

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Lymfocytární subpopulace, cytokinová produkce
a transplantace kmenových buněk
u pacientů s roztroušenou sklerózou**

**Lymphocyte subpopulations, cytokine production and stem
cells transplantation in multiple sclerosis patients**

MUDr. Eva Krasulová

2012

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.

Školící pracoviště: Neurologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Školitel: prof. MUDr. Eva Havrdová, CSc.

Konzultant: as. MUDr. Helena Marečková, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
1. ÚVOD.....	6
1.1. Etiologie roztroušené sklerózy a imunitní systém	6
1.2. Roztroušená skleróza a klinicky izolovaný syndrom – definice relapsu a progrese, diagnostická kritéria.....	8
1.3. Průběh a prognóza onemocnění	9
1.4. Léčba RS – interferon beta, natalizumab, ASCT.....	9
1.5. Interferon beta (IFN- β).....	10
1.6. Natalizumab.....	10
1.7. Vysokodávkovaná imunoablace s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk	10
1.8. Neuromyelitis optica	11
1.9. Allogenní transplantace kmenových buněk u autoimunitních onemocnění	12
2. CÍLE PRÁCE	12
3. PACIENTI A METODY.....	13
3.1. Pacienti zařazení do imunologického sledování – 1. část práce	13
3.2. Pacienti s roztroušenou sklerózou léčení vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT) - desetileté sledování (2. část práce).....	14
3.3. Allogenní transplantace kmenových buněk v léčbě autoimunitních onemocnění – kazuistika RS a NMO	15
3.4. Metody vyšetření lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů	15
3.5. Statistická analýza	16
4. VÝSLEDKY	16
4.1. Výsledky retrospektivního sledování skupiny pacientů léčených vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT) v letech 1998-2008.....	16
4.2. Prospektivní sledování vývoje lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů v periferní krvi	18
4.3. Výsledky statistického zpracování lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů souhrnně u vybraných tří skupin pacientů ve vztahu ke klinické aktivitě onemocnění	19
4.4. Hodnocení léčby allogenní transplantací kmenových buněk u dvou pacientek s autoimunitním onemocněním CNS (efektivita a bezpečnost).....	19
5. DISKUZE	20
6. ZÁVĚR.....	24
7. LITERATURA	25

ABSTRAKT

Roztroušená skleróza (RS) představuje demyelinizační onemocnění centrálního nervového systému se známou autoimunitní etiologií. V současné době máme k dispozici diagnostická kritéria, která umožňují stanovení diagnózy již po první atace klinických příznaků. Zároveň je využívána řada léků, kterými můžeme redukovat aktivitu onemocnění a oddálit stádium nevratné invalidity. Prognózu individuálního pacienta a adekvátní léčbu však zatím určujeme jen nedokonale na základě klinické zkušenosti a magnetické rezonance mozku. Přesnější prognostické ukazatele u RS chybí.

Cíle práce: 1. Vytipovat vhodný prognostický imunologický parametr periferní krve u pacientů s RS v různém stádiu onemocnění a léčby; 2. Popsat skupinu pacientů léčených autologní transplantací kmenových buněk (ASCT) nebo allogenní transplantací kmenových buněk (alloSCT) ve vztahu k efektu, nežádoucím účinkům a vhodným indikačním kritériím k této léčbě.

Pacienti a metody: V první části studie bylo zahrnuto 33 pacientů s klinicky izolovaným syndromem, 17 pacientů s RS léčených natalizumabem a 14 pacientů s agresivní RS léčených ASCT. U pacientů byl hodnocen neurologický náález pomocí standardní škály EDSS (Expanded Disability Status Scale) a přítomnost relapsů před zahájením vybrané léčby a ve 3., 6., 12. a 24. měsíci od zahájení léčby. Ve stejných intervalech byl proveden odběr periferní krve a pomocí průtokové cytometrie stanoveno zastoupení základních lymfocytárních subpopulací a hladiny intracelulárních cytokinů. Ke statistickému zpracování bylo využito t-testu, ANOVA a regresní analýzy. Ve druhé části byla zpracována klinická data (EDSS, počet relapsů, dlouhodobá léčba RS, nežádoucí účinky) 26 pacientů léčených ASCT na našem pracovišti v letech 1998-2008. Zároveň byly popsány dvě kazuistiky pacientek léčených alloSCT (u RS a dalšího demyelinizačního onemocnění CNS – neuromyelitis optica (NMO)). Statistické zpracování zahrnovalo Kaplan-Meierovu křivku se zjištěním progression free survival (PFS) a porovnání PFS vytípaných skupin pacientů pomocí Coxova F testu.

Výsledky: Graficky byl zpracován paralelně v absolutních (abs) i procentuálních (%) hodnotách vývoj jednotlivých lymfocytárních subpopulací v průběhu dvouletého sledování u všech tří skupin pacientů. V rámci souhrnné analýzy byl nalezen statisticky významný rozdíl ve vstupní hodnotě CD19+abs B-lymfocytů u pacientů bez progresse versus s progresí ($p=0,01$), hodnocené vývojem EDSS ve 24. měsíci sledování. Absolutní hodnota 0,2 CD19+lymfocytů před léčbou odlišila pacienty bez progresse oproti pacientům s progresí se sensitivitou 81% a specificitou 46%. Prediktivní potenciál byl statisticky významnější využitím kombinace vstupní hodnoty absCD19+ lymfocytů s CD3+% lymfocyty ve 3. měsíci od zahájení terapie ($p<0,001$).

V rámci druhé části práce bylo dosaženo intervalu bez progresse (PFS) u celé skupiny pacientů léčených ASCT 70,8% po třiletém a 29,2% po šestiletém

sledování. PFS v rámci tříletého sledování u pacientů s relaps-remitentní RS byl 84,4% ve srovnání s 60% u pacientů se sekundárně-progresivní RS ($p=0,00002$). PFS po třech letech ve skupině pacientů s délkou trvání RS < 5 let činil 82,3% ve srovnání s 61,8% ve skupině pacientů s délkou trvání RS ≥ 5 let ($p=0,00217$). Statistické významnosti dosáhl rovněž rozdíl mezi křivkami PFS u pacientů s věkem pod 35 let oproti starším pacientům ($p=0,01118$). Léčba ASCT v našem souboru byla relativně bezpečná, mortalita spojená s výkonem byla 0%. Dobře tolerovanou a účinnou se ukázala být také léčba alloSCT u dvou pacientek s demyelinizačním onemocněním CNS.

Závěr: V rámci práce byl nalezen možný prediktivní faktor progresu invalidity u RS - absolutní hodnota CD19+ B-lymfocytů periferní krve. Práce ukázala na vhodnost dalšího výzkumu základních imunologických parametrů periferní krve ve vztahu k predikci RS. V práci byla dále definována vhodná indikační kritéria pro léčbu ASCT, která byla vyhodnocena jako relativně bezpečná. Léčba alloSCT ukázala možný potenciál k ovlivnění autoimunitních onemocnění CNS včetně prognosticky nepříznivé NMO. Také tato metoda léčby byla u dvou referovaných pacientek dobře tolerována.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) represents a demyelinating disease of the central nervous system with known autoimmune etiology. Currently new diagnostic criteria are used allowing us to diagnose MS early after first relapse of clinical symptoms. Several drugs are available to reduce disease activity and postpone later MS stages with irreversible disability. Prognosis of an individual patient and accurate treatment is however defined only imperfectly based on our clinical experience and brain magnetic resonance imaging. Specific prognostic markers are missing.

Aims: 1. To identify suitable prognostic immunological marker from peripheral blood of MS patients in different disease stages and under different treatment regimens; 2. To describe group of MS patients treated with autologous stem cells transplantation (ASCT) or allogeneic stem cells transplantation (alloSCT) with respect to efficacy, adverse events and accurate patient selection.

Patients and methods: In the first part of the study we involved 33 patients with clinically isolated syndrome, 17 MS patients treated with natalizumab and 14 patients with aggressive MS treated with ASCT. Disability measured by Expanded Disability Status Scale (EDSS) as well as relapse rate were evaluated before treatment (baseline) and after 3, 6, 12 and 24 months after treatment initiation. In the same time-points peripheral blood was drawn and basic lymphocyte subpopulations and intracellular cytokines were examined using flow cytometry. T-test, ANOVA and multiple regression analysis were used for statistical analysis. In the second part of the study we collected clinical data (EDSS, relapse-rate, long-

term MS treatment, adverse events) of 26 MS patients treated with ASCT (during period 1998-2008). We described two case-reports of alloSCT treatment as well (in MS and other demyelinating CNS disorder – neuromyelitis optica (NMO)). For statistical analysis Kaplan-Meier curve with progression free survival (PFS) calculation was used together with comparison of PFS of selected patient subgroups using Cox F test.

Results: Two-year follow-up of peripheral blood lymphocyte subpopulations in all three groups of patients (percentage (%) and absolute (abs) values) was described. Inter-group analysis showed significant difference in CD19+abs lymphocyte count at baseline between progressors and non-progressors measured by EDSS at month 24 ($p=0.01$). Threshold of 0.2 in CD19+abs lymphocyte count at baseline distinguished progressors and non-progressors with sensitivity 81% and specificity 46%. Predictive potential was statistically even more significant combining baseline CD19+abs lymphocytes and CD3+% lymphocytes at month 3 ($p<0.001$). In the second part, at 3 and 6 years of follow-up 70.8% and 29.2% of patients treated with ASCT respectively were free of progression. Within three-year follow-up PFS was 84.4% in relapsing-remitting patients and 60% in secondary-progressive patients ($p=0.00002$). In the group of patients with MS duration < 5 years PFS achieved 82.3% in comparison with 61.8% in patients with MS duration ≥ 5 years ($p=0.00217$). There was also statistically significant difference between PFS in patients under age of 35 and older patients ($p=0.01118$). Treatment related mortality was 0% and ASCT procedure was relatively safe. Also alloSCT treatment was well-tolerated and effective in both patients with demyelinating CNS disorder.

Conclusion: Possible predictive marker of disability progression in MS was found in this study – absolute CD19+ B-lymphocyte count in peripheral blood. This work has shown that further research of basic immunological markers in peripheral blood is advisable in connection to MS prediction. In this work selection criteria for ASCT treatment were defined and treatment was evaluated as relatively safe. AlloSCT treatment showed possible efficacy in autoimmune diseases of the CNS including NMO with known poor prognosis. In our two patients even this treatment was well-tolerated.

1. ÚVOD

1.1. Etiologie roztroušené sklerózy a imunitní systém

Roztroušená skleróza (RS) s prevalencí kolem 170/100 000 obyvatel představuje v České republice nejčastější autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému (CNS) (Havrdova 2001; Vachová 2010). Etiologie onemocnění je multifaktoriální s podílem vnitřních (genetických) faktorů i faktorů zevního

prostředí. Všechny dosud známé rizikové faktory pro rozvoj RS mají v souladu s autoimunitní podstatou onemocnění jednoznačný vztah k imunitnímu systému. Dysimunitní podstatu RS potvrzuje také charakter ložisek v CNS s přítomností perivaskulárních lymfocytárních infiltrátů a průkazem četných buněk přirozené i specifické imunity a jejich zánětlivých působků. V neposlední řadě pak imunopatogenezi onemocnění potvrzuje také účinnost imunomodulačních a imunosupresivních léčebných postupů, které jsou v současné době v léčbě RS využívány (Abbas a Lichtman 2005).

V patogenezi RS dochází k uplatnění většiny buněčných a humorálních mechanismů přirozené i specifické imunity. Ústřední role je stále přisuzována T-lymfocytům. Aktivované T-lymfocyty nesoucí povrchový znak CD4 produkují prozánětlivé cytokiny interleukin-2 (IL-2), interferon gamma (IFN- γ) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) (Voskuhl, Martin et al. 1993), které stimulují expresi adhezivních molekul na endoteliálních buňkách hematoencefalické bariéry. Tím je umožněn transendoteliální přestup autoagresivních lymfocytů do CNS - tzv. homing do místa výskytu příslušného autoantigenu (Hickey 1991). Cytotoxické T-lymfocyty, které exprimují na svém povrchu molekulu CD8, jsou schopny pomocí serinových proteáz a perforinů přímo poškodit nervová vlákna (Medana, Martinic et al. 2001).

Kromě T-lymfocytů je v lézích CNS u RS známa přítomnost také plazmatických buněk a B-lymfocytů (Baranzini, Jeong et al. 1999). Základními markery B-lymfocytů jsou molekuly CD19 a CD20. Ve srovnání s nezánnětlivými chorobami CNS je u RS nalézán zvýšený počet B-lymfocytů a plazmatických buněk v mozkomíšním moku (Cepok, Jacobsen et al. 2001). Naproti tomu byl pozorován nižší počet B-lymfocytů v periferní krvi ve srovnání se zdravými kontrolami, což lze teoreticky vysvětlit přesunem těchto buněk do kompartmentu CNS u RS (Kreuzfelder, Shen et al. 1992). Zároveň bylo poukázáno na roli specifické humorální imunity v udržování procesů v chronické fázi RS, kdy dochází spíše ke kompartmentalizaci zánětu do tkání CNS za hematoencefalickou bariéru. Pro to svědčí nález aberantní lymfoidní tkáně – ektopických folikulů na meningách pacientů s RS (Magliozzi, Howell et al. 2007).

Přirození zabíječi (natural killers, NK-buňky) exprimující povrchové molekuly CD16 a CD56 jsou buňky řazené k přirozené imunitě organismu. U pacientů s RS byl popsán snížený počet a dysfunkce NK-buněk v periferní krvi oproti zdravým kontrolám (De Jager, Rossin et al. 2008). NK-buňky navíc expandují v periferní krvi během účinné imunosupresivní a imunomodulační terapie a jejich počet koreloval s potlačením zánětu u RS na magnetické rezonanci MR) (Bielekova, Catalfamo et al. 2006).

Imunitní buňky mají různou schopnost sekrece solubilních proteinů nebo glykoproteinů, tzv. cytokinů, které jsou nástrojem chemické komunikace mezi buňkami přirozené a specifické imunity v oblasti humorální i buněčné. Pro potřeby

této práce byly vybrány cytokiny s nejjednoznačnějším vztahem k autoimunitnímu procesu: interferon gamma (IFN- γ), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) a interleukiny 2, 4, 10 a 12 (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12).

Přítomnost IFN- γ byla prokázána v ložiscích RS v CNS i v periferní krvi (Traugott a Lebon 1988). Pokles počtu T-lymfocytů produkujících IFN- γ a IL-4 předcházela aktivitě RS na MR, což lze vysvětlit možným přesunem těchto buněk do kompartmentu CNS při zánětlivé aktivitě onemocnění (Giovannoni, Silver et al. 2000). U aktivní, relabující RS byly popsány zvýšené hladiny IFN- γ v periferní krvi (Frisullo, Nociti et al. 2008).

Také TNF- α byl prokázán v lézích RS, navíc se schopností přímé destrukce myelinu (Selmaj, Raine et al. 1991). V periferní krvi byla popsána korelace mezi vstupním počtem CD4+ lymfocytů produkujících TNF- α a vývojem ložiskového postižení v T2-váženém obraze na MR v průběhu tříletého sledování (Killestein, Kalkers et al. 2001).

Alelická varianta alfa řetězce receptoru pro IL-2 (IL2RA) je spojena s vyšším relativním rizikem rozvoje RS dle genetických studií (Weber, Fontaine et al. 2008). Opakovaně byla popsána významná korelace mezi koncentrací IL-2 a jeho receptoru v séru a aktivitou onemocnění (Adachi, Kumamoto et al. 1990; Sharief a Thompson 1993).

Statisticky významný pokles IL-4 v periferní krvi koreloval s výskytem aktivních lézí na MR stejně jako hladina IFN- γ , což lze obecně přisoudit účasti obou cytokinů na zánětlivém procesu za hematoencefalickou bariérou (Franciotta, Zardini et al. 2000).

V sekundárně progresivní fázi RS byla nalezena statisticky významná korelace mezi vysokou koncentrací IL-10 v periferní krvi a nízkým stupněm invalidity a nízkým počtem lézí v T2-váženém obraze na MR (Petereit, Pukrop et al. 2003).

Zvýšená hladina IL-12 v periferní krvi u pacientů s RS byla pozorována ve spojení s akutní exacerbací onemocnění (Clerici, Saresella et al. 2001) i s progresivní fází onemocnění (Filion, Matusevicius et al. 2003).

1.2. Roztroušená skleróza a klinicky izolovaný syndrom – definice relapsu a progresu, diagnostická kritéria

Relaps (ataka) onemocnění je definován jako výskyt nových/znovu se objevivších neurologických příznaků nebo zhoršení stávajících příznaků, které trvá konstantně ≥ 24 hodin, a není vysvětlitelné zvýšením tělesné teploty. Příznaky, které se objeví do 30 dnů od počátku ataky jsou hodnoceny jako jedna ataka (Compston 2006). Příznaky RS zahrnují poruchy zraku, hybnosti, citlivosti, poruchy rovnováhy, dysartrii, dysfagii, sfinkterové dysfunkce, poruchy nálady a kognice (Havrdova 2001).

Progrese onemocnění je definována většinou autorů jako trvalé zhoršení neurologických příznaků trvajících ≥ 6 měsíců (Schumacker, Beebe et al. 1965; Poser, Paty et al. 1983; Confavreux, Compston et al. 1992).

Standardní škálu k hodnocení neurologického nálezu u pacienta s RS představuje Kurtzkeho škála Expanded Disability Status Scale, EDSS, v rozsahu 0-10 bodů (Kurtzke 1983). Hodnocení je funkční systém zrakový, kmenový, motorický, cerebelární, sensorický, sfinktery a cerebrální (nálada, kognice).

1.3. Průběh a prognóza onemocnění

U zhruba 85% pacientů se klinicky RS v první fázi projeví výskytem akutních relapsů následovaných různě dlouhým obdobím remise. Jedná se o relaps-remitentní formu RS (RR-RS). První relaps suspektní z rozvoje RS dle klinických příznaků a nálezů na paraklinických metodách je pak označován jako klinicky izolovaný syndrom (CIS). U přirozeného, léčbou neovlivněného průběhu RS byl popsán přechod RR-RS do následující fáze tzv. sekundárně progresivní RS (SP-RS) nejčastěji v horizontu 10-20 let od počátku onemocnění (Compston 2006). Klinicky ve fázi SP-RS již většinou nejsou přítomny relapsy a dominuje pozvolná progresie neurologické invalidity. U zhruba 10% pacientů onemocnění probíhá bez relapsů progresivně od samotného počátku – jedná se o tzv. primárně-progresivní RS (PP-RS).

V současné době stále nemáme k dispozici kvalitní prognostické markery, které by jednoznačně ukázaly prognózu pacienta se stanovenou diagnózou RS. Neznalost prognózy znamená rovněž neschopnost zvolit odpovídající intenzitu léčebných postupů u individuálního pacienta, což může způsobit jak nedostatečnou léčbu na straně jedné, tak neadekvátní léčbu s převažujícími nežádoucími účinky na straně druhé. Prognózu RS v rámci současné klinické praxe odhadujeme na základě klinických ukazatelů - prognosticky nevýhodný vyšší věk v době počátku nemoci, mužské pohlaví, charakter příznaků první ataky (sfinkterové, motorické a cerebelární obtíže) a polysymptomatický začátek, reziduum po prvním relapsu, krátký interval mezi relapsy a vyšší frekvence relapsů během prvních let onemocnění (Weinshenker, Bass et al. 1989; Confavreux, Vukusic et al. 2003; Bergamaschi 2006). Z MR ukazatelů je prognosticky důležitá přítomnost a objem ložisek na vstupní MR při stanovení diagnózy (Tintore, Rovira et al. 2006; Fisniku, Brex et al. 2008).

1.4. Léčba RS – interferon beta, natalizumab, ASCT

V rámci léčby RS je ve vztahu k práci podrobněji uvedena léčba interferonem beta, natalizumabem a autologní transplantací kmenových buněk.

1.5. Interferon beta (IFN- β)

V léčbě RS využíváme komplexního imunomodulačního efektu IFN- β : snížení aktivace i průniku autoagresivních T-lymfocytů do CNS, snížení produkce prozánětlivých cytokinů (IFN- γ , TNF- α , aj.) a naopak zvýšení tvorby protizánětlivých cytokinů (IL-10, TGF- β), snížení exprese MHC proteinů II. třídy zásadních pro prezentaci antigenu CD4+ lymfocytům, zlepšení funkce regulačních T-lymfocytů, usnadnění apoptózy aktivovaných T-lymfocytů, a dalších funkcí (Havrdova 2001).

Vlivy IFN- β in vivo na základní imunitní subpopulace periferní krve nejsou podle dosavadních prací jednoznačné, byť může v průběhu léčby dojít k signifikantním změnám ve srovnání s nálezy před zahájením léčby (např. snížení počtu NK-buněk) (Mirowska, Skierski et al. 2003).

Aktuálně v klinické praxi využíváme v léčbě CIS a RR-RS rekombinantně vyráběné preparáty IFN- β -1a a IFN- β -1b. Účinnost léčby standardně hodnotíme podle klinické a MR aktivity onemocnění. Bohužel takto ale nejsme kvalitně schopni stanovit neúčinnost léčby dříve než v horizontu 12 měsíců, což je z hlediska pokračujícího zánětlivého procesu v CNS nedostatečné.

1.6. Natalizumab

Natalizumab je humanizovaná monoklonální protilátka, která je namířena proti adhezivní molekule $\alpha 4\beta 1$ integrinu na povrchu lymfocytů.

V periferní krvi byl většinou autorů popsán očekávaný zvýšený počet jednotlivých lymfocytárních subpopulací (nejvíce B-buněčné linie), které zde zůstávají po zablokování vstupu do CNS natalizumabem (Putzki, Baranwal et al. ; Krumbholz, Meinl et al. 2008).

Výsledky klinické studie s natalizumabem prokázaly přibližně dvojnásobnou účinnost ve srovnání s dosavadními léky první volby (Havrdova, Galetta et al. 2009). Zároveň s účinností lék s sebou nicméně přinesl také potencionální riziko závažné komplikace – virové oportunní infekce CNS, tzv. progresivní multifokální encefalopatie (PML). Riziko této komplikace jednoznačně souvisí s přítomností JC viru v organismu (cca 50-60% populace), s délkou podávání natalizumabu a předchozí imunosupresivní léčbou (Kappos, Bates et al.).

1.7. Vysokodávkovaná imunoablace s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk

V případě agresivního průběhu RS s vysokou frekvencí relapsů a rychlou progresí neurologického deficitu, lze zvážit off-label léčbu vysokodávkovanou imunoablací s podporou krvetvorných kmenových buněk (ASCT – autologous stem cells transplantation).

První centra se včetně České republiky začala věnovat této léčbě u RS v 90. letech (Fassas, Anagnostopoulos et al. 1997; Kozak, Havrdova et al. 2000). V letech 2002 a 2006 byly publikovány souhrnné výsledky z celoevropského registru EBMT – The European Group for Blood and Marrow Transplantation (Fassas, Passweg et al. 2002; Saccardi, Kozak et al. 2006), kde bylo zahrnuto 183 pacientů ze 45 center převážně s progresivní formou RS a průměrným stupněm EDSS 6,5. V rámci tříletého sledování bylo dosaženo intervalu bez progresu (progression-free survival, PFS) u 63% pacientů.

Z hlediska bezpečnosti byla s výkonem spojená mortalita (treatment-related mortality, TRM) podle údajů EBMT z r. 2006 5,3% (Saccardi, Kozak et al. 2006), podle analýzy z r. 2008 2,3% (Fassas a Mancardi 2008).

Základní představa o efektu ASCT u autoimunitních onemocnění je založena na principu zničení imunitního systému včetně autoreaktivních klonů T-lymfocytů intenzivní cytostatickou léčbou s následnou rekonstitucí imunitního systému z vlastních kmenových buněk za jiných než původních ontogenetických podmínek (Havrdova 2001; Mancardi a Saccardi 2008). Je však známo, že klony T-lymfocytů rozpoznávající antigeny CNS (myelinový bazický protein) jsou po ASCT do jednoho roku opět vytvořeny (Sun, Popat et al. 2004), k obnově NK-buněk a B-lymfocytů dochází dokonce již do tří měsíců po ASCT (Burt, Cohen et al. 2003; Nash, Bowen et al. 2003). Důležitý je ovšem charakter subpopulací obnovovaných imunitních buněk: po dvou letech od ASCT (režim cyklofosfamid a celotělové ozáření) byla prokázána zvýšená tvorba naivních CD4+ lymfocytů původem z thymu na úkor nižšího zastoupení paměťových CD4+ lymfocytů. Zároveň byla průkazná větší receptorová diversita T-buněk ve srovnání s předtransplantačním vyšetřením (Muraro, Douek et al. 2005). V dospělém věku obnovená thymopoéza z kmenových buněk tak může být zodpovědná za nastavení autotolerance po ASCT.

1.8. Neuromyelitis optica

Neuromyelitis optica (NMO) představuje vzácné autoimunitní onemocnění CNS s dominantním postižením optických nervů a míchy. Patofyziologicky se jedná o onemocnění charakterizované autoimunitním zánětem s důležitou úlohou protilátkové specifické imunity (B-lymfocyty, plazmatické buňky). Revidovaná diagnostická kritéria pro NMO byla publikována v r. 2006 (Wingerchuk, Lennon et al. 2006). V léčbě NMO využíváme v případě relapsu stejně jako u RS methylprednisolon nebo při jeho nedostatečném efektu sérii plazmaferéz. V dlouhodobé preventivní léčbě je doporučován azathioprin, rituximab, cyklofosfamid a mitoxantron (druhá volba), případně v další linii intravenózní imunoglobuliny, methotrexát a mykofenolát mofetil. Doporučenou variantu léčby představuje také chronický plazmaferetický program (Sellner,

Boggild et al.). Efekt transplantace kmenových buněk dosud u větší skupiny NMO pacientů popsán nebyl.

1.9. Allogenní transplantace kmenových buněk u autoimunitních onemocnění

Ještě vyšší účinnost v léčbě agresivních autoimunitních chorob ve srovnání s ASCT lze teoreticky očekávat u allogenní (heterologní) transplantace (alloSCT) kmenových buněk od cizího dárce. U RS byl nejprve popsán efekt alloSCT pouze na jednotlivých kazuistikách pacientů se současnou hematonekologickou diagnózou, pro kterou bylo nutno přistoupit k alloSCT. Výsledky byly u některých pacientů pozitivní (Pasagian-Macaulay, Aston et al. 1997), ale jsou popsány i případy, kdy alloSCT nevedla ke stabilizaci RS (Lu, Storek et al. 2009). Zásadním limitem k provedení kvalitní studie s cílem zjistit efekt léčby alloSCT u RS je vysoká mortalita výkonu (5-45%). V rámci registru EBMT byla retrospektivně zpracována data souboru 35 pacientů s autoimunitními chorobami, kteří byli z důvodů této samotné diagnózy léčeni alloSCT (Daikeler, Huggle et al. 2009). Jednalo se o heterogenní soubor pacientů, ale celkově dosáhlo alespoň částečné remise 78% pacientů na 70,7 měsíců. Mortalita spojená s léčbou alloSCT dosáhla v tomto souboru 20%. Dosud nebyla publikována žádná data o provedení alloSCT u pacienta s NMO.

2. CÍLE PRÁCE

1. podrobně retrospektivně definovat skupinu pacientů s agresivní roztroušenou sklerózou, kteří byli v Centru pro demyelinizační onemocnění Neurologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze léčeni vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk v letech 1998-2008 s cílem nalézt klinické ukazatele budoucí odpovědi na tuto léčbu a zpřesnit indikaci k této léčbě
2. popsat efekt a bezpečnost allogenní transplantace kmenových buněk na případech dvou pacientek s autoimunitním onemocněním CNS (RS a NMO)
3. prospektivně sledovat vývoj jednotlivých lymfocytárních subpopulací a produkci intracelulárních cytokinů v periferní krvi u tří skupin pacientů:
 - A) pacientů s klinicky izolovaným syndromem léčených interferonem beta
 - B) pacientů s relaps-remitentní roztroušenou sklerózou léčených natalizumabem
 - C) pacientů s agresivní roztroušenou sklerózou léčených vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk
4. korelovat jednotlivé lymfocytární subpopulace a produkci intracelulárních cytokinů v periferní krvi pacientů všech tří skupin před zahájením a v průběhu léčby s klinickou aktivitou onemocnění vyjádřenou počtem atak a progresí neurologické invalidity (parametr EDSS) s cílem najít společný imunologický prognostický ukazatel aktivity onemocnění

3. PACIENTI A METODY

Všichni pacienti zařazení do sledování v rámci této práce jsou v péči Centra pro demyelinizační onemocnění Neurologické kliniky 1.LF UK a VFN v Praze. Pacienti byli o výzkumu podrobně informováni a podepsali informovaný souhlas.

3.1. Pacienti zařazení do imunologického sledování – 1. část práce

V první části práce bylo zařazeno do sledování celkem 33 pacientů s klinicky izolovaným syndromem (CIS) léčených interferonem beta-1a 30 µg intramuskulárně jedenkrát týdně (Avonex®), 17 pacientů s relaps-remitentní RS léčených natalizumabem (Tysabri®) v dávce 300 mg intravenózně v intervalu 4 týdnů a 14 pacientů s RS léčených ASCT.

Tabulka č. 1: Základní charakteristiky sledovaných skupin pacientů

	CIS - interferon beta	RS – natalizumab	RS – ASCT
Počet pacientů	33	17	14
Poměr ženy:muži	22:11	9:8	7:7
Průměrný věk při zahájení léčby/CIS v letech (median)	31 (29)	33 (28)	31 (188)
Průměrná délka trvání RS při zahájení léčby v letech (median)	-	10 (8,5)	6 (5)
Průměrný stupeň EDSS při zahájení léčby/CIS (median)	3,0 (4,0)	3,5 (4,0)	4,5 (4,0)
Počet pacientů se změnou léčby v průběhu 24-měsíčního sledování	7	4	4
Počet pacientů vyřazených v průběhu 24-měsíčního sledování	0	4	0

CIS – klinicky izolovaný syndrom ASCT – imunoablace s podporou autologních kmenových buněk
RS – roztroušená skleróza EDSS – Expanded Disability Status Scale

Schéma sledování pacienta zahrnovalo zhodnocení neurologického nálezu (EDSS) a provedení odběrů periferní krve k analýze včetně imunologických parametrů před zahájením léčby (včetně kortikosteroidů v případě CIS) a dále ve 3., 6., 12. a 24. měsíci léčby. Za potvrzenou progresi neurologického nálezu bylo přitom považováno zhoršení o ≥ 1 stupeň na škále EDSS (při EDSS < 5) nebo zhoršení o $\geq 0,5$ stupně na škále EDSS (při EDSS ≥ 5) trvající konstantně alespoň 6 měsíců.

3.2. Pacienti s roztroušenou sklerózou léčení vysokodávkovanou imunoablací s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT) - desetileté sledování (2. část práce)

Retrospektivně byla zpracována klinická data 26 pacientů s RS léčených ASCT v letech 1998-2008 (charakteristika souboru shrnuta v Tabulce č. 2). Léčba ASCT zahrnovala: 1. mobilizaci kmenových buněk z kostní dřeně do periferní krve (cyklofosfamid a faktor stimulující granulocytární kolonie filgrastim); 2. případné zpracování štěpu (ex vivo = in vitro purging pomocí pozitivní selekce CD34+ nebo negativní selekce T-lymfocytů) a zamražení kmenových buněk; 3. chemoterapeutický režim tzv. BEAM (BCNU=carmustin, etoposid, cytosin arabinosid, melfalan); 4. vrácení kmenových buněk do krevního oběhu pacienta, tzv. převod (den 0); 5. podání antithymocytárního globulinu (ATG) - tzv. in vivo purging.

Tabulka č. 2: Základní charakteristiky pacientů léčených ASCT v letech 1998-2008

	Celá skupina	RR-RS	SP-RS
Počet pacientů	26	11 (42%)	15 (58%)
Poměr ženy:muži	15:11	6:5	9:6
Věk při ASCT v letech (median)	32 (188)	28 (27)	35 (35)
Délka trvání RS při ASCT v letech (median)	8 (7)	5 (4)	10 (189)
Délka trvání progresivní fáze u SP-RS	3 (Jacobs, Cookfair et al.)	-	3 (Jacobs, Cookfair et al.)
Stupeň EDSS při ASCT - průměr (median)	5,5 (6,0)	4,5 (4,5)	6,5 (6,5)
In vitro čištění štěpu	7 (27%)	3 (27%)	10 (67%)
Podání ATG (in vivo purging)	16 (62%)	9 (82%)	6 (40%)
Dvojitě čištění štěpu (in vitro + ATG)	2 (8%)	1	1
Průměrná délka sledování při analýze dat v měsících (median)	69 (66)	43 (19)	89 (96)

Pacienti byli vyšetřováni před léčbou ASCT a poté pravidelně v intervalu šesti měsíců po léčbě ASCT až do června 2009. Hodnocení zahrnovalo stupeň EDSS, počet atak, dlouhodobou léčbu po ASCT a nežádoucí účinky. Časné nežádoucí účinky byly definovány jako nežádoucí účinky, které se vyskytly v prvních 100 dnech po ASCT (po dni 0). Všechny ostatní nežádoucí účinky, které se objevily po více než 100 dnech od ASCT, představovaly pozdní nežádoucí

účinky. Úmrtí spojené s transplantací (TRM – transplant related mortality) je definováno jako jakékoliv úmrtí, které nastává v období prvních 100 dnů po ASCT (Fassas, Passweg et al. 2002; Saccardi, Kozak et al. 2006).

3.3. Allogenní transplantace kmenových buněk v léčbě autoimunitních onemocnění – kazuistika RS a NMO

58-letá pacientka s RS, první akutní příznaky onemocnění v r. 1988 - vertigo a instabilita, diagnóza stanovena v r. 1992 při stupni EDSS 3,5. V dalších letech byla fáze onemocnění hodnocena jako SP-RS. Kromě kortikosteroidů byla pacientka léčena přechodně orálním cyklofosfamidem (1995-1997). V září r. 2000 byla u pacientky stanovena diagnóza myelodysplastického syndromu a pacientka byla indikována k léčbě alloSCT. Léčba byla provedena v březnu r. 2001 s využitím ablativního režimu (BuCy2 - busulfan, cyklofosfamid) a kmenových buněk od HLA shodného příbuzného dárce (bratr). Neurologický nálezn byl v době léčby alloSCT hodnocen stupněm EDSS 4,0. Po provedení alloSCT probíhají pravidelné hematologické kontroly včetně hodnocení dárcovské krvetvorby (chimerismu). Neurologické sledování v průběhu let 2001-2012 zahrnovalo neurologické vyšetření (EDSS) ve tříměsíčních intervalech a MR mozku ve dvouletém intervalu.

36-letá pacientka s diagnózou neuromyelitis optica, první příznaky v r. 1998 – optická neuritis vpravo. V následujících třech letech pacientka prodělala tři ataky s reziduálním postižením zraku a v r. 2002 byla zahájena léčba interferonem beta. Postupně byly u pacientky vyzkoušeny všechny doporučované léčebné postupy, a poté byla v r. 2009 provedena autologní transplantace kmenových buněk – taktéž bez efektu. V dubnu r. 2011 bylo přistoupeno k léčbě alloSCT (režim s fludarabinem, cyklofosfamidem a ATG, kmenové buňky od HLA shodného nepřibuzného dárce). Neurologický nálezn byl v době léčby alloSCT hodnocen stupněm EDSS 6,5. Po provedení alloSCT probíhají pravidelné hematologické kontroly včetně hodnocení chimerismu, neurologické vyšetření probíhá v tříměsíčních intervalech (hodnocení relapsů, EDSS, títř NMO-IgG protilátek v krvi, MR mozku a míchy). Títř NMO-IgG protilátek jsou testovány metodou nepřímé imunofluorescence s využitím komerčního kitu Neurology Mosaic 17, Euroimmun.

3.4. Metody vyšetřeni lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů

Plná periferní krev byla inkubována v přítomnosti příslušné monoklonální protilátky (CD3-FITC (fluorescein isothiocyanate), CD3-PerPC (peridinin chlorophyll protein), CD4-PerPC, CD8-PerPC, CD19-PerPC, CD5-PerPC, CD16+56-PerPC, HLA-DR-PE (phycoerythrin), CD45RA-FITC, CD14-FITC); (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Po lyzační a promývacích fázích, byla

provedena šestibarevná analýza průtokovým cytometrem FACSCanto (Fluorescence Activated Cell Sorter, BD Biosciences) se softwarem BD FACSDiva 5,03 (BD Biosciences).

Ke stanovení intracelulárních cytokinů byly imunitní buňky plně periferní krve nejprve kultivovány a stimulovány - lymfocyty za přítomnosti Brefeldinu A (BFA), forbol 12-myristát 13-acetátu (PMA) a ionomycinu, monocyty za přítomnosti lipopolysacharidu (LPS) a Brefeldinu A. Následně byly buňky označeny monoklonální protilátkou proti povrchovým antigenům (CD3, CD14), fixovány, permeabilizovány a označeny monoklonálními protilátkami proti intracelulárním cytokinům (TNF α -FITC, IFN γ -FITC, IL2-PE, IL4-PE, IL10-PE, IL12-PE). Intracelulární cytokiny byly analyzovány na výše uvedeném průtokovém cytometru. T-lymfocyty byly ohraničeny pomocí FSC (forward scatter) a CD3; monocyty byly ohraničeny pomocí SSC (side scatter) a CD14.

3.5. Statistická analýza

Analýza dat dlouhodobě sledované skupiny pacientů léčených ASCT zahrnovala výpočet intervalu bez progresu (PFS – progression free survival) s využitím Kaplan-Meierovy křivky, porovnání PFS jednotlivých skupin pomocí Coxova F testu a porovnání incidence relapsů (tzv. relapse-rate) pomocí neparametrického párového sign testu.

Pro porovnání sledovaných skupin ve vztahu k imunologickým parametrům byl použit dvouvýběrový (nepárový), oboustranný Studentův t-test. ANOVA (Analysis Of Variance) test byl využit při hodnocení rozdílů vývoje jednotlivých imunologických parametrů mezi sledovanými skupinami. K nalezení možného predikčního ukazatele pro jednotlivé parametry vývoje onemocnění byla použita mnohočetná regresní analýza, přičemž statisticky nevýznamné ukazatele byly postupně z analýzy vyloučeny. Veškeré statistické výpočty byly provedeny pomocí programu STATISTICA 8 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA). Rozhodovací křivka pro zhodnocení diagnostické přesnosti predikčního faktoru vzhledem ke klinickému parametru byla vypočítána pomocí aplikace dostupné na webových stránkách: <http://www.jrocfit.org>.

4. VÝSLEDKY

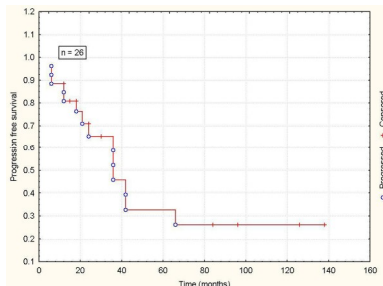
4.1. Výsledky retrospektivního sledování skupiny pacientů léčených vysokodávkovanou imunoablačí s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT) v letech 1998-2008

1. celý soubor 26 pacientů byl zahrnut do analýzy, délka sledování dosáhla 11-132 měsíců (medián 66 měsíců). Interval bez progresu (progression free

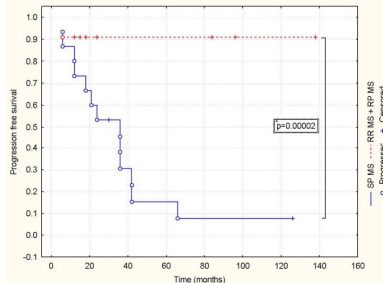
survival, PFS) - měřený pomocí změny hodnoty EDSS – činil 70,8% po třiletém a 29,2% po šestiletém sledování (Graf. č. 1).

2. PFS v rámci třiletého sledování u pacientů s RR-RS (n=11, délka sledování 11-132 měsíců, medián 19 měsíců) byl 84,4% ve srovnání s 60% u pacientů se SP-RS formou onemocnění (n=15, délka sledování 30-130 měsíců, medián 96 měsíců) – Graf č. 2. ($F(2, 26) = 16,65527$, $p = 0,00002$).

Graf. č. 1



Graf. č. 2



3. v hodnotě PFS nebylo dosaženo statisticky významného rozdílu mezi pacienty s $EDSS < 6$ (n=8) a $EDSS \geq 6$ (n=18).

4. skupina pacientů s délkou trvání choroby méně než 5 let dosáhla signifikantně lepšího výsledku PFS, $F(4, 24) = 5,745650$, $p = 0,00217$. PFS po třech letech ve skupině pacientů s délkou trvání onemocnění < 5 let (n=6, délka sledování 11-132 měsíců, medián 18 měsíců) činil 82,3% ve srovnání s 61,8% ve skupině pacientů s délkou trvání RS ≥ 5 let (n=20, délka sledování 14-130 měsíců, medián 73 měsíců).

5. statistické významnosti dosáhl rozdíl mezi křivkami PFS u pacientů s věkem pod 35 let oproti starším pacientům, $F(12, 16) = 3,468337$, $p = 0,01118$. U všech pacientů starších 35 let progredoval neurologický nález měřený škálou EDSS před dosažením konce čtyřletého sledování.

6. medián ročního počtu relapsů v roce před léčbou ASCT byl 2 (1. kvartil 1, 3. kvartil 2), zatímco medián ročního počtu relapsů v prvních dvou letech po ASCT byl 0 (1. kvartil 0, 3. kvartil 1). Rozdíl byl statisticky významný (Sign test, $p = 0,045$).

Dlouhodobá léčba RS po ASCT zahrnovala interferon beta (n=2), glatiramer acetát (n=9), intravenózní imunoglobuliny – IVIG (n=13), intravenózní pulzy cyklofosfamidů (n=5), intravenózní pulzy mitoxantronu (n=1) a azathioprin (n=5). Jeden pacient byl léčen mykofenolát mofetilem, dva pacienti byli léčeni cyklosporinem A. Všichni pacienti byli po ASCT dlouhodobě léčeni nízkou dávkou kortikosteroidů (do maximální denní dávky ekvivalentní 10 mg prednisolonu orálně).

Úmrtnost spojená s léčbou ASCT (transplant related mortality) byla v našem souboru pacientů 0%. V průběhu dlouhodobého sledování (více než 100 dnů po ASCT) byly zaznamenány celkem dvě úmrtí. 49-letá žena zemřela 30 měsíců po ASCT na extramurálním pracovišti pro komplikovanou, pozdně diagnostikovanou peritonitidu. Ve druhém případě byl u 40-letého muže diagnostikován 39 měsíců po ASCT zhoubný tumor CNS glioblastoma multiforme, na který pacient 60 měsíců po ASCT zemřel.

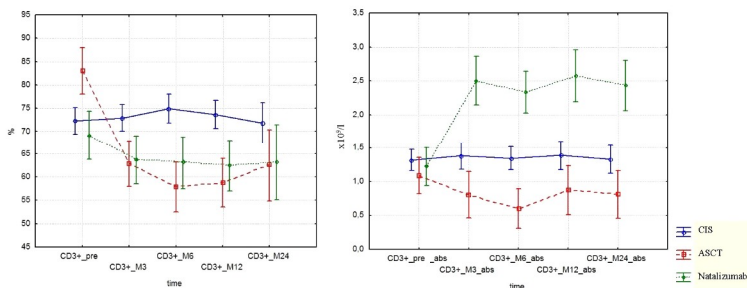
Časné nežádoucí účinky během prvních 100 dnů po ASCT byly vyhodnoceny u 25 pacientů (data jedné pacientky byla skartována). Zahrnovaly febrilní neutropenii (n=14), sepsi (n=10), infekci močových cest (n=7), průjem (n=16) a těžkou mukosiditu stupně II-III (n=11). Jedna pacientka vyvinula bolesti kloubů s pozitivitou revmatoidního faktoru 2 měsíce po ASCT.

Pozdní nežádoucí účinky (po více než 100 dnech po ASCT) zahrnovaly závažnou sepsi (n=1, 6 měsíců po ASCT), recidivující herpetické infekce – labiální herpes simplex virus typu I a výsev varicella zoster viru v genitální oblasti s akutní močovou retencí (n=1, 9 měsíců po ASCT), chronickou hepatitis typu B (n=1, 24 měsíců po ASCT) a glioblastoma multiforme (n=1, 39 měsíců po ASCT). Jedna pacientka vyvinula 15 měsíců po ASCT získanou pozitivitu inhibitoru faktoru VIII koagulační kaskády.

4.2. Prospektivní sledování vývoje lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů v periferní krvi

V rámci práce bylo zpracováno dvouleté sledování lymfocytárních subpopulací periferní krve u pacientů s RS všech tří zvolených skupin v procentuálních (%) a absolutních (abs) hodnotách. Statistický rozdíl v základních subpopulacích (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+56) mezi jednotlivými skupinami byl signifikantní po korekci mnohočetného testování.

Graf č. 3: Příklad grafického zpracování dvouletého sledování subpopulace CD3+ lymfocytů (% a abs hodnoty)



4.3. Výsledky statistického zpracování lymfocytárních subpopulací a intracelulárních cytokinů souhrnně u vybraných tří skupin pacientů ve vztahu ke klinické aktivitě onemocnění

V rámci souhrnné analýzy všech tří vybraných skupin pacientů byly porovnány jednotlivé imunologické parametry (vstupní hodnota před léčbou, hodnota ve 3. a 6. měsíci léčby) s přítomností relapsů RS mezi 6. a 24. měsícem sledování. V testovaných parametrech nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v imunologických parametrech (absolutní a procentuální hodnoty subpopulací) mezi pacienty bez relapsu a pacienty s relapsem.

Dále byly porovnány jednotlivé imunologické parametry (lymfocytární subpopulace v absolutních i procentuálních hodnotách) v časových intervalech před léčbou a ve 3. a 6. měsíci léčby u pacientů bez progresse invalidity a pacientů s progresí mezi 6. a 24. měsícem sledování.

Ze vstupních hodnot imunologických parametrů před léčbou byl prokázán statisticky vyšší absolutní počet CD19+ lymfocytů u pacientů bez progresse versus s progresí ($p=0,01$, průměr 0,19 versus 0,11). U vyšetřovaných parametrů ve 3. měsíci léčby byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi pacienty bez progresse a s progresí v absolutní hodnotě CD3+ lymfocytů ($p=0,057$). V 6. měsíci léčby byly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly mezi pacienty bez progresse a s progresí u parametrů CD3+% ($p=0,04$), CD19% ($p=0,014$), CD5+% ($p=0,028$), CD3+abs ($p=0,002$), CD4+abs ($p=0,007$) a CD8+abs ($p=0,002$).

Pro další analýzu byly využity imunologické parametry z doby před léčbou a po třech měsících léčby. Mnohočetná regresní analýza (počínající všemi parametry vstupními a v měsíci 3) ukázala statisticky signifikantní schopnost absolutní hodnoty CD19+ lymfocytů před zahájením léčby predikovat hodnotu EDSS v měsíci 24 ($-F(1,54)=21,04$, $p<0,001$, $R^2=0,27$, $R=0,53$).

Vstupní absolutní hodnota CD19+ lymfocytů dohromady s procentuální hodnotou CD3+ lymfocytů ve 3. měsíci sledování pak ukázaly predikční potenciál ve vztahu k hodnotě EDSS v měsíci 24 s ještě vyšší statistickou významností ($-F(2,49)=15,6$, $p<0,001$, $R^2=0,39$, $R=0,62$).

Absolutní hodnota 0,2 CD19+lymfocytů před léčbou odlišila pacienty bez progresse oproti pacientům s progresí k 24. měsíci sledování se sensitivitou 81% a specificitou 46%.

4.4. Hodnocení léčby allogenní transplantací kmenových buněk u dvou pacientek s autoimunitním onemocněním CNS (efektivita a bezpečnost)

Léčba alloSCT byla u pacientky s RS provedena v březnu r. 2001 bez známek akutní reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease, GvHD) s dosažením 100% chimerismu dárcovské krvetvorby. Přečhodná imunosupresivní

profylaxe zahrnovala cyklosporin A a mykofenolát mofetil orálně. Nedošlo k rozvoji žádných příznaků chronické GvHD a pacientka zůstává jedenáct let po léčbě alloSCT hematologicky v kompletní remisi. Neurologicky pacientka do letošního roku 2012 zůstává bez významné progresy objektivního neurologického nálezu (EDSS 4,0) i MR nálezů. Léčba RS po alloSCT zahrnuje prednisolon 5 mg obden orálně (2001 - dosud) a od r. 2008 dosud pro dvě přechodná zhoršení paraparézy dolních končetin dále intravenózní imunoglobuliny v dávce 15 gramů jedenkrát měsíčně.

Léčba alloSCT byla u pacientky s NMO provedena v dubnu r. 2011. Akutní GvHD dosáhla stupně 2, nedošlo k rozvoji chronické GvHD při profylaxi cyklosporinem A. Bylo dosaženo stabilních 100% chimerismu dárcovské krvetvorby. Neurologicky byla alloSCT provedena ve fázi vysoké frekvence relapsů NMO a při stupni EDSS 6,5. 18 měsíců po léčbě alloSCT zatím nedošlo k rozvoji nového relapsu NMO. Dochází průběžně ke zlepšování neurologického nálezu (aktuální stupeň EDSS 6,0) a mírné regresi a dále v čase stabilizaci nálezů na MR. Poprvé od stanovení diagnózy NMO u této pacientky došlo k poklesům hodnot titrů NMO-IgG na neměřitelné hodnoty. Z neurologického hlediska je pacientka po alloSCT dosud (říjen 2012) bez specifické NMO léčby.

5. DISKUZE

Roztroušená skleróza (RS) představuje chronické zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému s prokázanou autoimunitní etiologií. Existující skupina léků využívaných v léčbě RS má statisticky významný efekt na snížení počtu a závažnosti akutních relapsů a oddálení progresivního stadia onemocnění s nárůstem trvalé invalidity. Onemocnění ale zatím není vyléčitelné a bohužel máme velmi malou schopnost predikovat prognózu dalšího průběhu choroby a zvolit individuálně adekvátní intenzitu léčby.

V práci byla retrospektivně zpracována data skupiny 26 pacientů s RS léčených autologní transplantací kmenových buněk (ASCT) na našem pracovišti v letech 1998-2008. Délka sledování dosáhla 5,5 let (medián), což představuje jednu z největších a nejdéle sledovaných skupin (celosvětově je odhadován počet takto léčených pacientů s RS na 400-500 pacientů (Mancardi and Saccardi 2008)). V naší skupině bylo dosaženo hodnoty základního ukazatele – intervalu bez progresy (progression free survival, PFS) – 70,8% po třech letech od léčby ASCT. PFS však bylo výrazně nižší u celé skupiny po šesti letech sledování – 29,2%. Délky sledování šesti let dosáhlo z celkového počtu 26 pacientů ovšem pouze 13 pacientů, z toho 10 pacientů již v pokročilejší, sekundárně-progresivní fázi choroby. Vliv fáze a tíže onemocnění na výsledný efekt léčby ASCT byl dále analyzován na jednotlivých podskupinách pacientů v rámci tříletého sledování. Prokázali jsme, že krátké trvání onemocnění (do pěti let od prvních příznaků RS),

nižší věk (do 35 let) a dosud relabující průběh onemocnění vedou k lepšímu výsledku léčby ASCT měřené ukazatelem PFS. Neprokázali jsme jednoznačný vliv stupně invalidity měřené na škále EDSS na účinek léčby ASCT, což bylo v minulosti publikováno (Burt, Cohen et al. 2003).

U naší skupiny pacientů byla vůbec poprvé zpracována podrobně léčba RS před a po ASCT. Většina pacientů neměla žádnou specifickou léčbu RS v prvním roce po ASCT. Imunomodulační léčba byla zahájena v případě relapsu onemocnění nebo při progresi neurologického nálezu o $\geq 0,5$ stupně EDSS škály. Odpovídající počet pacientů s relabující nebo progredující formou onemocnění byl po ASCT léčen imunodulačními léky, tedy tento faktor zásadně neovlivnil rozdílný průběh PFS křivek u obou skupin pacientů. Případná léčba po ASCT zahrnovala stejné preparáty jako před léčbou ASCT, tedy vliv na snížení počtu relapsů lze jednoznačně připisat proceduře ASCT, která je chápána jako postup resetující imunitní systém. U žádného pacienta nebylo v prvních třech letech po ASCT nutno přistoupit k eskalaci léčby na pulzy cytotatik (cyklofosamid, mitoxantron), nebo na již dostupnou monoklonální protilátku natalizumab.

Léčba ASCT v našem souboru byla relativně bezpečná, mortalita spojená s výkonem (transplant related mortality, TRM – definována jako úmrtí do 100 dnů po ASCT) byla 0%. V rámci pozdních nežádoucích účinků byl zaznamenán 15 měsíců po ASCT případ vzácného sekundárního autoimunitního onemocnění – získaného inhibitoru koagulačního faktoru VIII. Nejedná se o onemocnění běžně asociované s RS. Zde se však jedná o již druhý případ získané hemofilie u pacienta s RS po léčbě ASCT, přičemž první hlášená pacientka v řeckém centru vyvinula krvácivé komplikace 25 měsíců po ASCT a na tuto komplikaci zemřela (Kaloyannidis, Sakellari et al. 2004). Jednomu pacientovi z našeho souboru byl 39 měsíců po ASCT diagnostikován primární tumor CNS, glioblastoma multiforme. Na tuto komplikaci pacient zemřel 60 měsíců po ASCT. Riziko indukce malignity po použití středně intenzivních chemoterapeutických režimů je obecně velmi nízké (Gratwohl, Passweg et al. 2005; Saccardi, Kozak et al. 2006). Podle dosavadních znalostí nedáváme tuto malignitu do jednoznačné souvislosti s léčbou ASCT, vlastní RS nebo její předchozí imunosupresivní/cytostatickou léčbou, byť kombinaci všech uvedených imunosupresivních léčebných režimů jako rizikový faktor nemůžeme zcela vyloučit.

V práci byly dále popsány kazuistiky dvou pacientek s autoimunitním demyelinizačním onemocněním CNS, u nichž byla z různého důvodu provedena allogenní transplantace kmenových buněk. V prvním případě se jednalo o pacientku již v sekundárně progresivní fázi RS, která musela podstoupit léčbu alloSCT pro vedlejší diagnózu myelodysplastického syndromu. V tomto případě byl využit ablativní režim, dárce kmenových buněk byl HLA shodný bratr pacientky. Léčba byla velmi dobře tolerována (bez známek akutní či chronické GvHD) a měla příznivý vliv na dlouhodobou (11 let sledování) stabilizaci RS.

Pokud se podíváme na dostupná data v literatuře pouze ve vztahu k RS, jednalo se zatím o 10 pacientů léčených alloSCT včetně naší pacientky: 3 pacienti s RR-RS, 4 pacienti s progresivní formou RS, u 3 pacientů nebyla fáze onemocnění zaznamenána. 7 pacientů bylo léčeno alloSCT pro hematologickou diagnózu, u 3 byla primárním důvodem k léčbě samotná RS, z čehož vyplývá, že převažovalo využití ablativních režimů. Dárci kmenových buněk byli HLA identičtí sourozenci (n=6), HLA shodní sourozenci (n=3) nebo HLA shodný nepříbuzný dárcce (n=1). Ve vztahu k autoimunitnímu onemocnění bychom mohli logicky předpokládat, že větší efekt může být dosažen obnovou nepříbuzné dárcovské krvetvorby. V jediném takovém případě však ke stabilizaci RS nedošlo (Lu, Storek et al. 2009). Všichni pacienti, u nichž byla primárním důvodem k alloSCT samotná RS, z léčby profitovali a dosáhli alespoň částečné stabilizace. Léčba byla relativně dobře tolerována. Z desíti pacientů bylo popsáno jedno úmrtí (10%) ve spojitosti s alloSCT.

V této práci je dále popsána kazuistika pacientky s NMO, která byla léčena alloSCT po předchozím selhání vškeré konvenční léčby i autologní transplantace kmenových buněk. Jedná se o unikátní pacientku, protože podobný případ dosud nebyl publikován. U této pacientky je k dispozici 18-měsíční sledování po alloSCT léčbě a zatím lze statut její choroby označit za „disease free“, protože nedošlo k žádnému relapsu či progresi neurologického nálezu, nedošlo k progresi nálezu či známkám aktivity onemocnění na MR a navíc došlo k vymizení patognomických protilátek IgG proti aquaporinu 4. Léčba alloSCT byla tolerována velmi dobře a pacientka je od alloSCT bez specifické NMO léčby. Na základě výsledků u této pacientky je možno také u NMO zvažovat léčbu alloSCT u nepříznivého a standardní léčbou nedostatečně ovlivnitelného průběhu onemocnění. V těchto případech se již výše uvedené riziko mortality spojené s výkonem blíží riziku úmrtí v souvislosti se samotným autoimunitním onemocněním. Z naší zkušenosti vyplývá doporučení k šetrnějšímu non-lyeloablativnímu režimu a využití nepříbuzného, HLA shodného dárcce.

Ve druhé části práce byly prospektivně studovány ve vztahu k imunologickým markerům tři skupiny pacientů. Záměrně byly zvoleny skupiny pacientů v různém stádiu onemocnění s cílem najít obecný ukazatel další prognózy RS bez ohledu na dosavadní průběh onemocnění. Výzkum zahrnoval imunologické parametry periferní krve (základní lymfocytární subpopulace a intracelulární cytokiny), protože toto vyšetření je z hlediska jak samotného pacienta tak z hlediska laboratorního a finančního relativně dobře dostupné.

Prvním výsledkem práce bylo konzistentní dvouleté sledování imunologických parametrů periferní krve. Podle našich znalostí se jedná o dosud jediné obdobné sledování zahrnující absolutní i procentuální hodnoty jednotlivých lymfocytárních subpopulací v intervalu sledování dvou let.

U skupiny pacientů léčených ASCT byla pozorována v souhlasu s předchozími pracemi imunitní rekonstituce. Dominovala dlouhodobá deplece CD4+ lymfocytů, u nichž nedošlo k úplné úpravě na hodnoty před ASCT ani po 24 měsících sledování, a naopak velmi rychlá obnova CD8+ lymfocytů a NK-buněk (Te Boekhorst, Lamers et al. 2006). V souladu s pozorováním u pacientů se systémovým lupus erythematoses léčených ASCT (Alexander, Thiel et al. 2009), došlo u naší skupiny pacientů s RS rovněž k rychlé obnově B-lymfocytů na počty převyšující hodnoty před ASCT včetně hodnot z 24. měsíce sledování. Podle Alexandra et al. dochází po ASCT u SLE pacientů především k obnově naivních B-lymfocytů, zatímco obnovení paměťových B-lymfocytů je mnohem pomalejší. Tento fakt může být spojen s navozením autotolerance po léčbě ASCT.

U skupiny léčené natalizumabem byl pozorován nárůst počtu všech základních subpopulací v periferní krvi - CD4+, CD8+, CD19+ lymfocytů a NK-buněk. Ve shodě s dříve publikovanou prací Putzkiho et al. (Putzki, Baranwal et al.) zvýšení počtu B-lymfocytů bylo doprovázeno relativním poklesem počtu CD4+ lymfocytů, což může být důležité pro další výzkum mechanismů účinku natalizumabu i jeho bezpečnosti, především ve vztahu k možné komplikaci virové oportunní infekci progresivní multifokální leukoencefalopatií.

U skupiny pacientů s CIS nebyly nalezeny v průběhu léčby interferonem beta signifikantní změny v lymfocytárních subpopulacích. To může být vysvětleno efektem léku především na funkci nikoli absolutní počet jednotlivých imunitních buněk (Zafranskaya, Oschmann et al. 2007).

V rámci hledání prediktivního imunologického ukazatele jsme se soustředili na statistické vyhodnocení parametrů získaných souhrnně u pacientů všech tří skupin před léčbou a ve 3. a 6. měsíci léčby ve vztahu k přítomnosti relapsů a progresi v průběhu dvouletého sledování. Zvoleny byly právě hodnoty před léčbou a v prvních měsících léčby, protože to je optimální doba k hodnocení prognózy s možností přizpůsobení intenzity terapie. Popsali jsme statisticky významnou korelaci mezi absolutním počtem CD19+ B-lymfocytů v periferní krvi před zahájením léčby (všechny tři skupiny dohromady) a progresí invalidity měřenou pomocí zhoršení na škále EDSS v průběhu dvouletého sledování. Vyšší statistické významnosti bylo možno dosáhnout spojením vstupní hodnoty CD19+ lymfocytů a CD3+ lymfocytů 3 měsíce po zahájení léčby. Vzhledem ke snaze predikovat průběh onemocnění co nejdříve na počátku nebo optimálně ještě před zahájením léčby jsme se dále věnovali především parametru CD19+ lymfocytů. U absolutní hodnoty CD19+ lymfocytů před zahájením léčby jsme byli schopni určit prahovou hodnotu ve výši 0,2, která odlišuje pacienty s progresí a bez progresi v následujících dvou letech léčby, a to se sensitivitou 81% a specificitou 46%.

V patofyziologii autoimunitního zánětu byly stavěny u RS do popředí řadu let výhradně T-lymfocyty. Dlouho je však popisována také přítomnost B-lymfocytů a plazmatických buněk v lézích RS (Esiri 1980; Baranzini, Jeong et al.

1999) a produkty těchto buněk - oligoklonální pásy – jsou využívány přes 20 let v diagnostice RS. B-lymfocyty byly prokázány dále v ektopických folikulech na meningách pacientů s RS (Magliozzi, Howell et al. 2007).

Jednoznačně pak roli B-lymfocytů v autoimunitním procesu RS potvrdila statisticky významná účinnost humanizované monoklonální protilátky proti povrchovému antigenu B-buněk CD20 ocrelizumabu ve fázi II klinického zkoušení u RR-RS na snížení počtu relapsů onemocnění a aktivních lézí na MR (Kappos, Li et al.).

V naší práci koreloval vyšší počet B-lymfocytů v periferní krvi před léčbou (souhrnné zpracování pacientů v různém stadiu onemocnění a před jedním ze tří různých druhů léčby) s lepším klinickým statutem vyjádřeným pomocí progresí invalidity v následujících dvou letech sledování. Práce nebyla zaměřena na etiopatogenetické vysvětlení tohoto fenoménu, nicméně je možno diskutovat příčiny této prognosticky příznivé role vyššího počtu B-lymfocytů periferní krve u pacientů s RS. Hypoteticky by vyšší počet B-lymfocytů mohl znamenat aktivní zánětlivou fázi onemocnění, u které převažuje autoimunitní zánět nad irreverzibilní neurodegenerací. V takovém případě lze očekávat efektivitu protizánětlivých/imunomodulačních léčebných postupů včetně vlivu na oddálení progresí invalidity. Nicméně této zjednodušené představě neodpovídal fakt, že ani jeden ze zvolených léků nevedl k dlouhodobé redukci počtu B-lymfocytů v periferní krvi. Navíc průměrná délka trvání onemocnění deset let u ASCT skupiny a šest let u natalizumabové skupiny při zahájení léčby rovněž vede k pochybnostem o plně zánětlivé fázi choroby bez vlivu neurodegenerace.

Do úvahy přichází dále přesun B-lymfocytů do kompartmentu periferní krve s naopak relativně malým zastoupením těchto zánětlivých buněk v kompartmentu likvoru a tím celého CNS. Recentně byla publikována práce, která prokázala spojitost mezi vynikající odpovědí na léčbu natalizumabem, nižším počtem B-lymfocytů a produkcí IgM a částečně i IgG v likvoru pacientů s RR-RS (Villar, Garcia-Sanchez et al.). Teoreticky lze zvažovat i podíl protizánětlivých, interleukin 10 produkujících B-lymfocytů (regulačních B-buněk) na celkově zvýšeném počtu buněk této subpopulace v periferní krvi u pacientů s lepší prognózou ve vztahu k progresi invalidity v následujících dvou letech (Fillatreu, Gray et al. 2008).

6. ZÁVĚR

Výsledky práce lze shrnout do dvou základních oblastí:

1. byla zpracována desetiletá klinická data pacientů s agresivním průběhem RS, u nichž selhaly konvenční postupy léčby, a kteří byli léčeni off-label vysokodávkovanou imunoablaicí s podporou autologních kmenových buněk. Z výsledků byla definována skupina pacientů, která může z uvedené léčby profitovat

– pacienti s délkou trvání choroby do pěti let, do 35 let věku a s ještě relabujícími průběhem RS, u nichž převažuje zánětlivý proces nad irreverzibilní neurodegenerací. Zároveň byly zpracovány kazuistiky dvou pacientek s demyelinizačním onemocněním CNS, které profitovaly z léčby allogenní transplantací kmenových buněk. V případě onemocnění NMO jako primární indikace k této léčbě se jedná o dosažení unikátní stabilizace agresivního autoimunitního onemocnění. Léčba byla v obou případech dobře tolerována a může být do budoucna vzata do úvahy u autoimunitních onemocnění CNS s nepříznivým průběhem a selháním standardní léčby.

2. byl dokumentován vývoj lymfocytárních subpopulací v absolutních i procentuálních hodnotách v průběhu dvouletého sledování u tří skupin pacientů s demyelinizačním onemocněním (CIS léčený interferonem beta, RS léčená natalizumabem nebo autologní transplantací kmenových buněk). Byl nalezen možný prediktivní faktor klinické progrese onemocnění následujících dvou letech – absolutní hodnota CD19+ B-lymfocytů před zahájením terapie respektive kombinace vstupní absolutní hodnoty CD19+ lymfocytů s procentuální hodnotou CD3+ lymfocytů ve 3. měsíci od zahájení terapie. Prediktivní hodnota těchto imunologických faktorů musí být samozřejmě ověřena na velkých populacích pacientů, nicméně práce jednoznačně prokázala, že sledování základních lymfocytárních subpopulací periferní krve u pacientů s RS má svůj význam a je hodno dalšího výzkumu.

7. LITERATURA

1. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1999;53(3):457-65.
2. Abbas A, Lichtman A. *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Saunders 2005.
3. Adachi K, Kumamoto T, et al. Elevated soluble interleukin-2 receptor levels in patients with active multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1990;28(5):687-91.
4. Alexander T, Thiel A, et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* 2009;113(1):214-23.
5. Baranzini SE, Jeong MC, et al. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol* 1999;163(9):5133-44.
6. Bergamaschi R. Prognosis of multiple sclerosis: clinical factors predicting the late evolution for an early treatment decision. *Expert Rev Neurother* 2006;6(3):357-64.
7. Bielekova B, Catalfamo M, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(15):5941-6.
8. Burt RK, Cohen BA, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: failure of a total body irradiation-based conditioning regimen to prevent disease progression in patients with high disability scores. *Blood* 2003;102(7):2373-8.

9. Cepok S, Jacobsen M, et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001;124(Pt 11):2169-76.
10. Clerici M, Saresella M, et al. Single-cell analysis of cytokine production shows different immune profiles in multiple sclerosis patients with active or quiescent disease. *J Neuroimmunol* 2001;121(1-2):88-101.
11. Compston A. *McAlpine's Multiple Sclerosis*, Churchill Livingstone Elsevier 2006.
12. Confavreux C, Compston DA, et al. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55(8):671-6.
13. Confavreux C, Vukusic S, et al. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003;126(Pt 4):770-82.
14. Daikeler T, Hugle T, et al. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 2009;44(1):27-33.
15. De Jager PL, Rossin E, et al. Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8low cells. *Brain* 2008;131(Pt 7):1701-11.
16. Esiri MM. Multiple sclerosis: a quantitative and qualitative study of immunoglobulin-containing cells in the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1980;6(1):9-21.
17. Fassas A, Anagnostopoulos A, et al. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 1997;20(8):631-8.
18. Fassas A, Mancardi GL. Autologous hemopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it worthwhile? *Autoimmunity* 2008;41(8):601-10.
19. Fassas A, Passweg JR, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. A retrospective multicenter study. *J Neurol* 2002;249(8):1088-97.
20. Filion LG, Matuszevicius D, et al. Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2003;106(2):127-38.
21. Fillatreau S, Gray D, et al. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol* 2008;8(5):391-7.
22. Fisniku LK, Brex PA, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* 2008;131(Pt 3):808-17.
23. Franciotta D, Zardini E, et al. Interferon-gamma and interleukin-4-producing T cells in peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Eur Cytokine Netw* 2000;11(4):677-81.
24. Frisullo G, Nociti V, et al. IL17 and IFNgamma production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine* 2008;44(1):22-5.
25. Giovannoni G, Silver NC, et al. Immunological time-course of gadolinium-enhancing MRI lesions in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2000;44(4):222-8.
26. Gratwohl A, Passweg J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(9):869-79.
27. Havrdova E. *Neuroimmunologie*, Maxdorf 2001.
28. Havrdova E, Galetta S, et al. Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet Neurol* 2009;8(3):254-60.
29. Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991;1(2):97-105.
30. Jacobs LD, Cookfair DL, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39(3):285-94.
31. Kaloyannidis P, Sakellari I, et al. Acquired hemophilia-A in a patient with multiple sclerosis treated with autologous hematopoietic stem cell transplantation and interferon beta-1a. *Bone Marrow Transplant* 2004;34(2):187-8.
32. Kappos L, Bates D, et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol* 2011;10(8):745-58.

33. Kappos L, Li D, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 2011;378(9805):1779-87.
34. Killestein J, Kalkers NF, et al. TNFalpha production by CD4(+) T cells predicts long-term increase in lesion load on MRI in MS. *Neurology* 2001;57(6):1129-31.
35. Kozak T, Havrdova E, et al. High-dose immunosuppressive therapy with PBPC support in the treatment of poor risk multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(5):525-31.
36. Kreuzfelder E, Shen G, et al. Enumeration of T, B and natural killer peripheral blood cells of patients with multiple sclerosis and controls. *Eur Neurol* 1992;32(4):190-4.
37. Krumbholz M, Meinl I, et al. Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2008;71(17):1350-4.
38. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33(11):1444-52.
39. Lu JQ, Storek J, et al. Continued disease activity in a patient with multiple sclerosis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Arch Neurol* 2009;66(1):116-20.
40. Magliozzi R, Howell O, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007;130(Pt 4):1089-104.
41. Mancardi G, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7(7):626-36.
42. Medana I, Martinic MA, et al. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001;159(3):809-15.
43. Mirowska D, Skierski J, et al. Changes of percentages in immune cells phenotypes and cytokines production during two-year IFN-beta-1a treatment in multiple sclerosis patients. *J Neurol* 2003;250(10):1229-36.
44. Muraro PA, Douek DC, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med* 2005;201(5):805-16.
45. Nash RA, Bowen JD, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood* 2003;102(7):2364-72.
46. Pasagian-Macaulay AC, Aston E, et al. A dietary and behavioral intervention designed to lower coronary heart disease. Risk factors are unaffected by variation at the APOE gene locus. *Atherosclerosis* 1997;132(2):221-7.
47. Petereit HF, Pukrop R, et al. Low interleukin-10 production is associated with higher disability and MRI lesion load in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2003;206(2):209-14.
48. Poser CM, Paty DW, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13(3):227-31.
49. Putzki N, Baranwal MK, et al. Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. *Eur Neurol* 2010;63(5):311-7.
50. Saccardi R, Kozak T, et al. Autologous stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: update of the European Group for Blood and Marrow Transplantation autoimmune diseases working party database. *Mult Scler* 2006;12(6):814-23.
51. Sellner J, Boggild M, et al. EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. *Eur J Neurol* 2010;17(8):1019-32.
52. Selmaj K, Raine CS, et al. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 1991;147(5):1522-9.
53. Sharief MK, Thompson EJ. Correlation of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor with clinical activity of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56(2):169-74.
54. Schumacker GA, Beebe G, et al. Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1965;122:552-68.

55. Sun W, Popat U, et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire and myelin-reactive T cells reconstituted from autologous haematopoietic stem-cell grafts in multiple sclerosis. *Brain* 2004;127(Pt 5):996-1008.
56. Te Boekhorst PA, Lamers CH, et al. T-lymphocyte reconstitution following rigorously T-cell-depleted versus unmodified autologous stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(8):763-72.
57. Tintore M, Rovira A, et al. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology* 2006;67(6):968-72.
58. Traugott U, Lebon P. Interferon-gamma and Ia antigen are present on astrocytes in active chronic multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 1988;84(2-3):257-64.
59. Vachová M. Nová epidemiologická data u RS v ČR. 6. Olomoucké neuroimunologické symposium. Olomouc: 2010;36.
60. Villar LM, Garcia-Sanchez MI, et al. Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2012;69(2):191-7.
61. Voskuhl RR, Martin R, et al. T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity* 1993;15(2):137-43.
62. Weber F, Fontaine B, et al. IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations. *Genes Immun* 2008;9(3):259-63.
63. Weinshenker BG, Bass B, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 1989;112 (Pt 6):1419-28.
64. Wingerchuk DM, Lennon VA, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66(10):1485-9.
65. Zafranskaya M, Oschmann P, et al. Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis. *Immunology* 2007;121(1):29-39.

SOUHRN PRACÍ AUTORKY

A) PRÁCE S IF

Krasulová E, Trněný M, Kozák T et al. High-dose immunoablation with autologous haematopoietic stem cell transplantation in aggressive multiple sclerosis: a single centre 10-year experience. *Mult Scler* 2010;16(189):685-93. IF=4.230

Krasulová E., Trněný M. , Kozák T., Havrdová E. Autologní transplantace kmenových buněk a její současná role v léčbě roztroušené sklerózy. *Cesk Slov Neurol N* 2009;72/105:227-234. IF=0.393

Marečková H, Havrdová E, **Krasulová E**, Vaňková Z, Koberová M, Šterzl I. Natalizumab in the treatment of patients with multiple sclerosis: first experience. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:465-73. IF=1.930

Garren H, Robinson WH, **Krasulová E** et al. Phase 2 trial of a DNA vaccine encoding myelin basic protein for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2008;63:611-20. IF=8.717

Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Franciotta D, Frederiksen JL, Fleming JO, Furlan R, Hintzen RQ, Hughes SG, Johnson MH, **Krasulova E** et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009;73(22):1914-22. IF=4.633

Kopal A, Dostál V, **Krasulová E**, Ehler E. Akutní choreatický syndrom: kazuistika. *Cesk Slov Neurol Neurochir* 2007;70/103:336-9. IF=0.393

Krasulová E, Kemlink D, Horáková D et al. B-lymphocytes as a possible predictive marker in multiple sclerosis. – v recenzním řízení

Krasulová E, Valková V, Marková M et al. Favourable outcome in neuromyelitis optica patient after allogeneic stem cells transplantation. – v recenzním řízení

B) PRÁCE BEZ IF

Havrdová E, Horáková D, Kovářová I, **Krasulová E**. Future possibilities of the multiple sclerosis treatment. *Cas Lek Cesk* 2005;144(189):663-5.

Krasulová E, Havrdová E. Interferon beta a současná léčba relaps-remitentní roztroušené sklerózy mozkomíšní. *Remedia* 2007;17:560–567.

Krasulová E, Havrdová E. Současná léčba roztroušené sklerózy mozkomíšní. *Farmakoterapie* 2007;6:619-628.

Krasulová E, Havrdová E. Současná léčba relaps-remitentní roztroušené sklerózy a perspektivy do budoucna. *Klin Farmakol Farm* 2008;22(189):23-29.

Krasulová E, Havrdová E. Léčba relaps-remitentní roztroušené sklerózy mozkomíšní. *Neurol. pro praxi* 2008;9(4):218-222.

Krasulová E, Blahová Dušánková J, Havrdová E. Roztroušená skleróza – psychoneuroimunologické onemocnění centrálního nervového systému. *Psychiat. pro Praxi* 2009;10(190):67-71

Krasulová E. Léčba roztroušené sklerózy – současnost a trendy do budoucna. *Postgrad Med* 2011;13(189):8-14.

Krasulová E. Natalizumab v léčbě roztroušené sklerózy. *Remedia* 2011;5:409–411.

