroforesis+multiple+sclerosis&imgdii=Fhnjiejq5t0OpaM:&imgrc=ST0OgsPCZnTjCM: (aktualizácia neuviedena, použité 26.5. 2017)
33. Vališ M, Pavelek Z. Základní diagnostika a léčba roztroušené sklerózy. *Med. praxi* 2015; 12(2): 77–82
34. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Lecba-roztrousene-sklerozy/6-L-hj.magarticle.aspx> (aktualizácia neuviedená, publikované v januári 2007, použité 26.5. 2017)

35. Křupka a kol. *Základy imunofarmakologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2017. Str. 71-72.
36. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Glatiramer-acetat-protizanetlive-a-neuroprotektivni-mechanismy-ucink/6-F-1MX.magarticle.aspx> (aktualizácia nevedená, publikované v decembri 2014, použité 26.5. 2017)
37. Miller AE. Teriflunomide in multiple sclerosis: an update. *Neurodegener Dis Manag.* 2017 Feb;7(1):9-29. doi: 10.2217/nmt-2016-0029. Epub 2016 Dec 12.
38. Dostupné z : <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Teriflunomid/6-I-1KH.magarticle.aspx> (aktualizácia nevedená, publikované v októbri 2014, použité 26.5. 2017)
39. Kieseier BC, Benamor M. Pregnancy outcomes following maternal and paternal exposure to teriflunomide during treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Ther.* 2014 Nov 20;3(2):133-8. doi: 10.1007/s40120-014-0020-y. eCollection 2014 Dec
40. Davenport a kol. (2016). Teriflunomide mechanism of action: Linking species' sensitivities to pregnancy outcomes. AAN 2016 presented at the 68th Annual meeting of the American Academy of Neurology. April 15-21. 2016. Vancouver, Bc, Canada
41. Křupka a kol. *Základy imunofarmakologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. Str. 70-71.
42. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2014/5-2014/Soucasne-moznosti-a-zasady-farmakoterapie-relabujici-remitujici-roztrousene-sklerozy/e-1AD-1KG-1KR.magarticle.aspx> (aktualizácia nevedená, publikované v októbri 2014, použité 26.5. 2017)
43. Gold R, Arnold DL, Bar-Or A, Hutchinson M, Kappos L, Havrdova E, MacManus DG, Yousry TA, Pozzilli C, Selmaj K, Sweetser MT, Zhang R, Yang M, Potts J, Novas M, Miller DH, Kurukulasuriya NC, Fox RJ, Phillips TJ. Long-term effects of delayed-release dimethyl fumarate in multiple sclerosis: Interim analysis of ENDORSE, a randomized extension study. *Mult Scler.* 2017 Feb;23(2):253-265. doi: 10.1177/1352458516649037. Epub 2016 Jul 11.
44. Robert J. Fox, Lymphocyte Count Reductions with Delayed-Release Dimethyl Fumarate: Integrated Analysis of the Phase 2, Phase 3 and Extension Studies. Poster session presented at the meeting ACTRIMS-ECTRIMS, September 10 – 13, 2014, Boston, MA, USA.

45. Izquierdo G, Damas F, Páramo MD, Ruiz-Peña JL, Navarro G. The real-world effectiveness and safety of fingolimod in relapsing-remitting multiple sclerosis patients: An observational study. *PLoS One*. 2017 Apr 28;12(4):e0176174. doi: 10.1371/journal.pone.0176174. eCollection 2017.
46. Křupka a kol. *Základy imunofarmakologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2017. Str. 69-70
47. Havrdová E a kolektiv. *Roztroušená skleróza*. Praha: Mladá fronta, 2013. Str. 307-315.
48. Artusi CA, Liberto AD, Rolla S, Bardina V, Barbero P, Mercanti SF, Durelli L. Natalizumab in Multiple Sclerosis: Long-Term Management. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 29;18(5). pii: E940. doi: 10.3390/ijms18050940.
49. Havrdová E a kolektiv. *Roztroušená skleróza*. Praha: Mladá fronta, 2013. Str. 303-306.
50. Piřha J. Individualizovaný přístup k léčbě roztroušené sklerózy *Cesk Slov Neurol N2016*;79/112(5):528-533
51. Riera R, Porfirio GJ, Torloni MR. Alemtuzumab for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Apr 15;4:CD011203. doi: 10.1002/14651858.CD011203.pub2
52. Dörr J, Baum K. Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis: patient selection and special considerations. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Oct 18;10:3379-3386. eCollection 2016.
53. Coles AJ¹, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, Bass AD, Wynn DR, Margolin DH, Lake SL, Moran S, Palmer J, Smith MS, Compston DA. *Lancet Neurol*. Alemtuzumab versus interferon β -1a in early relapsing-remitting multiple sclerosis: post-hoc and subset analyses of clinical efficacy outcomes. 2011 Apr;10(4):338-48. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70020
54. Giovannoni G, Cohen JA, Coles AJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Margolin DH, Lake SL, Kaup SM, Panzara MA, Compston DA; CARE-MS II Investigators. *Neurology*. Alemtuzumab improves preexisting disability in active relapsing-remitting MS patients. 2016 Nov 8;87(19):1985-1992. Epub 2016 Oct 12.
55. Donáth V, Laurincová S. Nová perspektívna liečba sclerosis multiplex. *Neurol. prax* 2014; 15(2): 57–59
56. Meluzínová E. Alemtuzumab v léčbě roztroušené sklerózy. *Neurol. praxi* 2015; 16(4): 237–240
57. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis.

- EBioMedicine. 2017 Feb;16:41-50. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.01.042. Epub 2017 Jan 31.
58. Gurčík L. Primárne progresívna roztrúsená skleróza – diagnostika, klinické aspekty a liečba. *Neurol. praxi* 2011; 12(5): 321–328
59. Pöhlau D, Przuntek H, Sailer M, Bethke F, Koehler J, König N, Heesen C, Späth P, Andresen I. Intravenous immunoglobulin in primary and secondary chronic progressive multiple sclerosis: a randomized placebo controlled multicentre study. *Mult Scler* 2007; 13(9): 1107–1117.
60. Havrdová E a kolektív. Roztroušená skleróza. Praha: Mladá fronta, 2013. Str. 303-306.
61. Piňha J. Imunosupresiva v léčbě neurologických onemocnění. *Neurol. praxi* 2011; 12(6): 389–393
62. Špalek P. Intravenózný imunoglobulín v liečbe neurologických ochorení: súčasné poznatky a odporúčania pre prax. *Neurol. pro praxi*, 2008; 9(6): 362–366
63. 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 Jan 18;76(3):294-300. doi: 10.1212/WNL.0b013e318207b1f6.
64. Havrdová E a kolektív. (2013) Roztroušená skleróza. Vydalo nakladatelství Mladá fronta. Str. 368-417.
65. Mejuto B, Castellano P, Castro C, López LM. Assessment of the efficacy and safety of fampridine. *Farm Hosp.* 2017 Mar 1;41(2):283-291. doi: 10.7399/fh.2017.41.2.10615.
66. Ziemssen T, Prosser C, Haas JS, Lee A, Braun S, Landsman-Blumberg P, Kempel A, Gleißner E, Patel S, Huang MY⁴ Healthcare resource use and costs of multiple sclerosis patients in Germany before and during fampridine treatment. *BMC Neurol.* 2017 Mar 27;17(1):62. doi: 10.1186/s12883-017-0844-z.
67. Vachová M. , Mgr. Dušánková J , MUDr. Zámečník L. Symptomatická léčba roztroušené sklerózy. *Neurol. pro praxi*, 2008; 9(4): 226–23
68. Martins TB, Rose JW, Jaskowski TD, Wilson AR, Husebye D, Seraj HS, Hill HR (2011) Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *Am J Clin Pathol.* 2011 Nov;136(5):696-704.

69. Wen SR, Liu GJ, Feng RN, Gong FC, Zhong H, Duan SR, Bi S. Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2012 Mar;244(1-2):94-6.
70. Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL (2006) IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligonucleotides increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol.* 2006 Jun15;176(12):7768-74.
71. Bagnato F, Durastanti V, Finamore L, Volante G, Millefiorini E (2003) Beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 24:S301-S304
72. Bjerrum OW, Bach FW, Zeeberg I (1988) Increased level of cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin is related to neurologic impairment in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 78(1):72-5.
73. Carrieri PB, Indaco A, Maiorino A, Buscaino GA, Ponticiello A, Liberti A, Perrella O (1992) Cerebrospinal fluid beta-2-microglobulin in multiple sclerosis and AIDS dementia complex. *Neurol Res.* 14(3):282-3.
74. Bielekova B, Komori M, Xu Q, Reich DS, Wu T (2012) Cerebrospinal fluid IL-12p40, CXCL13 and IL-8 as a combinatorial biomarker of active intrathecal inflammation. *PLoS One.* 7(11):e48370.
75. Mirowska-Guzel DM, Kurowska K, Skierski J, Koronkiewicz M, Wicha W, Kruszewska J, Czlonkowski A, Czlonkowska A. High dose of intravenously given glucocorticosteroids decrease IL-8 production by monocytes in multiple sclerosis patients treated during relapse. *J Neuroimmunol.* 176(1-2):134-40. Epub 2006 May 24.
76. Lund BT, Ashikian N, Ta HQ, Chakryan Y, Manoukian K, Groshen S, Gilmore W, Cheema GS, Stohl W, Burnett ME, Ko D, Kachuck NJ, Weiner LP (2004) Increased CXCL8 (IL-8) expression in Multiple Sclerosis. *J Neuroimmunol.* 155(1-2):161-71.
77. Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z (2005) The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. *Eur J Neurol.*;12(1):49-54.
78. Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V (2001) Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol.* 115(1-2):192-8.

79. Neuteboom RF, Verbraak E, Voerman JS, van Meurs M, Steegers EA, de Groot CJ, Laman JD, Hintzen RQ (2009) First trimester interleukin 8 levels are associated with postpartum relapse in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 15(11):1356-8.
80. Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J (2005) Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optico-spinal multiple sclerosis. *Brain.* 128(Pt 5):988-1002.
81. Maimone D, Gregory S, Arnason BG, Reder AT (1991) Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 32(1):67-74.
82. Stelmasiak Z, Koziol-Montewka M, Dobosz B, Rejdak K, Bartosik-Psujek H, Mitosek-Szewczyk K, Belniak-Legieć E (2000) Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Med Sci Monit.* 6(6):1104-8.
83. Hirotsu M, Niino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Yabe I, Hamada S, Tajima Y, Sasaki H.(2000) Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 221(1-2):95-100.
84. Pul R, Moharreggh-Khiabani D, Škuljec J, Skripuletz T, Garde N, Voss EV, Stangel M (2011) Glatiramer acetate modulates TNF- α and IL-10 secretion in microglia and promotes their phagocytic activity. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2011 Sep;6(3):381-8.
85. Adam P, Sobek O, Táborský L, Hildebrand T, Tutterová O, Záček P (2003) CSF and serum orosomucoid (alpha-1-acid glycoprotein) in patients with multiple sclerosis: a comparison among particular subgroups of MS patients. *Clin Chim Acta.* 334(1-2):107-10.
86. Rossi S, Motta C, Studer V, Rocchi C, Macchiarulo G, Barbieri F, Marfia G, Furlan R, Martino G, Mancino R, Centonze D. Interleukin-8 is associated with acute and persistent dysfunction after optic neuritis. *Mult Scler.* 20(14):1841-50.
87. Rossi S, Motta C, Studer V, Macchiarulo G, Germani G, Finardi A, Furlan R, Martino G, Centonze D. Subclinical central inflammation is risk for RIS and CIS conversion to MS. *Mult Scler.* 21(11):1443-52.
88. Tomioka R, Matsui M (2014) Biomarkers for Multiple Sclerosis. *Inter Med* 53: 361-365
89. O'Connell KE, Mok T, Sweeney B, Ryan AM, Dev KK (2014). The use of cytokine signature patterns: separating drug naïve, interferon and natalizumab-treated multiple sclerosis patients. *Autoimmunity.* 2014 Dec;47(8):505-11.

90. Yoshio T, Okamoto H, Kurasawa K, Dei Y, Hirohata S, Minota S (2016) IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 and G-CSF are significantly increased in cerebrospinal fluid but not in sera of patients with central neuropsychiatric lupus erythematosus. *Lupus*.
91. Chalbot S, Zetterberg H, Blennow K, Fladby T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2010). Cerebrospinal Fluid Secretory Ca²⁺-Dependent Phospholipase A2 activity: A Biomarker of Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Permeability. *Neurosci Lett*. 478(3): 179–183.
92. Choi YK, Kim KW (2008). Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep*. 41(5):345-52.
93. Hamzaoui K1, Ayed K, Hamza M, Hamzaoui A (2009). VEGF and mRNA VEGF expression in CSF from Behçet's disease with neurological involvement. *J Neuroimmunol*. 2009 Aug 18;213(1-2):148-53.
94. Kitz K, Lassmann H, Karcher D, Lowenthal A (1984) Blood-brain barrier in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: a correlative study between cerebrospinal fluid protein concentrations and tracer leakage in the central nervous system. *Acta Neuropathol.*;63(1):41-50
95. Hov KR1, Berg JP, Frihagen F, Ræder J, Hall R, Wyller TB, Watne LO (2016). Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Integrity in Delirium Determined by Q-Albumin. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 41(3-4):192-198.
96. Brettschneider J, Claus A, Kassubek J, Tumani H (2005). Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol*. 252(9):1067-73
97. Jesse S, Brettschneider J, Süßmuth S, Landwehrmeyer B, von Arnim Ch, Ludolph A, Tumani H, and Otto M (2010). Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases. *J Neurol*. 258(6): 1034–1041
98. Leonardi A, Abbruzzese G, Arata L, Cocito L, Vische M (1984) Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 231(2):75-8.
99. Uher T, Horakova D, Tyblova M, Zeman D, Krasulova E, Mrazova K, Seidl Z, Vaneckova M, Krasensky J, Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Havrdova E, Zivadinov R (2016) Increased albumin quotient (QAlb) in patients after first clinical event suggestive of multiple sclerosis is associated with development of brain atrophy and greater disability 48 months later. *Mult Scler*. 2016 May;22(6):770-81.

10 Publikácie

10.1 Práce súvisiace s dizertačnou prácou

V tejto časti sú zosumarizované publikácie a abstrakty súvisiace s výskumom.

10.1.1 Původné vedecké publikácie uverejnené in extenso v recenzovaných vedeckých časopisoch s IF

Matejčíková Z, Mareš J, Přikrylová Vranová H, Klosová J, Sládková V, Doláková J, Zapletalová J, Kaňovský P. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015 Feb;122(2):273-7. doi: 10.1007/s00702-014-1244-9. Epub 2014 Jun 4. IF₂₀₁₄ 2,587

Citované v: Sofia Sisay, Lorena Lopez-Lozano, Marius Mickunas, Antonio Quiroga-Fernández, Jacqueline Palace, Gary Warnes, Roberto Alvarez Lafuente, Priyamvada Dua and Ute-Christiane Meier Untreated relapsing remitting multiple sclerosis patients show antibody production against latent Epstein Barr Virus (EBV) antigens mainly in the periphery and innate immune IL-8 responses preferentially in the CNS Journal: Journal of Neuroimmunology, 2017 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.017

Citované v: Seden Demirci, Serpil Demirci, Suleyman Kutluhan, Hasan Rifat Koyuncuoglu and Vedat Ali Yurekli. The clinical significance of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in multiple sclerosis Journal: International Journal of Neuroscience, 2015, Page 1 DOI: 10.3109/00207454.2015.1050492

Matejčíková Z, Mareš J, Sládková V, Svrčinová T, Skalská S, Zapletalová J, Kaňovský P. Cerebrospinal fluid and serum levels of interleukin-8 in patients with multiple sclerosis and its correlation with Q-albumin. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* (2017).

10.1.2 Prehľadné vedecké publikácie in extenso uverejnené v recenzovaných vedeckých časopisoch

Matejčíková Z, Mareš J., Kaňovský P. T a B lymfocyty a ich úloha u roztrúsenej sklerózy. V redakčnom riadení *Neurologie pro praxi*

10.1.3 Publikované abstrakty

Z. Matejčikova, J. Mares, V. Sladkova, T. Svrčinova, J. Klosova, S. Skalska, J. Dolakova, P. Kanovsky Cerebrospinal fluid and serum levels of interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, beta-2-microglobulin and orosomuroid at the time of first clinical symptoms in MS patients. 31st Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), Barcelona, Spain, 7-10- oct- 2015 abstrakt (Abstract release date: Sep 23, 2015) ECTRIMS Online Library. Matejčikova Z. Oct 8, 2015; 115833

Z. Matejčikova, J. Mares, V. Sladkova, T. Svrčinova, P. Kanovsky. CSF and serum levels of interleukin 8 and its correlation with other CSF markers. the 2nd Congress of the European Academy of Neurology, Copenhagen, Denmark, June 2016, abstrakt European Journal of Neurology, 23 (Suppl.), 345–600

Z. Matejčikova, J. Mares, V. Sladkova, J. Klosova, S. Skalska, T. Svrčinova, J. Zapletalova, P. Kanovsky. CSF and serum levels of interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, beta-2-micro-globulin and orosomuroid at the time of first clinical symptoms in MS patients. The 1st Congress of the European Academy of Neurology, Berlin, Germany, June 2015 abstrakt European Journal of Neurology, 22 (Suppl. 1), 484–828

Z. Matejčikova, J. Mares, H. Prikrylova-Vranova, J. Klosova, V. Sladkova, J. Zapletalova, P. Hlustik, P. Kanovsky. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in patients with multiple sclerosis. the Joint Congress of European Neurology, Istanbul, Turkey, May 2014. abstrakt European Journal of Neurology 21 (Suppl. 1), 388–713

Zuzana Matejčikova, Jan Mares, Jana Klosova, Vladimira Sladkova, Silvia Skalska, Tereza Svrčinova, Jana Zapletalova, Petr Kanovsky. CSF and serum levels of interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, beta-2-microglobulin and orosomuroid at the time of first clinical symptoms in MS patients. The 67th American Academy of Neurology 2015, Washington DC, USA abstrakt: Neurology April 6, 2015 vol. 84 no. 14 Supplement P5.217

Zuzana Matejčikova, Hana Prikrylova-Vranova, Jana Klosova, Vladimira Sladkova, Jana Zapletalova, Jan Mares, Petr Kanovsky Can Inflammatory Markers From CSF Be Helpful In

Diagnosis Of Multiple Sclerosis? The 66th American Academy of Neurology 2014, Philadelphia, USA, abstrakt: Neurology April 8, 2014 vol. 82 no. 10 Supplement P4.137

Z. Matejčikova, J. Mares, J. Klosova, V. Sladkova, S. Skalska, T. Svrčinova, J. Zapletalova, P. Kanovsky. CSF and serum levels of inflammatory markers at the time of first clinical symptoms in MS patients. XXII. World Congress of Neurology. Santiago, Chile 2015. Journal of the Neurological Sciences 357 (2015) e295–e323

J. Mares, V. Sladkova, **Z. Matejčikova**, S. Skalska, T. Svrčinova, J. Klosova, J. Dolakova, P. Kanovsky Biological markers of neurodegenerative and inflammatory processes in multiple sclerosis. XXII. World Congress of Neurology. Santiago, Chile 2015. Journal of the Neurological Sciences 357 (2015) e295–e323

Matejčiková Z, Mareš J, Klosová J, Sládková V, Skalská S, Svrčinová T, Zapletalová J, Kaňovský P. Sérové a likvorové hladiny interleukinu- 6, interleukinu- 8, interleukinu- 10, beta-2- mikroglobulinu a orosumokoidu u pacientov s roztrúsenou sklerózou v čase prvých klinických príznakov. 29. slovenský a český neurologický zjazd 43. slovenský a český cerebrovaskulárny kongres Košice, 2015Cesk Slov Ne urol N 2015; 78/ 111 (Suppl)

Matejčiková Z, Mareš J, Prikrylová Vranová H , Sládková V, Klosová J, Svrčinová, Skalská S, Kaňovský P. Zánětlivé markery v likvoru u pacientů s roztroušenou sklerózou. 28. český a slovenský neurologický sjezd Ostrava, 2014 Cesk Slov Neurol N 2014; 77/110 (Suppl)

11 Prílohy

V prílohách sú uvedené prvoautorské publikácie súvisiace s dizertačnou prácou.

11.1 Publikácia č. 1

Matejčíková Z, Mareš J, Přikrylová Vranová H, Klosová J, Sládková V, Doláková J, Zapletalová J, Kaňovský P. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015 Feb;122(2):273-7. doi: 10.1007/s00702-014-1244-9. Epub 2014 Jun 4. IF₂₀₁₄ 2,587

Cerebrospinal fluid inflammatory markers in patients with multiple sclerosis: a pilot study

Z. Matejčiková · J. Mareš · H. Přikrylová Vranová ·
J. Klosová · V. Sládková · J. Doláková ·
J. Zapletalová · P. Kaňovský

Received: 6 November 2013 / Accepted: 12 April 2014 / Published online: 4 June 2014
© Springer-Verlag Wien 2014

Abstract Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system. Autoimmune inflammation is common in the early stages of MS. This stage is followed by the neurodegenerative process. The result of these changes is axon and myelin breakdown. Although MS is according to McDonald's revised diagnostic criteria primarily a clinical diagnosis, paraclinical investigation methods are an important part in the diagnosis of MS. In common practice, magnetic resonance imaging of the brain and spinal cord, examination of cerebrospinal fluid (CSF) and examination of visual evoked potentials are used. There are an increasing number of studies dealing with biomarkers in CSF and their role in the diagnosis and treatment of MS. We hypothesized that the levels of some markers could be changed in MS in comparison with controls. We studied five inflammatory markers [interleukin-6 (IL-6), interleukin-8, interleukin-10 (IL-10), beta-2-microglobulin, orosomucoid]. CSF and serum levels of inflammatory markers were assessed in 38 patients with newly diagnosed MS meeting McDonald's revised diagnostic criteria and in 28 subjects as a control group (CG). Levels of beta-2-microglobulin and interleukin-8 in CSF were found to be significantly higher in MS

patients in comparison to CG ($p < 0.001$ resp. $p = 0.007$). No differences in other CSF markers (IL-6, IL-10 and orosomucoid) and serum levels of all markers between both groups were found. The levels of two studied inflammatory markers were found to be increased at the time of first clinical symptoms of MS. Research on the role of inflammatory and neurodegenerative markers in MS should continue.

Keywords Interleukin-6 · Interleukin-8 · Interleukin-10 · Beta-2-microglobulin · Orosomucoid

Introduction

Multiple sclerosis is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system. The inflammation is caused by autoimmune processes especially appearing in the early stages of MS. The neurodegenerative processes appear mainly in later stages of MS. The disease is characterized by many inflammatory infiltrates especially in the white matter, where T-lymphocytes and macrophages are activated (also fewer B-lymphocytes). T-lymphocytes are probably activated in the periphery. After activation these specific lymphocytes proliferate into the final tissue and initiate the inflammatory lesion by the production of many pro-inflammatory cytokines. The damage of myelin and oligodendrocytes is followed in this lesion. The demyelinating fibre loses the ability to spread electric impulses, and the cells of major histocompatibility complex I (MHC I) are also expressed. Through these processes the fibre becomes visible for CD8 cytotoxic lymphocytes, which damage this fibre. The neurodegeneration is caused by microglia's activation and mediated by oxidative stress and excitotoxicity. The axon loss in white and grey matter is

Z. Matejčiková (✉) · J. Mareš · H. Přikrylová Vranová ·
J. Klosová · V. Sládková · J. Doláková · P. Kaňovský
Department of Neurology, Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University, Olomouc, Czech Republic
e-mail: matejcikova.zuzana@post.sk

Z. Matejčiková · J. Mareš · H. Přikrylová Vranová ·
J. Klosová · V. Sládková · J. Doláková · P. Kaňovský
University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

J. Zapletalová
Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine and
Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

present in early stages of MS and correlates with the cognitive deficit and also with the permanent disability.

Generally, relapses are the clinical equivalent of the acute focal inflammation, and progression is caused by chronic neurodegeneration. The standard diagnostic test in patients with suspected MS is the examination of the intrathecal synthesis of IgG antibodies. However, it is important to discover the more detailed mechanism causing MS. One of these methods is the examination of CSF and levels of inflammatory and neurodegenerative markers in CSF.

The aim of our study was to ascertain levels of some inflammatory markers in MS patients in comparison to the control group. Based on the results of previous studies and the availability of testing in our laboratory, we chose five inflammatory markers (IL-6, IL-8, IL-10, beta-2 microglobulin, orosomucoid) to investigate their CSF levels at the time of first clinical symptoms of MS.

Methods

The study was approved by the Institutional Ethics Committee, and all patients have signed an informed consent to lumbar puncture.

The study was based on CSF and serum examination in patients with MS and the control group. In the control group were patients with non-inflammatory disease of CNS (e.g., headache, vertigo, back pain, etc.). The lumbar puncture was indicated from differential diagnostic reasons, to exclude other pathological processes of CNS. In the MS patients, the lumbar puncture was indicated and performed for diagnostic purposes in cases suggestive of MS, at the time of the first clinical symptoms compatible with MS. The diagnosis of MS was confirmed in all patients included in MS group. All patients included in the MS group fulfilled the McDonald's revised diagnostic criteria. None of our patients had been treated by corticosteroids before the lumbar puncture.

The lumbar puncture was performed by means of atraumatic needle under aseptic conditions. About 10 ml of CSF was taken along with around 10 ml of blood from each participant. The serum and CSF were the subject of haematological, immunological and biological testing. The protein CSF level and cell count were normal in all patients, without signs of neuroinflammation. There were also no signs of any other inflammation at the time of lumbar puncture.

Biomarker selection and measurement

CSF and serum were analyzed to assess the levels of five inflammatory markers: interleukin-6, interleukin-8,

interleukin-10, beta-2-microglobulin, orosomucoid, available for testing in our laboratory at the study onset.

The principle of measurement of IL-6 levels used in our study was ELISA (solid-phase, enzyme-labelled, chemiluminescent sequential immunometric assay, IMMULITE®/IMMULITE® 1000 IL-6, Catalogue Number: LK6PZ, LK6P1). Incubation Cycles: 2 × 30 min. Analytical sensitivity: 2 pg/ml. Reference limits: CSF 0–18 pg/ml, serum 0–5.9 pg/ml.

For measurement of IL-8 ELISA was also used (IMMULITE®/IMMULITE® 1000 IL-8, Catalogue Number LK8P1). Incubation Cycles: 1 × 30 min. Analytical sensitivity: 2 pg/ml. Reference limits: CSF 0–62 pg/ml, serum 0–62 pg/ml.

The same method was used also for measurement levels of IL-10. IMMULITE®/IMMULITE® 1000 IL-10, Catalogue Number: LKXPZ, LKXP1. Incubation Cycles: 1 × 60 min. Analytical sensitivity: 1 pg/ml. Reference limits: CSF 0–39 pg/ml, serum: 0–9.1 pg/ml.

Levels of beta-2-microglobulin were measured by particle-enhanced immunonephelometry using the BN* II and BN ProSpec® System. Reference limits: CSF 0.2–2 mg/l, serum 1–3 mg/l. Coefficients of variation (CV): CSF 2.7 %, serum 2.7 %.

Levels of orosomucoid were also measured by particle-enhanced immunonephelometry using the BN* II and BN ProSpec® System. Reference limits: CSF 1.8–4.5 mg/l, serum 0.3–1.3 g/l. Coefficients of variation (CV): CSF 3.3 %, serum 3.8 %.

Statistical analysis

Then, the results were statistically processed using SPSS software version 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). The categorical data were compared by Fisher's exact test.

The Mann–Whitney *U* test was used to compare quantitative parameters. The age was compared by the Student's *t* test. The normality of data was checked by the Shapiro–Wilk test. Tests were made at the significance level of 0.05.

Results

We investigated a group of 66 patients. CSF and serum examinations were performed in 38 patients with newly diagnosed MS meeting McDonald's revised diagnostic criteria (25 females, 13 males; mean age 35.8 ± 9.1 years) and in 28 control group patients (20 females, 8 males; mean age 39.7 ± 13.0 years). No statistically significant differences in demographic data between patients and control group were found. The demographic data are shown in Table 1.

Significantly higher CSF levels of IL-8 (52.8 (41.6–68.3); $p < 0.001$, Mann–Whitney *U* test) and beta-2-

microglobulin (1.26 (1.03–1.37); $p = 0.007$, Mann–Whitney U test) in MS patients group were found. No differences in other CSF markers (IL-6, IL-10 and orosomucoid) and in serum levels of all markers between both groups were found (Tables 2, 3; Figs. 1, 2).

Discussion

We identified increased levels of IL-8 and beta-2 microglobulin in CSF. These results confirm the presence of inflammatory processes at time of the first clinical symptoms of MS.

There have been multiple studies investigating the levels of inflammatory markers in the cerebrospinal fluid in MS. Their results are not entirely consistent, which probably results from the great clinical diversity of the studied populations. There are studies which examine a wider range of biomarkers, which are not included in our research and have interesting results. Martins et al.

Table 1 Characteristic of patients

	MS (n = 38)	Controls (n = 28)	p
Females	25 (65.8 %)	20 (71.4 %)	0.790
Age	35.8 ± 9.1	39.7 ± 13.0	0.182

Table 2 Levels of investigated markers in CSF

Levels	Multiple sclerosis Median ± SD (min–max)	Control group Median ± SD (min–max)	p
IL-6 (pg/ml)	2.1 ± 1.48 (2.0–9.1)	2.1 ± 0.83 (2.0–5.8)	0.607
IL-8 (pg/ml)	52.8 ± 15.65 (32.5–92.3)	36.8 ± 9.11 (24.1–60.2)	<0.0001
IL-10 (pg/ml)	5.0 ± 0.58 (5.0–8.4)	5.0 ± 0.12 (5.0–5.6)	0.841
Beta-2-microglobulin (mg/l)	1.26 ± 0.22 (0.91–1.82)	0.96 ± 0.34 (0.6–2.03)	0.007
Orosomucoid (mg/l)	4.57 ± 2.57 (0.0–9.29)	5.00 ± 2.44 (0.0–10.1)	0.348

SD standard deviation

Table 3 Levels of investigated markers in serum

Levels	Multiple sclerosis Median ± SD (min–max)	Control group Median ± SD (min–max)	p
IL-6 (pg/ml)	2.0 ± 1.54 (2.0–9.5)	2.0 ± 0.78 (2.0–5.0)	0.489
IL-8 (pg/ml)	7.7 ± 36.74 (5.0–232.0)	7.2 ± 7.16 (5.0–42.3)	0.896
IL-10 (pg/ml)	5.0 ± 2.36 (5.0–18.1)	5.0 ± 1.09 (5.0–10.7)	0.228
Beta-2-microglobulin (mg/l)	1.53 ± 0.63 (1.26–5.12)	1.61 ± 0.56 (1.02–3.97)	0.626
Orosomucoid (g/l)	0.76 ± 0.24 (0.41–1.28)	0.77 ± 0.24 (0.47–1.58)	0.311

SD standard deviation

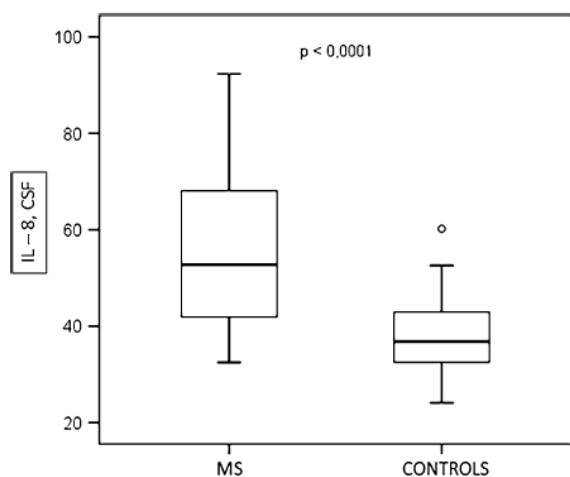


Fig. 1 Box graph showing statistically significantly higher levels of interleukin-8 in MS patients in comparison to controls

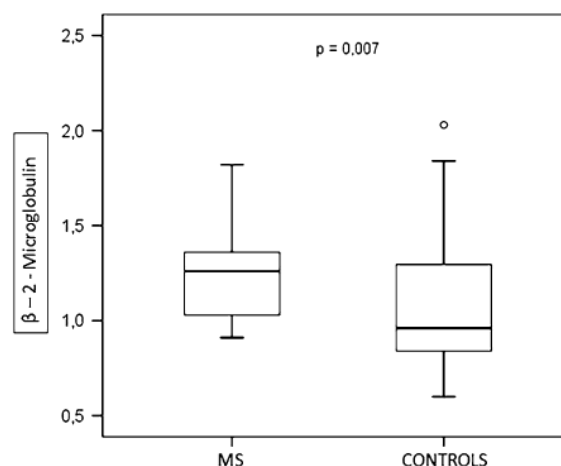


Fig. 2 Box graph showing statistically significantly higher levels of beta-2-microglobulin in MS patients in comparison to controls

(2011) analyzed the serum concentrations of 13 proinflammatory and anti-inflammatory markers. Significant increases between patients and control subjects were found in seven of them. Another frequently discussed marker is the cytokine interleukin-23 (IL-23). IL-23 was found significant elevated in study by Wen et al. (2012). The study by Vaknin-Dembinsky et al. (2006) reported an increase in the levels of IL-23 secreted from monocyte-derived dendritic cells as well as increased mRNA production of both IL-23p19 in MS patients. There is also a more comprehensive study by Modvig et al. (2013) dealing with the interrelation among biomarkers of inflammation, demyelination and neurodegeneration in acute optic neuritis and to assess their association with MS risk. In that study, it was found that the CSF biomarkers of leukocyte infiltration (CXCL13, MMP-9, CXCL10) are associated strongly with MS-risk parameters, whereas CHI3L1 and MBP correlated with MRI findings (dissemination in space), but not with CSF MS-risk parameters and osteopontin and NF-L do not correlate with any MS-risk parameters. However, in the following discussion, we will focus on the markers we have included in our study.

Beta-2 microglobulin is the part of histocompatibility antigens on cell surfaces. It plays an important role in intercellular interactions and is used as a cell turnover marker. It is mostly found on white blood cells (especially B lymphocytes). Beta-2- microglobulin has been found to correlate with disease activity in several autoimmune disorders. It is also used as a pharmacodynamic marker of interferon beta, which is used for treating MS patients at the present time (Bagnato et al. 2003; Bjerrum et al. 1988). This outcome correlates with our conclusion. However, no other studies showed differences in serum and CSF levels of beta-2 microglobulin in MS patients in comparison to controls (Sladkova et al. 2011; Carrieri et al. 1992). As a result, there are inconsistent results concerning beta-2-microglobulin in MS patients today. Additional studies of beta-2-microglobulin are needed.

Interleukin-8 (IL-8) is an inflammatory chemokine. It attracts and activates neutrophils and a subpopulation of lymphocytes. It also has a strong angiogenic effect. Interleukin-8 is produced by many cells such as monocytes, lymphocytes, granulocytes, fibroblasts, endothelial cells and astrocytes. It is elevated in CSF in inflammatory processes of CNS (Bielekova et al. 2012). Interleukin-8 is also responsible for blood–brain barrier disruption and the migration of immune cells to the CNS. According to one very interesting study on the effect of high-dose corticosteroids on levels of interleukin-8, the blood levels of interleukin-8 decrease after therapy (Mirowska-Guzel et al. 2006). The serum levels are also decreased in MS patients receiving interferon

beta 1a therapy in comparison to untreated MS patients (Lund et al. 2004). Two other studies also confirm our results, and their authors found a significant rise of CSF levels of IL-8 in MS during relapse (Bartosik-Psujek and Stelmasiak 2005; Franciotta et al. 2001). The fact that IL-8 is associated with disease activity was used in other research. Neuteboom et al. (2009) researched levels of IL-8 in MS patients during pregnancy. High serum levels of IL-8 during the first trimester were associated with a high risk of postpartum relapses. Another study compared levels of interleukins in two types of MS (optico-spinal and conventional). Elevated levels of IL-8 were found in both groups. However, in optico-spinal MS the levels were significantly higher than in conventional MS. According to this study, elevated levels of IL-8 also correlate with Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Ishizu et al. 2005). All of these studies suggest that IL-8 is an important chemokine in the inflammatory phase of MS. The results of our study also confirm these findings.

We found no statistically significant levels of the other three biomarkers (IL-6, IL-10, orosomucoid) in our study.

Interleukin-6 (IL-6) is the proinflammatory cytokine. It might be responsible for immunoglobulin (Ig) synthesis in the CNS (Maimone et al. 1991). Low levels of IL-6 were found by Maimone et al. (1991) in most sera from MS patients and also in patients with non-inflammatory neurological disease. Other results of this study indicate increased CSF levels of IL-6 in MS patients and also in patients with inflammatory neurological disease, without correlation to intrathecal synthesis of IgG. Some degree of dependence between serum IL-6 concentration and the level of EDSS were ascertained by Stelmasiak et al. (2000).

Interleukin-10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine. B cells producing IL-10 regulate autoimmune diseases, including MS (Hirotsu et al. 2010). There are some studies dealing with therapy of MS by interferons and glatiramer acetate (GA) and their effect on the production of some cytokines, including IL-10. The study by Pul et al. (2011) shows the effect of GA on CNS. Among other things, increased secretion of IL-10 after therapy by GA was found.

The small molecule of orosomucoid is able to transgress the blood–brain barrier (BBB). Its concentration increases in malignant CNS processes (Sladkova et al. 2011). The increased CSF levels can occur in some MS patients (50–60 %) after several years of disease duration (Adam et al. 2003). Decreased levels of orosomucoid in secondary progressive MS were found in the same study.

In the future, we intend to broaden the spectrum of available inflammatory markers including, e.g., IL-23 and also to include comparison with patients suffering from other inflammatory and infectious diseases of the nervous

system, such as meningitis, encephalitis and inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.

Conclusion

The levels of two studied inflammatory markers were found to be increased at the time of first clinical symptoms of MS. The increased levels of IL-8 were also confirmed in other studies. Thus, IL-8 seems to be an important chemokine in the inflammatory phase of MS. The second marker with elevated levels was beta-2-microglobulin, for which, however, other studies in MS patients have yielded inconsistent results. As the aetiology of MS is still unknown, research on inflammatory and neurodegenerative markers in MS should continue.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Adam P, Sobek O, Táborický L, Hildebrand T, Tutterová O, Záček P (2003) CSF and serum orosomucoid (alpha-1-acid glycoprotein) in patients with multiple sclerosis: a comparison among particular subgroups of MS patients. *Clin Chim Acta* 334(1–2): 107–110
- Bagnato F, Durastanti V, Finamore L, Volante G, Millefiorini E (2003) Beta-2 microglobulin and neopterin as markers of disease activity in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 24:S301–S304
- Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z (2005) The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. *Eur J Neurol* 12(1):49–54
- Bielekova B, Komori M, Xu Q, Reich DS, Wu T (2012) Cerebrospinal fluid IL-12p40, CXCL13 and IL-8 as a combinatorial biomarker of active intrathecal inflammation. *PLoS ONE* 7(11): e48370
- Bjerrum OW, Bach FW, Zeeberg I (1988) Increased level of cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin is related to neurologic impairment in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 78(1): 72–75
- Carrieri PB, Indaco A, Maiorino A, Buscaino GA, Ponticciello A, Liberti A, Perrella O (1992) Cerebrospinal fluid beta-2-microglobulin in multiple sclerosis and AIDS dementia complex. *Neurol Res* 14(3):282–283
- Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V (2001) Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol* 115(1–2):192–198
- Hirota M, Niino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Yabe I, Hamada S, Tajima Y, Sasaki H (2010) Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221(1–2):95–100
- Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J (2005) Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain* 128(Pt 5):988–1002
- Lund BT, Ashkian N, Ta HQ, Chakryan Y, Manoukian K, Groshen S, Gilmore W, Cheema GS, Stohl W, Burnett ME, Ko D, Kachuck NJ, Weiner LP (2004) Increased CXCL8 (IL-8) expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 155(1–2): 161–171
- Maimone D, Gregory S, Amason BG, Reder AT (1991) Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 32(1):67–74
- Martins TB, Rose JW, Jaskowski TD, Wilson AR, Husebye D, Seraj HS, Hill HR (2011) Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *Am J Clin Pathol* 136(5):696–704
- Mirowska-Guzel DM, Kurowska K, Skierski J, Koronkiewicz M, Wicha W, Kruszewska J, Czlonkowska A, Czlonkowska A (2006) High dose of intravenously given glucocorticosteroids decrease IL-8 production by monocytes in multiple sclerosis patients treated during relapse. *J Neuroimmunol* 176(1–2): 134–140 Epub 2006 May 24
- Modvig S, Degn M, Horwitz H, Cramer SP, Larsson HB, Wanscher B, Sellebjerg F, Frederiksen JL (2013) Relationship between cerebrospinal fluid biomarkers for inflammation, demyelination and neurodegeneration in acute optic neuritis. *PLoS One* 8(10):e77163. doi:10.1371/journal.pone.0077163
- Neuteboom RF, Verbraak E, Voerman JS, van Meurs M, Steegers EA, de Groot CJ, Laman JD, Hintzen RQ (2009) First trimester interleukin 8 levels are associated with postpartum relapse in multiple sclerosis. *Mult Scler* 15(11):1356–1358
- Pul R, Moharreggh-Khiabani D, Škuljec J, Skripuletz T, Garde N, Voss EV, Stangel M (2011) Glatiramer acetate modulates TNF- α and IL-10 secretion in microglia and promotes their phagocytic activity. *J Neuroimmune Pharmacol* 6(3):381–388
- Sladkova V, Mares J, Lubenova B, Zapletalova J, Stejskal D, Hlustik P, Kanovsky P (2011) 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* 33(4):415–420
- Stelmasiak Z, Koziol-Montewka M, Dobosz B, Rejdak K, Bartosik-Psujek H, Mitosek-Szewczyk K, Belniak-Legięć E (2000) Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Med Sci Monit* 6(6):1104–1108
- Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL (2006) IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligonucleotides dendritic cell IL-10 production. *J Immunol* 176(12):7768–7774
- Wen SR, Liu GJ, Feng RN, Gong FC, Zhong H, Duan SR, Bi S (2012) Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 244(1–2):94–96

11.2 Publikácia č. 2

Matejčíková Z, Mareš J, Sládková V, Svrčinová T, Skalská S, Zapletalová J, Kaňovský P. Cerebrospinal fluid and serum levels of interleukin-8 in patients with multiple sclerosis and its correlation with Q-albumin. Multiple Sclerosis and Related Disorders (2017). Ref.No.: MSARD-D-17-00014R1. IF₂₀₁₇1,150 Prijaté do tisku

Cerebrospinal fluid and serum levels of interleukin-8 in patients with multiple sclerosis and its correlation with Q-albumin

Abstract

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory-demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Autoimmune inflammation is common in the early stages of MS and is followed by neurodegenerative processes. The result of these changes is axon and myelin breakdown. The paraclinical examination methods are an important part of the diagnostic process. Magnetic resonance imaging of the brain and the cervical spinal cord and an examination of cerebrospinal fluid (CSF) are common paraclinical examinations. An increasing number of studies deal with CSF and serum levels of biomarkers and their role in MS. We hypothesized that the level of interleukin-8 (IL-8) could be different in MS patients than in controls. These differences may be related to damage of the blood-brain barrier (BBB). BBB damage is quantified by the quotient of albumin (Q-alb).

Methods: CSF and serum levels of IL-8 were assessed in 102 patients with newly diagnosed MS meeting McDonald's revised diagnostic criteria and in 102 subjects as a control group. We then correlated these results with Q-alb.

Results: Levels of IL-8 in CSF were significantly higher in MS patients than in controls (Mann-Whitney U test, $p < 0.0001$). Serum levels of IL-8 were significantly lower in MS patients than in controls (Mann-Whitney U test, $p = 0.018$). Spearman's correlation analysis proved a significant correlation between levels of IL-8 and Q-alb.

Conclusion: As the etiology of MS is only partially known, research dealing with biomarkers in MS should continue. Better knowledge of etiology can provide a new perspective, especially for treatment.

Keywords: interleukin-8, Q-albumin, blood-brain barrier, cerebrospinal fluid

Introduction

Multiple sclerosis is an autoimmune inflammatory-demyelinating disease of the central nervous system. Inflammatory processes appear especially in the early stages of MS. The stage of inflammation is followed by neurodegenerative processes. The disease is characterized by many inflammatory infiltrations, especially in the white matter, where various cells (T-lymphocytes, macrophages, fewer B-lymphocytes) are activated. T-lymphocytes are probably activated in the periphery. After activation, these specific lymphocytes proliferate into the final tissue and initiate inflammatory lesions by producing many pro-inflammatory cytokines. MS is probably triggered off by immune reaction at the myelin like figures in periphery. It is followed by the proliferation and activation of autoreactive T- lymphocytes (Kieseier et al., 2006). The result of the inflammation is damage of the myelin and oligodendrocytes in the lesion. The demyelinating fiber loses the ability to spread electric impulses correctly (Sladkova et al., 2011), and the cells of major histocompatibility complex I (MHC I) are also expressed. The fiber becomes visible for CD8 cytotoxic lymphocytes, which damage this fiber. Activated B-lymphocytes also penetrate through BBB, infiltrate perivascular spaces and produce antigen - specific antibodies (Hemmer et al., 2006).

The activation of the microglia, subsequent oxidative stress, and excitotoxicity cause neurodegeneration (Kieseier et al., 2006). The axon loss in white and gray matter correlates with cognitive deficit and also with permanent disability.

In general, relapses are the clinical equivalent of acute focal inflammation, and progression is caused by chronic neurodegeneration. An examination of the intrathecal synthesis of IgG antibodies is the standard diagnostic test in patients with suspected MS.

However, it is important to discover the more detailed mechanisms causing MS. One method for uncovering these mechanisms is the examination of CSF and the serum levels of some biomarkers.

The first aim of our study was to ascertain the levels of IL-8 in MS patients in comparison to controls. The second aim of our study was to find the connection between IL-8 levels and the destroyed BBB.

Methods

The study was approved by the Institutional Ethics Committee, and all patients signed an informed consent form agreeing to a lumbar puncture.

The first comparison of the study was based on CSF and serum examination in patients with MS and the control group (patients with non-inflammatory diseases of CNS, e.g. headache, vertigo, and back pain). The lumbar puncture was indicated and performed for diagnostic purposes in patients with suspected MS (during the first relapse of the disease, i.e. clinically isolated syndrome). None of our patients had been treated by corticosteroids before the lumbar puncture. The aim of the study was to assess CSF and serum levels of IL-8 and compare these levels between the group of MS patients and the control group. We tried to find inflammatory changes in the early stage of MS.

The purpose of the second comparison was to determine if there was a correlation between CSF levels of IL-8 and Q-alb. Q-alb compares the level of albumin in CSF and serum, i.e. $Q\text{-alb} = \frac{\text{albumin(CSF)}}{\text{albumin(serum)}}$. The quotient is dependent on the age (Table 1).

The lumbar puncture was provided by means of atraumatic needle under atraumatic conditions. About 10 ml of CSF was taken along with around 10 ml of blood from each participant. The protein CSF level and cell count were normal in all patients, without signs of neuroinflammation. There were no signs of any other inflammation or any other disease at the time of lumbar puncture in either groups.

Biomarker measurement

This study used the ELISA principle of measurement levels of IL-8 (solid-phase, enzyme-labeled, chemiluminescent sequential immunometric assay, IMMULITE®/IMMULITE® 1000 IL-8, Catalog Number LK8P1). Incubation Cycles: 1x30 minutes. Analytical sensitivity: 2pg/ml. Reference limits: CSF 0-62pg/ml, serum 0-62pg/ml.

Q- albumin is a dimensionless index. The levels of albumin in serum and CSF are determined by nephelometry. The quotient is subsequently determined by calculating.

Statistical analysis

The results were statistically processed. Software IBM SPSS Statistics 22 and SPSS software version 15 were used for data analysis.

Age was compared using the Mann-Whitney U test. Gender was processed by Chi-square test. The Mann-Whitney U test was also used to compare quantitative parameters (levels of IL-8). Spearman's correlation analysis and the Chi-square test were used for the correlation between IL-8 and Q-alb. Tests were made on the level of significance of 0.05.

Results

In the first comparison, we investigated a group of 204 patients. CSF and serum examinations were performed in 102 patients with newly diagnosed MS meeting McDonald's revised diagnostic criteria (70 females, 32 males; median age 37.5 years) and 102 control group patients (79 females, 23 males; median age 40 years). No statistically significant differences in demographic data between the patient and control groups were found. The demographic data are shown in Table 2.

Significantly higher CSF levels of IL-8 ($p < 0.0001$, Mann-Whitney U test) were found in the MS patient group. Statistically significant lower serum levels of IL-8 ($p = 0.018$, Mann-Whitney U test) were found in the MS patient group (Table 3, Figures 1 and 2). The serum and CSF levels of IL-8 were in normal range in control group.

In the second comparison, we investigated a group of 115 patients with newly diagnosed MS meeting McDonald's revised diagnostic criteria. We analyzed the same group of MS patients like in the first comparison, and we added 13 more MS patients, who had the same characteristics as 102 MS patients. Spearman's analysis showed a moderately strong correlation between IL-8 and Q-alb ($r = 0.414$, $p < 0.0001$). (Table 4, Figure 3).

Discussion

In the first comparison, we identified increased CSF levels of IL-8 and decreased serum levels of IL-8 in the MS patients in comparison to the controls. We identified a positive correlation between CSF levels of IL-8 and Q-alb in the second comparison. Q-alb is a dimensionless index expressing the degree of the damage of the BBB. Based on our results, we hypothesized that IL-8 could partially come from the periphery, and that IL-8 could penetrate through the damaged BBB. This may be the reason that IL-8 is increased in CSF and decreased in serum in patients with MS. On the other hand, there were general opinions that the IL-8 is produced *de novo* in the CNS. The results also support the presence of inflammatory processes in the early stages of MS.

IL-8 is an inflammatory chemokine. It attracts and activates neutrophils and a subpopulation of lymphocytes. It also has a strong angiogenic effect. IL-8 is produced by many cells, including monocytes, lymphocytes, granulocytes, fibroblasts, endothelial cells, and astrocytes. It is elevated in CSF in inflammatory processes of CNS (Bielekova et al., 2012). Another study of MS dealt with the relationship between levels of IL-8 and visual impairment after acute optic neuritis (Rossi et al., 2014, a). In this study, patients were followed for six months after acute optic neuritis. The results confirmed that higher levels of IL-8 correlated with functional visual outcomes: the higher levels correlated with incomplete recovery. The same group of authors performed another study of IL-8 (Rossi et al., 2014, b). They found that high central contents of IL-8 were associated with clinical progression in subjects with radiologically isolated syndrome, and also to the risk of conversion to MS in subjects with clinically isolated syndrome. According to Tomioka and Matsui (Tomioka et al., 2014) , levels of IL-8 can provide useful information for assessing ongoing immune reactions in the CNS.

There are many studies dealing with disease-modifying drugs and their effect on serum and CSF biomarkers in MS. One such study showed reduced serum levels of eight cytokines (TNF α , IFN γ , S100B, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, and IL-23) in MS patients treated with interferons and natalizumab in comparison to drug-naïve MS patients (O'Connell et al., 2014).

One very interesting study about IL-8 levels was not related to MS, but the results are noteworthy: they found that CSF levels of IL-8 are higher in patients with lupus erythematosus affecting CNS (Yoshio et al., 2016).

IL-8 is responsible for BBB disruption and the migration of immune cells to the CNS. According to one very interesting study on the effect of high-dose corticosteroids on levels of IL-8, the blood levels of IL-8 decrease after therapy (Mirowska-Guzel et al., 2006).

Another study confirms our results, with their authors finding a significant rise of CSF levels of IL-8 in MS during relapse (Bartosik-Psujek, Stelmasiak, 2005)

In contrast to our study, there is study by Lund et al. (2004) that demonstrate the serum IL-8 are significantly higher in untreated MS patients compared to controls and are significantly reduced in MS patients receiving interferon-beta1a therapy.

The association between IL-8 and disease activity has been explored in other research. Neuteboom et al. (2009) researched levels of IL-8 in MS patients during pregnancy. High serum levels of IL-8 during the first trimester were associated with a high risk of postpartum relapses. Another study compared levels of interleukins in two types of MS (opticospinal and conventional). Elevated levels of IL-8 were found in both groups. However, in opticospinal MS, the levels were significantly higher than in conventional MS. According to this study, elevated levels of IL-8 also correlate with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Ishizu et al., 2005). Based on these studies the role of IL-8 is still not clear. Almost all studies confirm that CSF levels of IL-8 is increased during the relapses and IL-8 is the important chemokine during the inflammatory processes in CNS. This result is also in correlation with our study. There is still not clear if the IL-8 is produced only in CNS in MS patients or if there is present also IL-8 production in the periphery. In some studies there are normal serum levels of IL-8 in MS, the other studies confirm increased serum levels of IL-8. In contrast, in our study we found out decreased serum levels of IL-8 in MS patients. It is important to determine if the increased levels of IL-8 in MS is related to impairment of the BBB.

The BBB is impaired in several diseases, including ischemia, multiple sclerosis, and Alzheimer's disease. The investigation of Q-alb is the most common and established method to evaluate the damage of the BBB. A study by Chalbot et al. (2010) did not find a significant difference in Q-alb between MS and age-matched healthy controls. An intact BBB is essential for maintaining the proper brain homeostasis (Choi, Kim, 2008). Only some substances transfer through the BBB. A disruption of the tight junction of the BBB and the dysregulation of transporters increase the permeability of the BBB. This process supports the development of many neurological diseases (Chalbot et al., 2010). Q-alb was also correlated with levels of vascular endothelial growth factor (Hamzaoui et al., 2009).

Actively demyelinating lesions showed massive increase in BBB permeability; in inactive or remyelinated lesions, BBB damage was either minimal or absent. Reduced Q-alb was observed in animals with actively demyelinating lesions; in animals with inactive lesions, the Q-alb was normal (Kitz et al., 1984). Many studies have dealt with various diseases and BBB impairment. A study by Hov dealt with delirium and BBB dysfunction (Hov et al., 2016). The majority of patients (88%), had intact BBB integrity. BBB dysfunction was found with brain tumors, Guillain-Barre syndrome, and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (Brettschneider et al., 2005). The same study found a significant correlation of Q-alb with

weight and body mass index (BMI). Based on this study, there is a hypothesis that BBB impairment could be related to inflammatory processes. On the other hand, some studies dealing with neurodegenerative diseases confirmed that BBB is also disrupted in progressive supranuclear palsy, multisystem atrophy (Jesse et al., 2010), and amyotrophic lateral sclerosis (Leonardi et al., 1984). The study by Uher et al. (2016) reports that increased Q-alb at clinical onset of MS was associated with enlargement of lateral ventricles and volume loss of the brain over 48 months. In the same study was also reported that higher Q-alb was associated with higher Expanded Disability Scale over 48 months. Based on the studies of Q-albumin is likely that BBB could be interrupted in the early stage of MS.

Based on the results of our study, we can not say that IL-8 has the major role in MS etiology because the difference in CSF levels is only 1.39 (that means 39% up) and in serum levels only 0.83 (that means 17% down) in MS patients in comparison to control group. Our results also show that the correlation between IL-8 and Q-alb is only 16%. Based on this results we also could say that IL-8 has not probably the primary role in MS.

On the other hand, there is a suggestion that cytokines, in general (not only IL-8), play really important role in inflammatory processes, including MS. This study was the pilot research. It is needed to find out the levels of other biomarkers and find the relationships between the markers, and also between the biomarkers and disability progression. In the extension study will be necessary the cooperation with immunologists.

There are many studies dealing with etiology of MS and the role of serum and CSF levels in MS etiology. Based on them, we can say that there are many factors that have an impact on the etiology of MS. Some of them are known, but many of them are still unknown.

Conclusion

The study of biomarkers in MS patients should contribute to understanding the etiology of MS. The change of the levels of biomarkers and BBB impairment in early stages of the disease seems to be partially beneficial for predicting the further course of MS.

References

Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z (2005) The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. *Eur J Neurol.* 12(1):49-54.

Bielekova B, Komori M, Xu Q, Reich DS, Wu T (2012) Cerebrospinal fluid IL-12p40, CXCL13 and IL-8 as a combinatorial biomarker of active intrathecal inflammation. *PLoS One.* 7(11):e48370.

Brettschneider J, Claus A, Kassubek J, Tumani H (2005). Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol.* 252(9):1067-73

O'Connell KE, Mok T, Sweeney B, Ryan AM, Dev KK (2014). The use of cytokine signature patterns: separating drug naïve, interferon and natalizumab-treated multiple sclerosis patients. *Autoimmunity.* 2014 Dec;47(8):505-11.

Chalbot S, Zetterberg H, Blennow K, Fladby T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2010). Cerebrospinal Fluid Secretory Ca²⁺-Dependent Phospholipase A2 activity: A Biomarker of Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Permeability. *Neurosci Lett.* 478(3): 179–183.

Choi YK, Kim KW (2008). Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep.* 41(5):345-52.

Hamzaoui K1, Ayed K, Hamza M, Hamzaoui A (2009). VEGF and mRNA VEGF expression in CSF from Behçet's disease with neurological involvement. *J Neuroimmunol.* 2009 Aug 18;213(1-2):148-53.

Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier BC, Hartung HP (2006) Immunopathogenesis and Immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(4):201-11.

Hov KR1, Berg JP, Frihagen F, Ræder J, Hall R, Wyller TB, Watne LO (2016). Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Integrity in Delirium Determined by Q-Albumin. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 41(3-4):192-198.

Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J (2005) Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain*. 128(Pt 5):988-1002.

Jesse S, Brettschneider J, Süßmuth S, Landwehrmeyer B, von Arnim Ch, Ludolph A, Tumani H, and Otto M (2010). Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases. *J Neurol*. 258(6): 1034–1041

Kieseier BC (2006) Assessing long-term effects of disease modifying drugs. *J Neurol*; 253:VI/23-VI/30.

Kitz K, Lassmann H, Karcher D, Lowenthal A (1984) Blood-brain barrier in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: a correlative study between cerebrospinal fluid protein concentrations and tracer leakage in the central nervous system. *Acta Neuropathol.*;63(1):41-50

Leonardi A, Abbruzzese G, Arata L, Cocito L, Vische M (1984) Cerebrospinal fluid (CSF) findings in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 231(2):75-8.

Lund BT, Ashikian N, Ta HQ, Chakryan Y, Manoukian K, Groshen S, Gilmore W, Cheema GS, Stohl W, Burnett ME, Ko D, Kachuck NJ, Weiner LP (2004) Increased CXCL8 (IL-8) expression in Multiple Sclerosis. *J Neuroimmunol*. 155(1-2):161-71.

Mirowska-Guzel DM, Kurowska K, Skierski J, Koronkiewicz M, Wicha W, Kruszewska J, Czlonkowski A, Czlonkowska A (2006) High dose of intravenously given glucocorticosteroids decrease IL-8 production by monocytes in multiple sclerosis patients treated during relapse. *J Neuroimmunol*. 176(1-2):134-40.

Neuteboom RF, Verbraak E, Voerman JS, van Meurs M, Steegers EA, de Groot CJ, Laman JD, Hintzen RQ (2009) First trimester interleukin 8 levels are associated with postpartum relapse in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 15(11):1356-8.

Rossi S, Motta C, Studer V, Rocchi C, Macchiarulo G, Barbieri F, Marfia G, Furlan R, Martino G, Mancino R, Centonze D (2014) Interleukin-8 is associated with acute and persistent dysfunction after optic neuritis. *Mult Scler*. 20(14):1841-50.

Rossi S, Motta C, Studer V, Macchiarulo G, Germani G, Finardi A, Furlan R, Martino G, Centonze D. Subclinical central inflammation is risk for RIS and CIS conversion to MS. *Mult Scler*. 21(11):1443-52.

Sladkova V, Mares J, Lubenova B, Zapletalova J, Stejskal D, Hlustik P, Kanovsky P (2011) 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.* 33(4):415-20.

Tomioka R, Matsui M (2014) Biomarkers for Multiple Sclerosis. *Inter Med* 53: 361-365

Uher T, Horakova D, Tyblova M, Zeman D, Krasulova E, Mrazova K, Seidl Z, Vaneckova M, Krasensky J, Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Havrdova E, Zivadinov R (2016) Increased albumin quotient (QAlb) in patients after first clinical event suggestive of multiple sclerosis is associated with development of brain atrophy and greater disability 48 months later. *Mult Scler.* 2016 May;22(6):770-81.

Yoshio T, Okamoto H, Kurasawa K, Dei Y, Hirohata S, Minota S (2016) IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 and G-CSF are significantly increased in cerebrospinal fluid but not in sera of patients with central neuropsychiatric lupus erythematosus. *Lupus.*

Tab.1 The normal range of Q-albumin depending on age (normative index)

Age	average	range
18-30	3.7	1.7-5.7
31-40	4.0	1.8-6.2
41-50	4.6	2.0-7.2
51-60	5.5	2.1-8.9

Tab. 2 Characteristic of patients

	Multiple sclerosis (n=102)	Control group (n=102)	p
Age median (min-max)	37.5 (16-59)	40 (18-74)	0,145
Females	70 (68.6%)	79 (77.5%)	0.156

Tab.3 Serum and CSF levels of interleukin-8

Levels	Multiple sclerosis Median (min-max)	Control group Median (min-max)	p
CSF IL-8 (pg/ml)	59.1 (5.0-188.0)	42.5 (22.8-166.0)	<0.0001
Serum IL-8 (pg/ml)	8.0 (0-43.8)	9.65 (0-58.2)	0.018

Tab.4 The correlation between levels of IL-8 and Q-alb

IL-8		Q- alb
	Correlation coefficient (r)	0.414
	p	<0.0001
	n	115

Figure 1 Box graph showing statistically significantly higher CSF levels of interleukin-8 in MS patients in comparison to control group

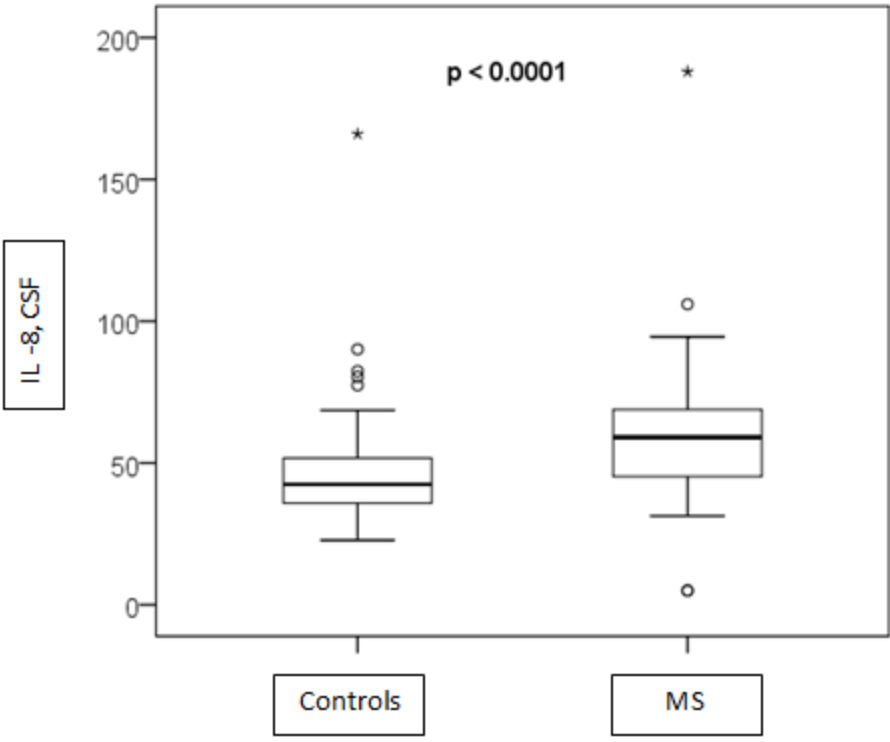


Figure 2 Box graph showing statistically significantly lower serum levels of interleukin-8 in MS patients in comparison to control group

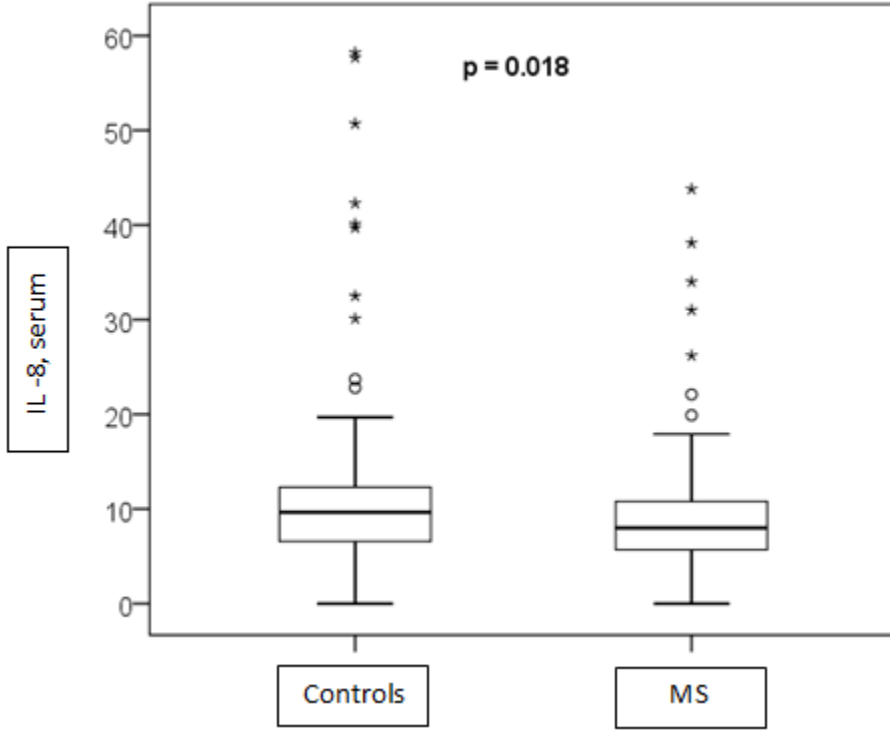
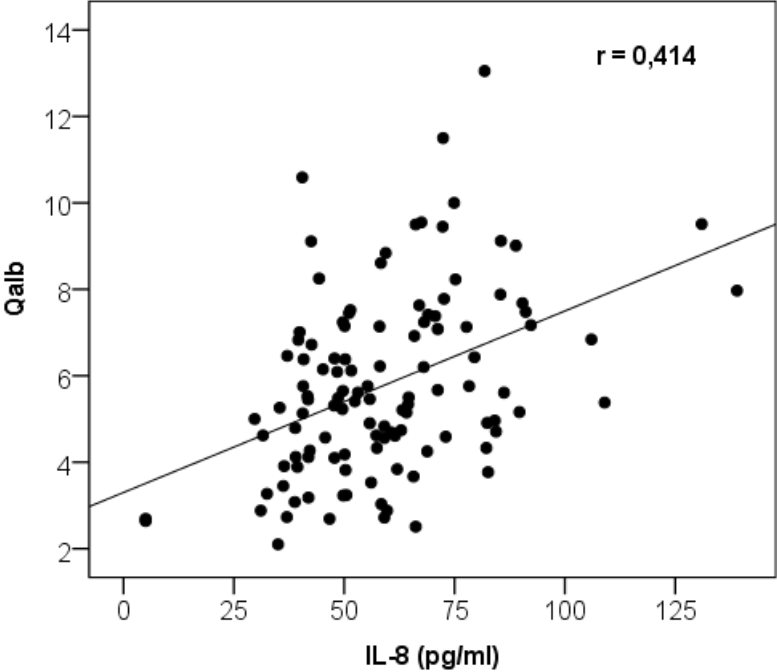


Figure 3 The graph showing the correlation between Q alb and IL-8



11.2.1 Email potvrdzujúci prijatie článku k publikácii

Your Submission

Doručené x



Multiple Sclerosis and Related Disorders <eesserver@eesmail.elsevier.com>

12.
3.

komu: mne

Ms. Ref. No.: MSARD-D-17-00014R1

Title: Cerebrospinal fluid and serum levels of interleukin-8 in patients with multiple sclerosis and its correlation with Q-albumin

Multiple Sclerosis and Related Disorders

Dear Miss Zuzana Matejckova,

We are pleased to inform you that your paper "Cerebrospinal fluid and serum levels of interleukin-8 in patients with multiple sclerosis and its correlation with Q-albumin" has been accepted for publication in Multiple Sclerosis and Related Disorders in the present form.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to Multiple Sclerosis and Related Disorders.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

To receive e-mail table of content alerts for Multiple Sclerosis and Related Disorders, register now by following the links at <http://www.sciencedirect.com/science/alerts>

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Yours sincerely,

Chris H Hawkes, MD FRCP
Managing Editor
Multiple Sclerosis and Related Disorders

Comments from the editors and reviewers:

Reviewer #1: Now OK

11.3 Publikácia č. 3

Matejčíková Z, Mareš J, Kaňovský P. T a B lymfocyty a ich úloha u roztrúsenej sklerózy (prehľadný článok). V redakčnom riadení Neurologie pro praxi

T a B lymfocyty a ich úloha u roztrúsenej sklerózy

Súhrn: Roztrúsená skleróza je autoimunitné zápalovo-demyelinizačné ochorenie centrálného nervového systému. Zápalové procesy sa uplatňujú hlavne v počiatočných štádiách roztrúsenej sklerózy. V neskorších štádiách prevažujú neurodegeneratívne procesy. Pre RS sú charakteristické zápalové infiltrácie (najmä v bielej hmote), v ktorých sa nachádzajú aktivované bunky, tj. T- lymfocyty, makrofágy a v menšej miere i B- lymfocyty. Autoreaktívne T a B lymfocyty majú v patogeneze roztrúsenej sklerózy rôzne funkcie a uplatňujú sa na demyelinizácii nervových buniek a poškodení axónov. Poznanie ich funkcie je dôležité pre pochopenie vzniku RS a následne pre rozvoj biologickej liečby. Okrem autoimunitných pochodov sa uplatňujú aj environmentálne faktory (geografické, životný štýl, infekcie).

Kľúčové slové: roztrúsená skleróza, T-lymfocyty, B- lymfocyty, autoimunitné procesy

Abstract: The multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory demyelinating disease of central nervous system. The inflammatory processes are present especially in early stages of MS. The neurodegenerative processes play role especially in later stages. There are characteristic inflammatory infiltrations (particularly in white matter) in MS. In these lesions are activating cells, ie. T-lymphocytes, macrophages and B- lymphocytes. Autoaggressive T and B lymphocytes have various functions in patogenesis of MS and play any role in the demyelination of nerve fibers and damage of axons. The knowledge of their function is important for understanding the MS and for development of the drugs modifying disease. In addition to autoimmune processes, the environmental factors (geographical, lifestyle, infections) have an important role in MS patogenesis.

The key words: multiple sclerosis, T lymphocytes, B lymphocytes, autoimmune processes

Úvod

Roztrúsená skleróza (RS) je autoimunitné zápalovo-demyelinizačné ochorenie centrálného nervového systému (CNS). Zápalové procesy sa uplatňujú hlavne v počiatočných štádiách roztrúsenej sklerózy. V neskorších štádiách prevažujú neurodegeneratívne procesy. Pre RS sú charakteristické zápalové infiltrácie (najmä v bielej hmote), v ktorých sa nachádzajú aktivované bunky, tj. T- lymfocyty, makrofágy a v menšej miere i B- lymfocyty. K aktivácii

T-lymfocytov dochádza pravdepodobne na periférii (a to v hlbokých krčných uzlinách). Po aktivácii týchto autoreaktívnych T-lymfocytov (napr. i banálnou infekciou) dochádza k ich proliferácii a prestupu do cieľového tkaniva (tj. v prípade RS do CNS), kde spúšťajú zápalové procesy, vrátane produkcie prozápalových cytokínov (Kiesseir 2006). Výsledkom týchto zápalových procesov je poškodenie myelínu a oligodendrocytov v lézii. Takto demyelinizované vlákno stráca schopnosť viesť elektrické impulzy správne (Sladkova et al. 2011) a exprimujú sa na ňom bunky hlavného histokompatibilného komplexu (MHC I). Vlákno sa zároveň stáva viditeľné pre CD 8 cytotoxické lymfocyty, ktoré ďalej poškodzujú nervové vlákno. Taktiež aktivované B-lymfocyty prestupujú cez hematoencefalickú bariéru, infiltrujú perivaskulárne priestory a produkujú antigen-špecifické protilátky (Hemmer et al. 2005).

Štúdie na dvojčatách ukázali, že genetická vnímavosť je výrazne ovplyvnená environmentálnymi vplyvmi (Baker et al. 2017). Dôležitými ovplyvňujúcimi faktormi sú geografické vplyvy (expozícia slnečného žiarenia a vplyv vitamínu D), vplyvy životného štýlu (diétne opatrenia, fajčenie) a dôležitý je aj vplyv infekcií. Všeobecne, pacienti s RS majú sérovú pozitivitu vírusu Epstein-Barrovej (EBV) (Giovannoni a Ebers 2007).

Úloha T lymfocytov u RS

To, že u RS hrajú T lymfocyty dôležitú úlohu, je známe už dlho. Základná hypotéza sa opiera o existenciu autoreaktívneho T-lymfocytu, ktorý má receptory pre antigény CNS. Ku styku autoagresívnych T lymfocytov s antigénmi CNS dochádza v hlbokých krčných uzlinách. Predpokladané antigény sú súčasťou myelínu, tj. bázický proteín myelínu (MBP), proteolipid protein (PLP), s myelínom asociovaný glykoproteín (MOG). Autoreaktívny T lymfocyt pretrváva v lymfatickom systéme na periférii v inaktivovanom stave. Po aktivácii napr. banálnou infekciou autoreaktívny T-lymfocyt prestupuje cez hematoencefalickú bariéru a putuje k cieľovému ložisku. V mozgu reaguje na cieľový antigen, aktivuje mikroglie a spúšťa prozápalové procesy. Následne dochádza k deštrukcii myelínu v CNS. Takto demyelinizované nervové vlákno stráca schopnosť vedenia elektrického impulzu. Na demyelinizovanom vlákne sa exprimujú molekuly hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) I. triedy. Vlákno sa stáva viditeľné pre cytotoxické T lymfocyty triedy CD8, ktoré ďalej poškodzujú vlákno vyplavovaním perforínov. Perforíny rozširujú póry bunkovej membrány a tým dochádza k prieniku extracelulárnej tekutiny do bunky. Výsledkom týchto procesov je vysoká energetická náročnosť prenosu informácií vláknom (Bednařík et al. 2010).

Okrem CD8 T lymfocytov sú v aktívnych léziách prítomné aj pomocné indukčné CD4 T lymfocyty (Havrdová et al. 2013).

Počas niekoľkoročných štúdií boli diferencované subtypy T lymfocytov, pričom lymfocyt Th0 má potenciál sa rozvíjať do akéhokoľvek subtypu. Boli diferencované subtypy Th1 a Th2, ktoré majú protichodné regulačné účinky. Th1 produkuje ako kľúčový cytokín interferon gama s cytotoxickou funkciou pri virových alebo bakteriálnych infekciách. Th2 produkuje napr. interleukíny 4 a 5. Zodpovedá za reguláciu B lymfocytov a produkciu protilátok. U RS dochádza k akumulácii Th1 lymfocytov a aktivovaných makrofágov v léziách v CNS (Havrdová et al. 2013).

V súčasnej dobe sú hojné dôkazy o tom, že RS je najmä CD4 Th1/Th17 sprostredkovaná choroba. Toto tvrdenie je založené najmä na výsledkoch zo štúdie experimentálnej autoimunitnej encefalomyelitidy (EAE) na zvieratách (myšiach, potkanoch, opiciach). EAE je navodená subkutánnou imunizáciou aktivovanými neuroantigénmi (myelín špecifický CD4 Th1) alebo blastickými bunkami Th17. Tieto autoreaktívne CD4 T lymfocyty sú dostačujúce k vyvolaniu zápalovej demyelinizačnej choroby podobnej RS (Martin et al. 2016)

Dôležitými lymfocytmi v patogenéze RS sú vyššie zmienené lymfocyty Th 17, ktoré boli nájdené v aktívnych léziách u pacientov s RS. Pre vyzrievanie lymfocytov do tohoto subtypu je nutná prítomnosť prozápalových a regulačných cytokínov, napr. IL-6, IL-17, IL-21, IL-23 atď. Aktivita lymfocytu Th17 je regulovaná ďalším subtypom T- lymfocytov, tzv. Treg lymfocytom. V léziách RS sa však tieto T reg lymfocyty nevyskytujú. (Havrdová et al. 2013)

Postupne pribúda stále viac štúdií zaoberajúcich sa úlohou melatonínu u RS a s tým súvisiacia ďalšia úloha T lymfocytov. Koža je hlavným orgánom, ktorý je citlivý na expozíciu slnečného žiarenia. Hladina melatonínu je závislá na expozícii svetla. Skúma sa súvislosť medzi expozíciou svetlom a rizikom rozvoja RS. V koži u predisponovaných jedincov cytokíny priťahujú pamäťové s antigénom asociované T- lymfocyty (tzv. CLA+ T lymfocyty), ktoré sa potom podieľajú na udržiavaní lokálneho zápalu. Po odoznení tohoto zápalu však CLA+ lymfocyty pretrvávajú v cirkulácii a niektoré z nich môžu prestupovať cez hematoencefalickú bariéru do mozgu a spustiť tým zápalovú odpoveď v CNS. Prostriedkom na skúmanie súvislosti medzi zápalovým ložiskom na koži a rozvojom RS je skúmanie sérových hladín chemokínu CCL27. CCL27 je uvoľňovaný aktivovanými keratinocytmi a je zvýšený u zápalových postihnutí kože (Blatt a kol. 2017). Práca, ktorá dokladuje zvýšené hladiny tohoto chemokínu u pacientov s RS, bola publikovaná v januári 2017 Nataliyou L.

Blatt a kol. Táto skupina autorov predpokladá tiež, že vyššie hladiny CCL27 u MS súvisia so sezónnymi zmenami slnečného žiarenia a jeho vplyvu na kožu.

Úloha B lymfocytov u RS

V minulosti bola úloha B lymfocytov v patogenéze autoimunitných chorôb, vrátane roztrúsenej sklerózy, považovaná za minoritnú. Až relatívne nedávno bola, okrem úlohy T lymfocytov, v imunopatogenéze RS zistená aj významná úloha B lymfocytov. B lymfocytárna odpoveď je regulovaná T lymfocytmi. Predpokladá sa, že u autoimunitných chorôb dochádza k nesprávnej kontrole dozrievania B lymfocytov už v germinálnych centrách, a tým je poskytnutý priestor pre vznik autoreaktívnych B lymfocytov. Ďalej je možné, že pri dozrievaní B lymfocytov kooperácia medzi receptormi imunitného systému, ako sú toll-like receptory (TLR), a receptormi B- lymfocytov umožňuje B- lymfocytom dosiahnuť aktivačný prah a prekročiť tak toleranciu imunity (Zouali a Tsay, 2016).

B lymfocyty u RS sú lokalizované vo viacerých subkompartmentoch CNS, t.j. v mozgomiechovom moku, v parenchýme a meningách (Michel et al. 2015). U RS dochádza lokálne k diferenciacii B lymfocytov. Tieto B lymfocyty u RS exprimujú v mozgomiechovom moku a v mozgových léziách predovšetkým antigen CD 20 (Havrdová a kol. 2013). B lymfocyty sa nachádzajú v aktívnych infiltrátoch u skorého štádia RS. Sú lokalizované jednak perivaskulárne a jednak v okolitom parenchýme. Akumulácia B lymfocytov na leptomeningách je typická pre progresívne formy RS (Wekerle 2017). Štúdie zaoberajúce sa cytológiou likvoru zistili, že vzťah medzi počtom B lymfocytov a ostatnými bunkami v likvore môže byť spojený so závažnosťou RS a progresiou choroby. Najmä, že vyšší počet B lymfocytov (prevaha B lymfocytov v likvore) je spojený s rýchlejšou progresiou choroby, zatiaľ čo nižší počet B lymfocytov (prevaha monocytov v likvore) je spojená s pomalšou progresiou choroby (Cepok et al. 2001)

Stále však ostáva otázka, aká je presná úloha B lymfocytov u RS. Na patogenéze RS sa môžu podieľať produkciou protilátok, transportom autoantigénov z tkaniva k sekundárnym orgánom imunitného systému, ďalej prezentáciou autoantigénov T lymfocytom a sekréciou cytokínov (Krumbholz a kol. 2012). B lymfocyty sú obzvlášť efektívne v prezentácii antigénov T lymfocytom. T lymfocytom prezentujú antigény, ktoré sú najskôr rozpoznané B cell receptorom (BCR). B lymfocyty ďalej regulujú lokálnu zápalovú odpoveď T lymfocytov aj myeloidných buniek, a to sekréciou prozápalových aj protizápalových cytokínov (Michel et al. 2015).

Ďalším zaujímavým faktom je, že komplementový C2 receptor exprimovaný CD 27 B lymfocytmi je tiež koreceptorom u EBV, kde sa uplatňuje pri infikovaní B buniek (Ascherio a Munger 2015). Väčšina buniek v MS léziách sú CD 27 antigen pozitívne, a tým sa teda aj vysvetľuje súvislosť a úloha EBV infekcie u RS (Serafini et al. 2010).

Záver

Je dôležité, aby prebiehali výskumy zamerané na zistenie čo najpodrobnejšej imunopatogenézy RS. Na základe niektorých faktorov by bolo možné v budúcnosti predikovať priebeh tohto závažného ochorenia. A neposlednej rade je to dôležité pre rozvoj možností liečby. Autoreaktívne T aj B lymfocyty a ostatné zložky autoimunitných pochodov sú terčom biologickej liečby RS, či už súčasnej alebo výskumnej.

Dedikace: podporován grantovým projektem IGA_LF_2017_020

Referencie

Ascherio A, Munger KL, 2015. EBV and autoimmunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390, 365–385

Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K (2017) Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis. *EBioMedicine* 16 (2017) 41–50

Bednařík J, Ambler Z, Růžička E et al. (2010). *Klinická neurologie. Část speciální I.* Vydalo nakladatelství Triton. Str. 510-512

Blatt N, , Khaiboullin T, Lombardi V, Rizvanov A and Khaiboullina S (2017). The Skin–Brain Connection Hypothesis, Bringing Together CCL27-Mediated T-Cell Activation in the Skin and Neural Cell Damage in the Adult Brain. *Front. Immunol.* 7:683. doi: 10.3389/fimmu.2016.00683

Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Bøddeker I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* (2001) 124(Pt 11):2169–76. doi:10.1093/ brain/124.11.2169

Giovannoni G, Ebers G, 2007. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 261–268.

Havrdová E a kolektiv. (2013) *Roztroušená skleróza.* Str. 48-51. Vydalo nakladatelství Mladá fronta

Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier BC, Hartung HP (2006) Immunopathogenesis and Immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(4):201-11.

Kieseier BC (2006) Assessing long-term effects of disease modifying drugs. *J Neurol;* 253:VI/23-VI/30.

Krumbholz M¹, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E.(2012) B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2012 Nov 5;8(11):613-23. doi: 10.1038/nrneurol.2012.203

Martin R, Sopedra M, Rosito M, Engelhardt B (2016). Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *Eur. J. Immunol.* 2016. 46, 2078–2090.

Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A (2015). B cells in the multiple sclerosis central nervous system: trafficking and contribution to CNS-compartmentalized inflammation. *Front. Immunol.* 2015. 6, 636.

Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, , Rosicarelli B, Veroni C, Chiappetta G, Magliozzi R, Reynolds R, Coccia EM, Aloisi F (2010). Epstein-Barr virus latent infection

and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 677–693.

Sladkova V, Mares J, Lubenova B, Zapletalova J, Stejskal D, Hlustik P, Kanovsky P (2011) 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.* 33(4):415-20.

Wekerle H (2017). B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, 50:1, 57-60, DOI: 10.1080/08916934.2017.1281914

Zouali M and Tsay G (2016). Developing Connections among B Lymphocytes and Deregulated Pathways in Autoimmunity. *Molecular Medicine*: 705-712. 2016