

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**ROZTROUŠENÁ SKLERÓZA Z POHLEDU  
LABORATORNÍHO PRACOVNÍKA**  
**MULTIPLE SCLEROSIS – LABORATORY ASPECTS**

**Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2016**

**VENDULA LHOTÁKOVÁ**

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, PharmDr. Petru Jílkovi, CSc., za trpělivost, odborné rady i jeho čas, který mi po celou dobu vypracování této práce věnoval.

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.“

V Hradci Králové

Podpis:

## Obsah

1	Úvod.....	5
2	Zadání – cíl práce.....	6
3	Historie .....	7
4	Roztroušená skleróza – obecně .....	9
5	Predispoziční faktory RS .....	14
5.1	Genetická predispozice, molekuly HLA systému.....	14
6	Infekční příčiny .....	18
7	Neinfekční rizikové faktory prostředí .....	19
8	Hormonální status pacientů s RS .....	20
9	Patogeneze .....	22
10	Buněčná a humorální imunita.....	25
10.1	T-buňky a Treg buňky .....	25
10.2	Léze a zánět.....	27
11	Epidemiologie.....	29
12	Příznaky a symptomy .....	30
13	Průběh nemoci u RS .....	31
14	Psychické projevy RS.....	33
15	Vliv RS na fyzickou aktivitu .....	34
16	Klasifikace forem RS .....	35
17	Diagnóza RS .....	36
17.1	Klinická diagnóza .....	36
17.2	Laboratorní diagnostika.....	37
17.2.1	Analytické metody a jejich využití v praxi .....	37
17.2.2	Nejvýznamnější analytické metody u RS - obecně .....	40
17.3	Protilátky vyskytující se u RS .....	43
18	Léčba RS .....	45

18.1	Léčba akutní ataky RS .....	47
18.2	Léčba modifikující chorobu.....	48
18.3	Alternativní a symptomatická léčba .....	49
19	Prognóza.....	52
20	Závěr .....	53
21	Souhrn.....	54
22	Abstract .....	56
24	Seznam zkratk.....	58
25	Seznam obrázků a tabulek.....	61
26	Seznam literatury .....	62

# 1 Úvod

Onemocnění roztroušenou sklerózou (RS) jsem si vybrala především proto, že jde o poměrně závažnou chorobu postihující mladší populaci lidí. Přičemž více jsou ohroženy ženy než muži.

Ovlivňuje schopnost komunikace neuronů mezi sebou a postihuje tak centrální nervový systém (CNS) jako celek. U onemocnění RS lze očekávat jakékoliv neurologické symptomy, které následně mohou vést až k celkové invaliditě postiženého.

RS je zajímavé onemocnění nejen z pohledu neurologického, ale i po stránce imunologické zde nacházíme mnoho užitečných poznatků, které mohou přispět k lepší diagnostice a následné péči o pacienta.

## **2 Zadání – cíl práce**

Bakalářská práce je psána formou literární rešerše. Cílem práce je poukázat na neurologické onemocnění, a to především z imunologického pohledu. Snaha byla zjistit možná diagnostická kritéria nemoci, její psychické a fyzické projevy a zjistit možné biomarkery onemocnění.

Laboratorní část by měla poodhalit možné metodiky stanovení RS, též ukázat práci s biologickým materiálem.

Cílem je i zjistit možné rizikové faktory, které by mohly být užitečným přínosem pro lékaře v ambulantních poradnách.

### 3 Historie

Roztroušená skleróza (RS) je chronické autoimunitní onemocnění CNS. Dochází při něm k napadení myelinu za pomoci imunitního systému. Následně vznikají různé především neurologické symptomy.

Po celá léta byly studovány především příznaky, příčiny a průběh nemoci.(4)

Možnost odhalení roztroušené sklerózy byla prakticky nemožná. Horečka mohla značit jak banální onemocnění horních cest dýchacích, tak infekce či zhoubné bujení. Teprve nedávno byly odhaleny některé faktory spojeny právě s tímto vážným onemocněním.(1)

První zmínky onemocnění RS se datují do 14. století. Až ve 20. letech došlo ke zvratu v časně diagnostice této nemoci.(3) Někteří historici udávají jako první rozpoznatelný případ RS Svatou Lidwinu Holandskou, narozenou v roce 1380. Avšak velmi dobře popsané onemocnění RS se datuje do dob Augusta d'Este (1794 – 1848), který byl vnukem Jiřího III a bratranec královny Viktorie. V jeho pečlivě vedeném deníku zaznamenával průběh jeho onemocnění.(2)

Až v roce 1868 došlo k jasně popsanému onemocnění za pomoci francouzského neurologa Jean-Martin Charcota, který při pitvě zpozoroval zjizvenou tkáň na mozku, tzv. plaky.(4) V dalších letech pak docházelo ke zkoumání jak nemoci samotné, tak i k rozvoji terapie.(2)

Oficiálně byla RS uznána jako nemoc až v roce 1870. Tehdy Dr.Walter Moxen z Anglie a Edward Seguin z New Yorku pozorovali širokou škálu pacientů s neurologickými příznaky. Též bylo zdokumentováno, že nemoc postihuje častěji ženy než muže a že RS není jen geneticky podmíněna.(4)

V roce 1970 se zjistila souvislost s molekulami HLA-DW2 a HLA-DR2, které se ukázaly být specifické především u Evropanů a Severních Američanů.(12)

Posléze nastala snaha o léčbu nemoci. V roce 1990 byly Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schváleny první léky pro roztroušenou sklerózu, které spíše podporovali imunitní systém. V roce 1993 byl při léčbě RS prokázán dobrý účinek Interferonu  $\beta$ -1b (INF  $\beta$ -1b) a stal se tak první skutečnou terapií při



této chorobě. V roce 1998 prokázali evropské studie pozitivní odezvu INF  $\beta$ -1b i při léčbě sekundárně progresivní RS (SPMS).(3)

Poté následovaly úspěšné pokusy s IFN  $\beta$  -1a a s lékem Glatiramer acetátem.

V první polovině 20. století došlo k rozmachu lékařských objevů, které pomohly dále studovat průběh i příznaky nemoci. Kousky skládačky se však spojily až v roce 1935 a to díky Dr. Thomasu Riversovi z Rockefellerova institutu v New Yorku, který prováděl pokusy s laboratorními zvířaty. V roce 1940 vznikla nadace Národní společnost RS, která podporovala výzkum RS.

V roce 1960 bylo odhaleno, že imunitní systém napadá myelin na axonech a byla tak prokázána autoimunitní povaha onemocnění.

V roce 1980 vznikaly velké technologické pokroky, především pak zobrazovací techniky jako MRI (magnetická rezonance), které již vedly ke kvalitní diagnostice RS. Od roku 1981 už MRI byla prvotním diagnostickým vodítkem tohoto onemocnění.

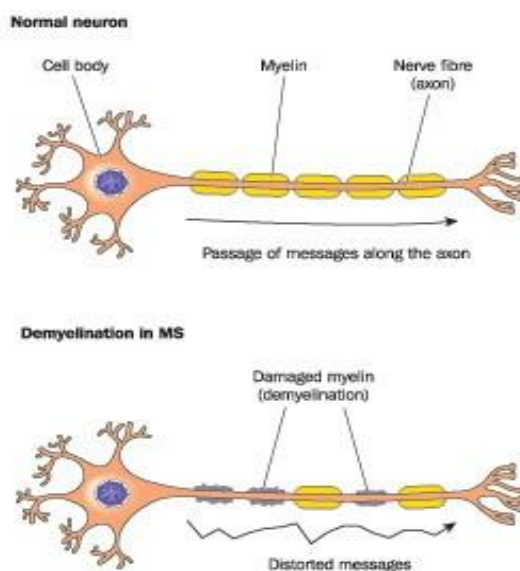
V roce 1990 se léčba RS opírala především o interferon. Ovšem od roku 2000 došlo k dalším poznatkům, které mohly pomoci předcházet onemocnění či minimalizovat účinky nemoci. Jednalo se především o účinek vitamínu D a o genetické predispozice onemocnění.

Výzkumy RS stále probíhají, jejich snahou je především včasná diagnostika nemoci a zlepšení úrovně života nemocných s RS.(4)

## 4 Roztroušená skleróza – obecně

Roztroušená skleróza (RS, anglicky: *Multiple sclerosis MS*) je především zánětlivé onemocnění mozku a míchy, kde fokální lymfocytární infiltrace vede k poškození myelinu a axonů (dlouhých neuronových výběžků). Axony jsou obaleny myelinem, který tvoří ochrannou vrstvu a urychluje vedení vzruchů.

Nejprve jde o zánět přechodný, poté dochází k demyelinizaci, která je trvalá. Patologické změny se stávají rozsáhlými a přecházejí v chronické neurodegenerace. Onemocnění je charakterizováno jako epizodická neurologická dysfunkce. Abnormality indikují distribuci zánětlivých lézí a ztráty axonů.(5)



**Obrázek 1 Porovnání zdravého a demyelinizovaného neuronu**  
(zdroj: www.shutterstock.com, Demyelination In Multiple Sclerosis,  
staženo: prosinec 2015)

Na vzniku RS byl prokázán též vliv životního prostředí a vyšší riziko RS bylo sledováno i u jedinců s rizikovými genetickými profily, jakými jsou např. zastoupení severní evropské populace, zastoupení žen a mužů nebo molekuly HLA II. třídy (viz níže samostatná kapitola 5. 1.).(5)

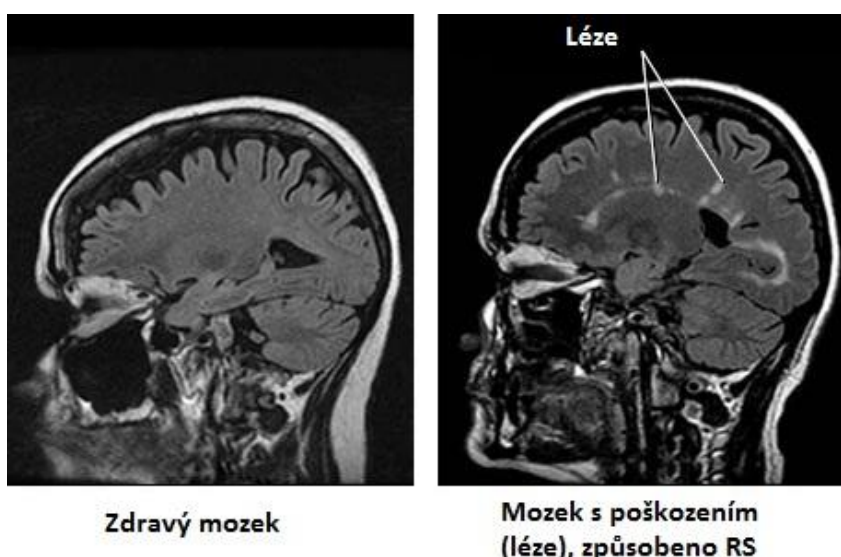
Dle nesčetných výzkumů se prokázal fakt, že prevalence RS v severní evropské populaci je vyšší než je tomu například u obyvatel jižní Austrálie či

Nového Zélandu.(21) Zároveň byla dokázána větší náchylnost k onemocnění RS u žen oproti mužům, a to v poměru 2:1 (některé zdroje hovoří dokonce o poměru 3:1).(5)

Průměrný věk nástupu RS je mezi 28. – 30. rokem života u žen, muži pak v průměru asi o jeden až dva roky déle než ženy.(6)

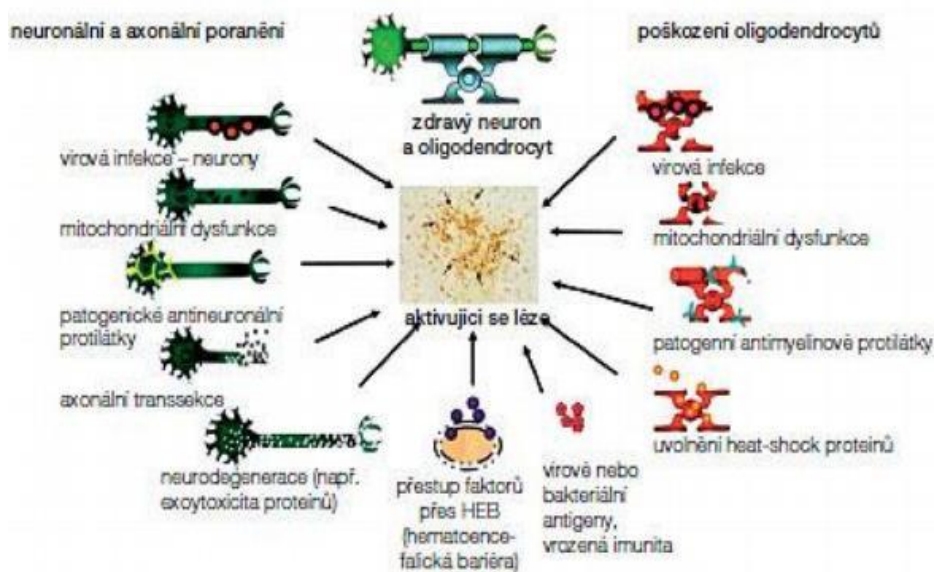
Zjistilo se, že nové epizody RS přicházejí chaoticky. Symptomy RS se hromadí a následně dochází asi u 65 % pacientů k přeskočení do sekundární progresivní fáze, přičemž asi u 20 % pacientů je progresivní od začátku onemocnění.

Klinický obraz RS je ve většině případů dostatečným prvotním kritériem pro včasné stanovení diagnózy. Laboratorní výsledky vykazují abnormality bílé hmoty mozkové, a to u více jak 95% pacientů. Pro správné určení diagnózy musí být provedena celá řada vyšetření (viz. kapitola 17.). Téměř 80 % pacientů přichází s akutní atakou, prvním neurologickým problémem nazývaným klinicky izolovaný syndrom (CIS). Jak již bylo uvedeno v kapitole 3., hlavní diagnostiku RS zahrnuje především vyšetření magnetické rezonance (MRI – radiologická zobrazovací metoda). Díky této metodě lze sledovat míru demyelinizace, následně relaps-remitentní RS a posléze lze odhadnout i míru atrofie mozku.(5)



**Obrázek 2 Porovnání zdravého mozku oproti mozku s lézemi u RS**  
(www.florence.cz, Pacientům s roztroušenou sklerózou chybí komplexní péče, staženo: prosinec: 2015)

Klinický obraz se obvykle vyvíjí v průběhu několika desítek let. Jak již bylo podotknuto, více ohroženy onemocněním jsou ženy. Míra recidivy se snižuje během každého trimestru těhotenství, ale trojnásobně se zvyšuje v šestinedělí, a to především u žen, u kterých RS byla aktivní rok před otěhotněním (viz. kapitola 8). Riziko recidivy se též zdvojnásobuje po virové expozici, a to zejména u zánětů horních cest dýchacích a gastrointestinálních infekcí. Jako zvyšující se riziko rozvíjející se RS byla prokázána především infekce způsobená virem Epstein-Barrové. Je zde spojitost mezi virem Epstein-Barrové a vlastním proteinem, a to taková, že imunitní odpověď proti viru neúmyslně zkříženě reaguje s myelinem a indukuje tak demyelinizaci. Etiopatogeneze naznačuje, že B – buňky tvoří protilátky při infekci virem Epstein-Barrové, respektive hladiny protilátek korelují s aktivitou nemoci. Naopak se sleduje, že u parazitárních onemocnění dochází k jakési ochraně před aktivitou nemoci, kdy se předpokládá možná podpora T-regulačních buněk.



**Obrázek 3 Souhrn možných spouštěcích faktorů RS, uvedeno dle Van der Valk, P., Amor, S. (zdroj: zdravi.euro.cz, Komplexní léčba roztroušené sklerózy mozkomíšní, staženo: leden 2016)**

Globální distribuci RS lze velmi dobře zobecnit v závislosti na vzdálenosti severního a jižního pólu, kdy častější výskyt nemoci je pozorován u severoevropanů a naopak snížený výskyt je popisován u jihoafričanů a asiátů, to samozřejmě s ohledem na migraci obyvatelstva. Životní prostředí je tedy

jedním z kritérií pro rozvoj RS, především lze uvést nedostatek vitamínu D, stravu, geomagnetismus, látky znečišťující ovzduší, radioaktivita hornin, též cigarety a toxické látky. V neposlední řadě je na místě uvést genetiku, která je spojena s rozvojem onemocnění. RS má rodinou recidivu kolem 20 %. Souvislost s rozvojem RS lze přisoudit antigenům HLA, kteří patří k hlavnímu komplexu tkáňové slučitelnosti (major histocompatibility complex – MHC). Především se jedná o skupinu HLA II.třídy, a to DR a DQ odpovídající haplotypům DRB1\* 15:01, DRB5 \*01:01, DQA1 \*01:02 a DQ 82\* 06:02.

Proces onemocnění začíná se zvýšenou migrací autoreaktivních lymfocytů přes hematoencefalickou bariéru. Přičemž přechod z fyziologického dohledu na patologické kaskády vychází z regulačních vad a následně dochází k imunitní reakci v mozku. V patogenezi roztroušené sklerózy hrají ústřední roli T-lymfocyty. Prokázány u lézí RS byly T-lymfocyty CD4+ a CD8+.(7) T-buňky CD4+ jsou časté u akutních lézí a T-buněk CD8+, jsou častěji pozorovány u chronických lézí. Myelin specifické CD4+ T-lymfocyty mohou být jedním z mechanismů, které spouštějí rozvoj RS. Podobný účinek je u CNS-reaktivních CD8+ T-buněk, které unikly imunologickému dohledu organismu.(8) T-buňky se nacházejí ve všech čtyřech popsanych histopatologických subtypů RS. Klíčová role je přisuzována T-lymfocytům vylučujícím interleukin 17 (IL-17), což je cytosin zvyšující produkci chemokinů, vyvolávající přesun monocytů a neutrofilů do míst zánětu. Některé interferony jsou též využívány k léčebným účelům. K interferonům, které jsou s RS úzce spjaty patří interferon  $\gamma$ , podporující recidivu RS, zatímco interferon  $\beta$  snižuje frekvenci relapsů. (9)

Po neurologické stránce se k diagnostice RS využívá mnoha vyšetření. Pomyslnou pomocnou rukou je výsledek mezinárodního týmu odborníků, kteří sestavili panel pro lepší diagnostiku RS. Kritéria označujeme jako tzv. McDonaldova kritéria. Zahrnují klinická i paraklinická laboratorní vyšetření. Součástí vyšetřovacích metod je i prokazatelnost T2 lézí v čase (DIT) i prostoru (DIS). Kritéria jsou však vhodná především u pacientů přicházející s tzv. klinicky izolovaným syndromem (CIS).(10) Diagnostická kritéria vyžadují zvláštní pozornost u dětí, kde je riziko akutní roztroušené encefalomyelitidy (ADEM). Vyšetření mozku a míchy pomocí magnetické rezonance (MRI) je dnes již naprostým standardem, obdobně jako je tomu u vyšetření neuromyelitis optika

(NMO).(11) Dobré je též sledování akutních demyelinizací příhod a v neposlední řadě velmi vhodné vyšetření vizuálních evokovaných potenciálů (VEP).(10)

U většiny pacientů dochází ke zdravotním komplikacím, jako jsou zejména infekce kůže, hrudníku a močového ústrojí.

Střední doba smrti je asi 30 let od nástupu nemoci, což představuje snížení délky života o 5-10 let. (5)

## 5 Predispoziční faktory RS

### 5.1 Genetická predispozice, molekuly HLA systému

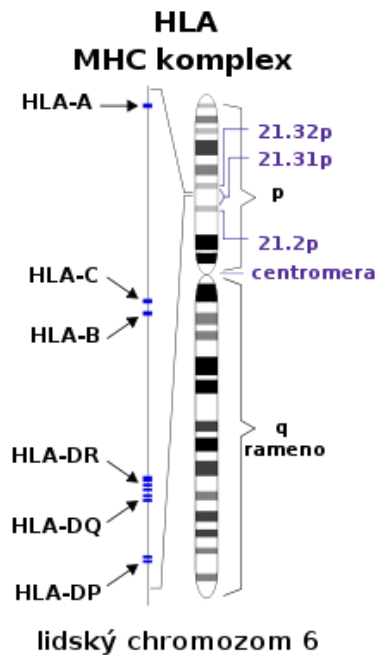
Mnohé studie se zabývají imunogenetickým pozadím predisponujícím k RS. Byly zkoumány molekuly HLA systému, jejich vliv na onemocnění RS a pravděpodobnost výskytu u příbuzných - další generace pacientů s RS.

RS vykazuje komplexní potíže, které jsou spojeny s poruchou chůze, ztrátou zraku, křečemi a únavou. Riziko RS je pro jednotlivce dáno především geny, zatímco riziko populace je ovlivněno životním prostředím.

Ukázalo se, že dědičnost je úzce spojena s HLA systémem, který souvisí s imunitní odpovědí lidských leukocytů. Konkrétně se studie zaměřily na HLA molekuly II. třídy s alelami DQ a DR.<sup>(12)</sup> Konkrétně se jedná o haplotyp HLA DRB1 \* 1501, \*0102 DQA1, DQB1 \* 0602, T-buněčný receptor a na geny imunoglobulinových genů. V dědičnosti RS se ukázaly jako stěžejní právě molekuly HLA. Nejprve byla prokázána souvislost dědičnosti s HLA antigeny I. třídy, a to agA3 a agB7, následně bylo dokázáno spojení RS s HLA II. třídy, a to především u haplotypu HLA DRB1 \* 1501, DQA1 \* 0102 a DQB1 \* 0602.<sup>(6)</sup>

Genetická vnímavost RS je jasně spojena s HLA systémem, který je umístěn na chromozomu 6p21 a 17q22.<sup>(14)</sup> Zatímco HLA DRB1 \* 1501 je spojen především s rozvojem rizika RS, molekula DRB5 se ukázala jako možné riziko pro progresi lidských demyelinizačních chorob. Všechny shromážděné údaje ukazují, že DRB1\* 1501 nejen zvyšuje pravděpodobnost výskytu onemocnění RS, ale usnadňuje rozvoj T2 lézí, čímž zvyšuje možnost poškození axonů s následnou degenerací neuronů. Následkem pak může být až atrofie mozku.<sup>(15)</sup> Vnímavost k RS byla také odhalena u HLA DR2.<sup>(16)</sup> Mapovací studie prokázali, že výskyt HLA DRB1 \* 1501, DQA1 \* 0102 a DQB1 \* 0602 byl ve většině populace s RS, výjimku tvořili pacienti ze Sardinie, kde byla spojitost s DR3 a DR4 a u asijské populace nebyl nalezen žádný vztah k DR2.<sup>(17)</sup> RS je zjevně společnou chorobou pro mladé dospělé v severní Evropě, Severní Americe a Austrálii, ale ne pro obyvatele arabské, africké a obyvatele Indie, kde je výskyt RS nižší, i když musíme vzít v potaz migraci obyvatel.<sup>(18)</sup> Prokázán

byl výskyt kombinace DQB1 \* 0201 a DRB1 \* 0301 alely u afrických Američanů. Stejně tak byla zjištěna souvislost s HLA DR2 a DR3.(17) Stanovení HLA lokusů se provádí pomocí neradioaktivních PCR technik (polymerázová řetězová reakce) založených na sekvenčně specifických oligonukleotidových sondách.



**Obrázek 4** Přehled umístění HLA I. a II. třídy na lidském chromozomu 6, změny na chromozomu mohou zvyšovat pravděpodobnost výskytu RS (zdroj: *en.wikipedia.org*, Human leukocyte antigen, staženo: únor 2016)

Bylo zjištěno, že HLA molekuly přispívají asi 20% k celkové genetické náchylnosti pro RS.(13)

Predispozice RS byla prezentována na rodinných studiích, které prokazují míru dědičnosti. Také studie, které proběhly na pacientech v Německu potvrzují genetickou náchylnost k rizikovým alelám. Celkem bylo v Německu provedeno 1700 analýz s 395 zdravými kontrolními vzorky.(19) Riziko RS se projevilo u jednovaječných a dvouvaječných dvojčat, sourozenců, kteří mají shodné oba biologické rodiče i u sourozenců jen s jedním společným biologickým rodičem. Také příbuzní jako jsou bratřenci či sestřenice nebyli z tohoto rizika vyjmuti.



Je patrné, že blízcí příbuzní postižené osoby mají zvýšené riziko rozvoje RS. Obecně lze konstatovat, že dochází ke zvýšení rizik RS mezi prvním a druhým stupněm příbuznosti a samozřejmě i mezi druhým a třetím stupněm příbuznosti. (22)

Zvýšené riziko rozvoje RS je u sourozenců postižených jedinců uváděno kolem 3 – 5 %. (14)

Celoživotní riziko RS v obecné populaci je asi 1 z 1000. U dětí s postiženým jedním rodičem je riziko asi 2 %, u dětí s postiženými obou rodičů je pak ještě vyšší. Riziko se dále zvyšuje na asi 5 % u dvouvaječných dvojčat a asi na 25 % u dvojčat jednovaječných.

Jak se prokázalo, RS je v první řadě určena geny a ne sdílením familiárního prostředí, i když je dobré podotknout, že riziko populace může být ovlivněno životním prostředím. Rodinné studie se zaměřili na studium genů. To se ukázalo být přínosné především pro zjištění genových markerů RS. (20)

Úzce spojen s imunitní odpovědí je tumor nekrotizující faktor (TNF), který může být také potenciálním kandidátem pro rozvoj RS. Použitím rozpustného TNF receptoru se prokázal výrazný vliv na aktivitu onemocnění. Jeho zvýšená hladina v CSF i v séru byla u pacientů s RS jasně prokázána, což naznačuje, že TNF je důležitou složkou v patogenezi RS. (31)

Dalším poznatkem je potenciální nezávislá role tzv. AGER receptoru (receptor pro Advanced Glycation End products - AGE), nazývaného také rozpoznávací receptor. Je přítomen např. na lymfocytech, mononukleárních fagocytech a na vaskulárních endoteliálních buňkách. Jde o transmembránový receptor rodiny imunoglobulinů, který uskutečňuje pokročilé glykace konečných produktů. V důsledku zvýšené koncentrace různých ligandů, které se podílí na oxidativním stresu, může docházet k poškození tkání. Především se tak děje důsledkem neenzymatické glykace proteinů, lipidů, nukleových kysel, kdy dochází ke vzniku produktů pokročilé glykace. Tyto procesy mají vliv na rozvoj onemocnění jako je Alzheimerova choroba, cukrovka či amyotrofická laterální skleróza. Přímá role AGER u RS nebyla ještě zcela prokázána, ale důkazy ze studií naznačují jeho účast při aktivaci MBP (myelinový bazický protein),

reaktivních T-buněk CD4+. Blokací AGER se zlepšuje onemocnění tak, že zabraňuje pronikání T-buněk do CNS. Proto se zdá být AGER věrohodným kandidátem v pokroku u autoimunitních nemocí jako je např. RS. (24)

## 6 Infekční příčiny

Roztroušená skleróza je vedena jako autoimunitní stav. Může být ovlivněna faktory životního prostředí, a tedy i bakteriemi a viry. Uvedený poznatek se odvíjí od skutečnosti, že asi 90 % pacientů s RS má v mozkomíšním moku vysoké koncentrace IgG. Navíc je zřejmé, že nesprávná funkce imunitního systému je spouštěna silnou imunitní reakcí v těle jedince.

I když důkazů o zvýšeném riziku RS vůči virovým a bakteriálním faktorům přibývá, přesto vědci dosud neidentifikovali žádný jasně daný spouštěč tohoto onemocnění.

K dalším důkazům podporující teorii ovlivnění RS virem je demyelinizační encefalomyelitida, což dokládají i pokusy na zvířatech infikovanými viry. Tyto experimenty se využívají především u výzkumů RS.

Řada studií prezentovala fakta, která naznačují, že jedním z možných virů ovlivňujících rozvoj RS může být virus Epstein-Barrové. Prokázalo se, že lidé s vyšší úrovní protilátek proti EBV mají vyšší pravděpodobnost výskytu RS a naopak, že u lidí, kteří nikdy nepřišli do styku s EBV se RS nikdy nerozvine.

Také vědci z Austrálie zjistili spojitost s viry a potvrdili domněnku, že lidský herpes virus 6 (HHV – 6) se může podílet jak na rozvoji RS, tak na vyšším riziku relapsu.

Mezi dalšími možné činitele rozvoje onemocnění RS se řadí *Clostridium perfringens* typ B. Bakterie produkuje toxin, který způsobuje poškození myelinu. Studie napovídají, že toxin může být potenciálním spouštěčem RS. (26)

Další patogen, který byl spojen s RS je *Chlamydomphila pneumoniae*. Bakterie způsobuje infekce dýchacích cest a může následně vést k chronickým onemocněním a to včetně RS. Mikrob byl identifikován v mozkomíšním moku u některých nemocných RS. (23)

V současné době probíhají dva hlavní projekty zaobírající se otázkami vztahy k RS. První z nich je zaměřen na systémové infekce (např. nachlazení), druhý projekt se věnuje problematice viru Epstein-Barrové. (26)

## 7 Neinfekční rizikové faktory prostředí

Spojení s RS se předpokládá u genu HLA DRB1 \* 15 a deplecí vitamínu D. Vitamín D je hormon syntetizovaný v kůži, též je možné ho získat potravou. Podíl ve stravě je však mnohem menší než právě syntéza v epidermis pomocí UV záření.(27) Vitamín D vzniká ze 7-OH cholesterolu, následně je dvakrát hydroxylován a to v játrech a v ledvinách právě na formu 1, 25-dihydroxyvitamin D3, tedy vitamín D. Analýzy provedené pomocí průtokové cytometrie prokázaly specifické zvýšení povrchové exprese HLA DRB1 po přidání vitamínu D. Zjistila se tak přímá funkční interakce s hlavním lokusem určující genetickou náchylnost.(28)

Těmto poznatkům jde vstříc i fakt zeměpisného rozšíření nemoci, kdy sluneční záření je nutné pro tvorbu vitamínu D a hraje tak v populační etiologii významnou roli. Snížit prevalenci RS či závažnost choroby lze i stravou bohatou na ryby, tedy na vitamín D. Tuto myšlenku podporuje i skutečnost, že je velmi častý nedostatek vitamínu D u pacientů s RS. Vitamín D může být dobrým inhibítozem RS. (27)

## 8 Hormonální status pacientů s RS

Delší dobu je známý fakt, že ženy jsou více náchylné k onemocnění RS než muži. Dokázán byl pokles aktivity RS u těhotných žen v posledním trimestru těhotenství. Toto naznačuje, že steroidní hormony mohou mít vliv na citlivost i samotný průběh onemocnění.(29)

Studie potvrzují jednak ochranný účinek testosteronu, jednak vliv estradiolu v poslední fázi těhotenství. (30) Podobné účinky lze pozorovat i u estriolu.(33)

Studie ukazují na průměrnou míru recidivy rok před otěhotněním, kdy udávají  $0,7 \pm 0,9$  na jednu ženu za rok. V prvním trimestru těhotenství to je  $0,5 \pm 1,3$ , ve druhé triádě to je  $0,6 \pm 1,6$  a v průběhu třetího trimestru pak  $0,2 \pm 1,0$ . Vzrůst aktivity RS byl pozorován i u žen v prvních třech měsících po porodu a to na  $1,2 \pm 2,0$ . Následně došlo k vrácení stavu před těhotenstvím. (29)

Prokázalo se, že estradiol může hrát roli při regulaci rovnováhy mezi prozánětlivými a protizánětlivými cytokiny. Díky důkazu, že pohlavní hormony mohou mít vliv na průběh RS se staly steroidní hormony terčem dalších výzkumných analýz (např. estron, estriol a progesteron). Účinek na sekreci TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  byl potvrzen i u všech tří estrogenů. U progesteronu se zvyšovala sekrece IL-4. To naznačuje diferenciální účinek steroidních hormonů na vylučování cytokinů pomocí T-buněčných klonů CD4+ a zároveň zde dochází k podpoře domněnky, že podporují protizánětlivé podmínky. Prokázán byl i dobrý účinek estriolu u experimentální autoimunitní encefalomyelitidy i u kolagenem indukované artritidy.(31)

Stejně jako je tomu v době těhotenství, tak i v době menstruačního cyklu žen dochází k ovlivnění průběhu RS.(35) Dotazované ženy postižené RS, uváděly pravidelné zhoršení jejich symptomů v období těsně před či na začátku menstruace. Naproti tomu postižené ženy, které užívaly antikoncepci, nevykazovaly zhoršení symptomů u RS v premenstruačním období, což jasně naznačuje ochranný účinek hormonů. Pohlavní steroidy tedy mají imunologické účinky při prevenci či léčbě experimentální encefalomyelitidy a též se projevil pozitivní účinek na myelinizaci a demyelinizaci periferních i CNS neuronů.(34)

Je patrné, že estrogeny a progestiny mohou být základem pro nové terapeutické postupy, neboť oba typy hormonů se podílejí na životaschopnosti neuronů a tvorbě myelinu. (36)

## 9 Patogeneze

Jak již bylo výše popsáno, RS je demyelinizační chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění CNS. Přesná etiologie RS není známá a proto i léčba RS je náročná. Progrese onemocnění může nakonec vést až k těžkému postižení nemocného.

Primární příčinou je zánět CNS, přičemž specifické prvky nejsou prozatím zcela objasněny. Etiologie a patogeneze RS byla diskutována posledních 50 let. Dnes je známo, že jde o komplexní onemocnění s různými klinickými i patologickými fenotypy.(45)

Jedním z faktorů ovlivňujících vývoj RS je genetika, dále pak environmentální a infekční agens. Studie provedeny na zvířecím modelu RS, známé jako EAE (experimentální autoimunitní encefalomyelitida) zjistili několik základních bodů v imunitním systému - několik drah vedoucích k tvorbě onemocnění RS. Pro pochopení těchto cest je nezbytné nejprve pochopit některé základní body imunitního systému u RS.

Existují dva hlavní typy imunitní odpovědi. Jedná se o přirozené a adaptivní imunitní odpovědi. Vrozená imunitní reakce je iniciována mikrobiálními produkty, které aktivují specifické receptory, zejména Toll – like receptory (TLR). Aktivace specifických podmnožin TLR se provádí molekulami patogenů, které jsou jedinečné pro různé skupiny patogenů. Vazba těchto molekul na TLR vede k produkci cytosinů, které modulují adaptivní imunitní odpověď. Ovlivnění efektorové funkce T-buněk a B-buněk hraje roli jak v iniciaci, tak v progresi RS. Kupříkladu, když jsou aktivovány TLR, dendritické buňky se stávají „polozralé“ a indukují regulační T-buňky k produkci inhibičních cytosinů, jako jsou IL-10 a TGF-p. Dendritické buňky dále zrají, začnou polarizovat CD4+ a T-buňky se začnou diferencovat buď do Th1, Th2 či Th17. Pokud se T-buňky diferencují na Th1, je zánět podporován.(47)

Studie prováděné pomocí modelu EAE naznačují, že glatiramer acetát může aktivovat monocyty, které podporují tvorbu Th2 buněk a vývoj regulačních T-buněk, které pak působí proti zánětu.(46) Adaptivní reakce je zahájena předložením specifického antigenu T-lymfocytům od buněk prezentující antigen

(APC). Do této skupiny se řadí B-buňky, dendritické buňky, makrofágy a mikroglie. Interakce mezi APC a T-buňkami je hlavní složkou zahájení adaptivní imunitní odpovědi.(47)

Některé typy T-buněk a to včetně CD4+ a CD8+ mohou být aktivovány pomocí APC. Efektorové buňky Th1, Th2 a Th17 jsou aktivovány konkrétními interleukiny a zároveň specifické interleukiny vylučují. Cytokiny produkované Th1 buňkami jsou prozánětlivé, zatímco Th2 buňky vylučují protizánětlivé cytosiny. Stejně jako Th1 i skupina Th17 podporují zánět u RS. Receptory IL-17 jsou vidět u akutních a chronických plaků RS.

Obě skupiny těchto buněk migrují do CNS s následnou demyelinizací a axonální ztrátou. Regulační T-buňky (Treg) se podílí na patogenezi RS, přičemž počet Treg je stejný u pacientů a kontrolní skupiny RS, avšak u pacientů s RS vykazují sníženou funkci. Studie prokázali, že glatiramer acetát může zvýšit funkci Treg tím, že zvyšuje expresi CD4+, CD25+, FoxP3, CD31+ T-buněk. T-buňky CD8+ jsou přítomny u lézí RS a mohou mít regulační funkci při progresi onemocnění. Tyto buňky také potlačují proliferaci CD4+ buněk za pomoci sekrece perforinu, tedy působí inaktivačně. Buňky CD8+ podporují též vaskulární permeabilitu a způsobují smrt oligodendrocytů i gliových buněk. Celý tento výčet lze pozorovat právě u onemocnění RS.

Naproti tomu B-buňky se stávají plazmatickými, schopnými tvořit protilátky. Přítomnost protilátek v mozkomíšním moku pacientů s RS označujeme jako oligoklonální skupinu. Skupina B-buněk produkuje kromě těchto protilátek i protizánětlivé cytokiny.(46)

Patologickým znakem RS jsou plaky zánětlivé demyelinizace CNS. Zničení myelinu je znakem plaku, i když se plak nevyznačuje pouze ztrátou myelinu. Klasifikace plaku je založena na časové progresy i stupni zánětlivého poškození. Patologické funkce CNS jsou odrazem výskytu plaků.

Akutní plaky RS představují nejranější fázi tvorby lézí. Typickými znaky akutního plaku jsou špatně definovatelné okraje se ztrátou myelinu, infiltrace imunitních buněk a parenchymový edém. Imunitní buňky jsou zde zastoupeny především lymfocyty, monocyty a makrofágy.



Chronické plaky se vyznačují především ztrátou myelinu a gliálním zjizvením. Histologicky jsou hranice lézí výraznější, než je tomu u plaků akutních. Přítomnost protilátek a komplementu je také výraznější u chronických aktivních lézí. Chronické tzv. němé léze se vyznačují ztrátou zánětlivých znaků podél hranice chronických aktivních lézí a jsou doprovázeny úplnou ztrátou oligodendrocytů a sníženou hustotou axonů. (47)

## 10 Buněčná a humorální imunita

Jedním z mnoha námětů pro studie RS je buněčná a humorální odpověď. Po podávání různých léků se sleduje odpověď organismu na danou léčbu a tvorba protilátek. Buněčná imunita je pak představována B-lymfocyty a T-lymfocyty, NK buňkami apod. Humorální imunita se prokazuje pomocí přítomností oligoklonálních IgG pásů a pomocí IgG indexu.

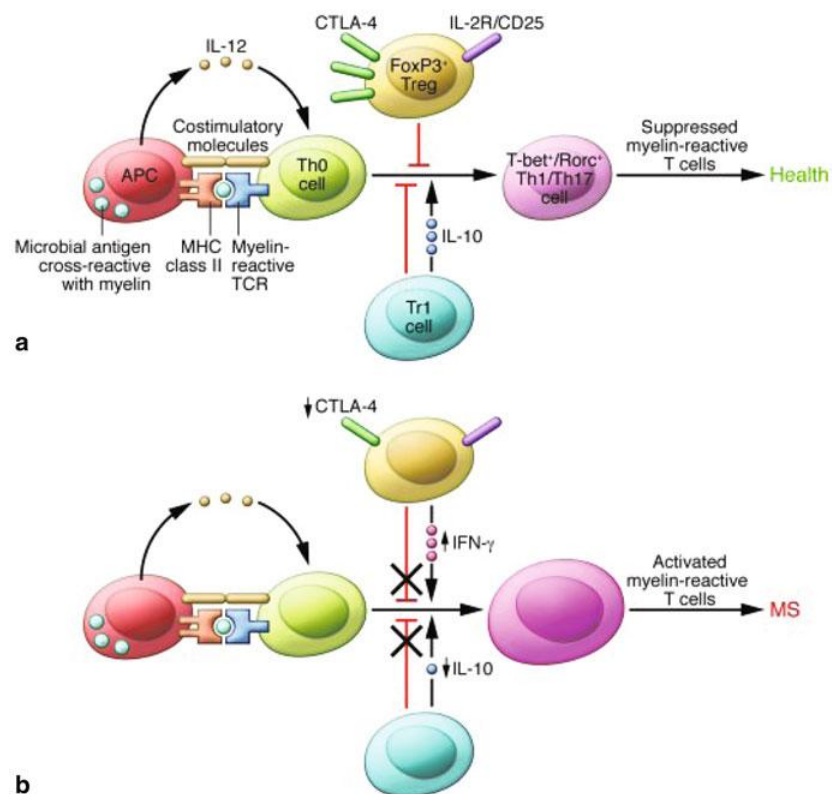
U pacientů s RS byla zaznamenána humorální a buněčná odpověď při léčbě pomocí kopolymeru 1 (glatiramer). Zde všichni pacienti vyvinuli reaktivní Ab, které měly vrchol po 3 měsících léčení. Proliferační odezva mononukleárních buněk periferní krve byla zpočátku vysoká a postupně se snižovala. Došlo k tvorbě IgG1 a IgG2 Ab, přičemž IgG1 protilátky byly vyšší než IgG2. Avšak Ab a reakce T-lymfocytů na MBP byly nízké a ani v průběhu léčby se výrazně neměnily. U pacientů léčených interferonem nebyla buněčná odpověď zcela potvrzena. (66)

### 10.1 T-buňky a Treg buňky

Patologie RS se z velké části může připsat autoreaktivním efektorovým T-buňkám, které pronikají hematoencefalitickou bariérou a dostávají se do CNS. U zdravých jedinců mohou regulační T-buňky (Treg) řídit potencionální patogenní autoreaktivní T-buňky. Buňky Treg u pacientů s RS vykazují nedostatečné regulační schopnosti. Skutečnost, že autoreaktivní T-buňky jsou nalézány v krvi zdravých jedinců, aniž by došlo k autoimunitnímu onemocnění, ukazuje na dostatečnou kontrolu imunitní odpovědi organismu. Buňky Treg jsou klíčovými regulátory imunitní homeostázy.(69) Aktivní potlačení regulačními Treg buňkami hraje zásadní roli při regulaci T-buněk a periferní toleranci in vivo. Funkce Treg buněk u RS in vivo je snižena. Treg buňky byly definovány jako CD4+ CD25+ FoxP3+ T-buňky, které jsou schopny modulovat imunitní funkci různých efektorových buněk. Populace CD4+ CD25+ FoxP3+ Treg buněk se skládá ze dvou subpopulací a to přirozeně se vyskytující (nTreg) a vyvolané či indukované Treg (iTreg). Diferencované subpopulace buněk Treg mohou být identifikovány na základě hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) II. třídy (kam řadíme např. DC, DR, DQ alely). MHC-DR+ Treg buňky exprimují vysoké hladiny FoxP3 a představují asi 20–30 % lidských Treg buněk. Transkripční

faktor Forkhead Box P3 (FoxP3) je zásadní pro imunitní homeostázu. Byl stanoven jako specifický marker pro Treg u myši a jako buněčný povrchový marker lidských buněk Treg. V mnoha studiích prováděných právě na myších byla pozorována závada na funkci genu pro FoxP3. Následně docházelo především k defektům na kůži, gastrointestinální krvácení, hepatosplenomegalii a k těžké anémii.

Kromě modulace funkce CD4+ T-buněk, Treg regulují i jiné imunitní buňky, jako jsou např. CD8+ T-buňky, B-buňky a NK buňky (přirození zabíječi). Síla stimulace T-buněk ovlivňuje, zda dojde k potlačení či proliferaci. V průběhu aktivace buněk produkující IL-17 je nutná přítomnost IL-1 $\beta$  a IL-6. Role FoxP3+ Treg buněk v imunitní regulaci u zdravých jedinců a nemocných RS, stejně jako modulace imunitní funkce Treg prostřednictvím potlačení aktivace, proliferace a cytosinů a následné možné ovlivnění dalších buněk je dobře znatelné na Obr. č. 5.(67)



**Obrázek 5 Ovlivnění buněk pomocí T-reg buněk u zdravých a nemocných RS**  
(zdroj: B. B. Gawlik and D. A. Hafler, www.springer.com, Regulatory T Cells in MS, staženo: květen 2016)

Kapacita Treg buněk u pacientů s RS je snížena a navíc tyto buňky vykazují efektorové T-buněčné funkce, jako je produkce IFN- $\gamma$ . Bylo zjištěno, že Treg se nepodílejí na vzniku relapsů u RS, spíše reagují na zánět. Jejich prioritní snahou je obnova hemostázy.(68)

Autoreaktivní T-buňky rozpoznávající myelinový antigen jsou přítomny v krevním oběhu. Aktivace T-buněk je nezbytná pro indukci autoimunitního onemocnění.

U zvířecího modelu RS (EAE) se prokázalo že, T-buňky specifické pro vlastní antigeny zprostředkovávají u tohoto onemocnění patologické změny. Buňky Th1 byly dosud považovány za hlavní efektorové buňky zodpovídající za autoimunitní zánět. Patogenní roli u autoimunitních i chronických zánětlivých stavů sehrávají i T-buňky CD4+ vylučující IL-17. (70)

Činnost Treg buněk se ukazuje jako dobrá volba ve vývoji terapie RS.

## 10.2 Léze a zánět

Samotný název RS je pojmenován z řeckého slova *skleros* (tuhý, zjizvený), vychází tak z mnoha jizev – lézí vyskytující se v mozku a míše. Axonální léze RS mohou způsobit trvalé neurologické dysfunkce. Neurologická poškození u pacientů s RS jsou v korelaci s atrofií míchy a mozkové kůry mozečku. Léze nacházející se v bílé hmotě mají patologický vliv na funkci axonů, což je patrné i na řezech mozku při 3D zobrazení.(49)

V dnešní době rozeznáváme sedm různých druhů lézí. Nejčastěji se nacházejí u kortikálních žil. Malé kortikální léze jsou u RS poměrně časté a jsou viditelné na MRI. Léze jsou přímo spojeny s neuropsychologickými deficity, epilepsií či depresemi.(48)

Na MRI jsou vidět znatelné poruchy hematoencefalitické bariéry. Na poškození myelinu se podílejí mediátory zánětu nervů blokující vedení v uzlech, ale i buněčné efektorové mechanismy. Tyto procesy do jisté míry ovlivňují i závažnost i trvání klinických příznaků. Dobrá reakce na kortikosteroidy u akutních recidiv dokazuje, že ústředním bodem procesu onemocnění je zánět.(50)

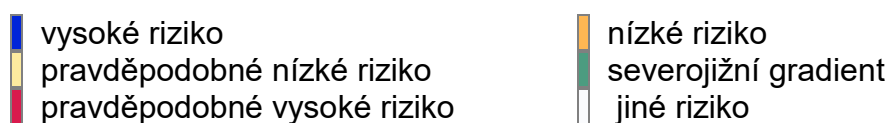
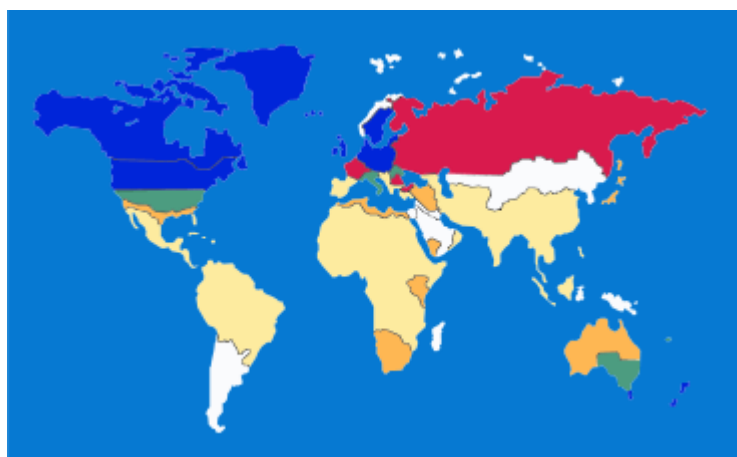
Některé studie ukazují, že u progresivní RS může docházet k neurodegeneraci nezávisle na zánětu.

Zánět v mozku je přítomen nejen u akutních a recidivujících stavů, ale též u primárních i sekundárních progresivních nemocí. Infiltráty T-buněk a B-buněk korelují s aktivitou demyelinizačních lézí.

U pacientů s RS byla zjištěna souvislost mezi zánětem a axonálním poraněním.(51)

## 11 Epidemiologie

Rizik onemocnění RS je mnoho. Shrňeme-li ty nejdůležitější, bude se jednat právě o genetickou predispozici, která má na vzniku onemocnění převážnou část. Značnou roli však hraje i geologické rozmístění obyvatel (obr. č. 6).



**Obrázek 6** Mapa světa, která ukazuje incidenci RS, která je závislá na vzdálenosti od rovníku (zvyšuje se)

(zdroj: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MS Risk no legend.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MS_Risk_no_legend.svg), staženo: červen 2016)

Se spojením geologického rozmístění souvisí i tvorba vitamínu D, který se ukázal jako možný budoucí inhibitor RS.(37) Podobně jako nedostatek vitamínu D, může působit nepříznivě i špatná strava, ovzduší, radioaktivita, ale i např. geomagnetismus.(38)

Geologická mapa obyvatel, jejich způsob života (životospráva, životní podmínky apod.) mají do jisté míry vliv na rozvoj RS.

Za zmínku jistě stojí i „hygienická hypotéza“, která ukazuje na vliv infekčních činitelů v dětském věku, které mohou jistou měrou následně přispívat k vývoji různých imunologických onemocnění, a to včetně RS. Tyto faktory mohou snižovat správnou imunitní odpověď a tím jednoznačně přispívají k rozvoji RS. (38)

## 12 Příznaky a symptomy

Prvotní příznaky RS nejsou jednotvárné. Zatímco někteří pacienti uvádějí především bolestivé syndromy, poruchy hybnosti, jiní pak mají projevy závažnějšího charakteru, jakými jsou např. poměrně vzácné zapojení hlavového nervu, optická neuritida doprovázená často ztrátou zraku, dvojitého vidění (zánět zde postihuje zrakový nerv a narušuje centrální vidění) ochrnutí či psychiatrické symptomy. Časté jsou i poruchy paměti a myšlení.

Vzhledem k tomu, že u RS dochází k poškození CNS, počet symptomů je rozsáhlý. Rozdílné příznaky u RS často vedou k diagnostickému dilema.

Přibývá důkazů, že závažnost klinických projevů RS, není jen výsledkem rozsahu rozrušování tkáně, ale spíše představuje komplexní rovnováhu mezi poškozením tkáně, reparací tkání a kortikální reorganizací.(87)

### 13 Průběh nemoci u RS

Z výše uvedeného je jasné, že jde o onemocnění značně komplikované a tudíž jednoznačný průběh nemoci nelze zcela dobře odhadnout. Již z uvedených skutečností vyplývá, že zásadní roli v dalším průběhu nemoci hraje úroveň kvality života pacienta. Vliv na průběh nemoci má tedy bezpochyby i prostředí, ve kterém je pacient léčen (domácí či nemocniční prostředí), klid a psychická pohoda.

Jak prvotní ataka, tak další průběh onemocnění není vždy stejný a může se případ od případu značně lišit.(39)

Byly zkoumány vztahy mezi narušením CNS (centrálního nervového systému), energetického metabolismu a případné progresi RS. Základem byla hypotéza, že všechny metabolity metabolismu extramitochondriální glukózy budou zvýšené u sekundárních progresivních pacientů a s tím bude spojeno i zhoršení neurologických potíží. Sledovala se koncentrace sorbitolu, fruktózy a laktátu pomocí plynové chromatografie, hmotnostní spektrometrie a enzymatických metod ve vzorcích mozkomíšního moku u nemocných pacientů a u zdravých kontrolních vzorků. Výsledkem bylo prokázáno zvýšení všech tří metabolitů, nikoli však glukózy či myoinositolu (alkoholický cukr). Ve srovnání s kontrolami bylo výrazné zvýšení v CSF u SP (sekundárně progresivní), v menší míře pak u pacientů s relabující RS (RRMS). Kromě toho, koncentrace sorbitolu a fruktózy v CSF (ne však laktátu – užíván jako biomarker mitochondriálních poruch) korelují pozitivně se skóre EDSS (Expanded Disability Status Scale – rozšířená stupnice stavu invalidity).

Dysfunkce mitochondriální oxidační fosforylace (vrozené či získané) prostřednictvím zánětu vede k deficitu buněčné energie (snížení ATP - adenosintrifosfátu), ztráty mitochondriálního transmembránového potenciálu a v konečné fázi i k apoptóze buněk. Z toho vyplývá skutečnost, že metabolismus glukózy je zvýšen u pacientů s RS a je spojen s progresí onemocnění projevující se zvýšeným skóre EDSS. Z výše uvedeného je zřetelné, že CSF metabolické profilování může být užitečné pro progresi onemocnění. Zvýšená aktivita polyolové dráhy - menší metabolická dráha glukózy (zvýšení též bylo prokázáno u některých patologických stavů, včetně



hyperglykémie) byla spojena s demyelizací axonů, též onemocněním diabetes melitus a poruch způsobených vzácnými dědičnými onemocněními polyolového metabolismu. Tohoto může být v budoucnu využíváno k monitorování terapií zaměřených na prevenci progresu RS.

Ukázalo se, že nejlepším ukazatelem progresu onemocnění je počet lézí a míra atrofie šedé hmoty mozkové v prvním roce onemocnění. Získané údaje naznačují, že rovněž velmi dobrými ukazateli progresu onemocnění je EDSS skóre. (40)

## 14 Psychické projevy RS

Velkou komplikací v běžném životě nemocného tvoří neurologické potíže, což má výrazný vliv i na psychický stav pacienta. Psychické problémy nemocných navazují především na špatný zdravotní stav, na fyzické problémy způsobené RS. Následné deprese proto nejsou u těchto pacientů žádnou výjimkou. Stavy jako nespavost, únava, poruchy soustředění jsou základním výčtem psychických problémů postihující nemocné s RS. (41)

Psychickým postižením trpí i příbuzní či dokonce ošetřovatelé pacientů. Partneři se musí vyrovnat s přítomností tohoto vážného onemocnění ve své rodině a ošetřovatelé pacientů musí každodenně čelit emocionální tísní, která je s léčbou RS spojena. Předmětem zkoumání se tak stala úroveň stresu a její dopad na běžný život pečovatелů.

Výsledek jasně ukazuje na vysoký stupeň stresu a s tím spojenou i sníženou kvalitu života pečovatелů. Prokázána byla především úzkost z postižení nemocných RS. Hodnocení bylo provedeno pomocí regresivní analýzy, zkoumající vztah mezi proměnnými pacienta a pečovatele.

Je dobré podotknout, že postoj pečovatелů či příbuzných k pacientům znatelně ovlivňuje emocionální tíseň a tím i kvalitu jejich života. (39)

## 15 Vliv RS na fyzickou aktivitu

Kromě psychických projevů je dobré zmínit i projevy fyzické, kterými se zabírala studie z Univerzity v Kalifornii. Studie přímo testovala pohyblivou aktivitu při onemocnění RS a byla cíleně vedena jako dotazníkové hodnocení. Byla provedena u 30 žen s RS.

Mezi nejčastější bariéry běžného života se ukázaly být dva základní symptomy: únava a bolest. Z výsledků studie je patrné, že se stav výrazně zlepšil při sociální podpoře nemocných, což je výhodné především pro zlepšení jejich kvality života. (42)

Fyzické projevy jsou prvním vodítkem k určení diagnózy. Kromě již zmíněných bolestí a únavy lze jmenovat další velmi časté projevy, a to např. ústní a obličejové změny. Mezi tyto řadíme především neuralgie trojklaného nervu, dysartrie, dysfagie, obrna lícního nervu, též zrakové symptomy. Tyto společné projevy se ukázaly jako stěžejní, neboť výskyt byl u 95 % dotázaných. Prevalence byla analyzována pomocí Chí-kvadrát testu (statistický test), přičemž studie vychází ze 400 pacientů s RS. Výsledky poukázaly na nejčastější projevy, které jsou poměrně dosti dobře rozeznatelné a to až v 79,5 %. Je patrné, že právě zubní lékaři mohou velmi dobře určit toto závažné destruktivní onemocnění postihující ústní a maxilofaciální komplex. Kromě těchto fyzických změn se lze často setkat i s dysfagií, která byla testována systémem založeným na EDSS (Expanded Disability Status Scale – rozšířená stupnice stavu invalidity), dále posouzení pohyblivosti čelisti a čelistního kloubu, žvýkacích svalů, potíže s polykáním, kvalita a rychlost řeči a výslovnost slov. Dále posouzení zraku, kdy může docházet k rozmazanému vidění, dvojitému vidění, může též nastat horší pohyblivost očí či dokonce může docházet k úplné ztrátě zraku.

Potvrdilo se, že úloha faktorů, jako je věk, pohlaví, úroveň vzdělání či předpoklad v rodině neměla na výše popsané projevy žádný významný vliv.

Vzhledem ke znepokojivé prevalenci v severní polokouli jsou tyto studie velmi přínosné. (43)

## 16 Klasifikace forem RS

Kromě relaps remitentní formy (RRMS - dochází ke střídání akutních atak a remisí) a primárně progresivní formy (PPMS – dochází k postupnému zhoršování problémů) rozlišujeme další dvě formy sekundárně progresivní (SPMS – již proběhla RRMS forma) a odpočinkovou remitující formu (RRMS).

Studie zabývající se rozdíly především u PPMS a SPMS zjistily, že počet a velikost lézí i atrofie mozku jsou podobné, ale skupina pacientů s SPMS mají vyšší T1 a T2 léze. Dále se ukázalo, že pacienti s PPMS mají horší kognitivní poruchy (např. paměť, slovní plynulost). (44)

## 17 Diagnóza RS

### 17.1 Klinická diagnóza

Kromě fyzických a psychických projevů RS se lékaři zaměřují na vyšetření magnetické rezonance v prostoru (DIS) a čase (DIT). Nález alespoň jedné typické lokality, a to juxtakortikální, periventrikulární, infratentoriální a míchy je označován jako tzv. rozsev v prostoru (DIS).<sup>(52)</sup>

Jako diseminace v čase (DIT) postačuje přítomnost dvou kritérií, a to přítomnost asymptomatické gadolinium léze (enhancující) a asymptomatické (neenhancující) léze.<sup>(11)</sup>

Diagnóza primární progresivní roztroušené sklerózy (PPMS) vyžaduje asi 1 rok progresu onemocnění a pozitivní MRI mozku, T2 léze míchy, oligoklonální pásy v mozkomíšním moku, případně pozitivní likvorový nález intratekální syntézy IgG.<sup>(9)</sup>

Tato kritéria byla stanovena pomocí studií u pacientů, kteří byli prezentováni s velice typickými demyelinizačními syndromy, např. zřetelného nervu či lokalizace na míše. Avšak v klinické praxi tato kritéria nejsou dostačující, neboť mohou být i pacienti s nespecifickými neurologickými příznaky. Určitá opatrnost je na místě i u pacientů nad 50 let a u pacientů mladších 20. let, kdy musí být vyloučeny i jiné choroby.

Dalším kritériem pro určení RS je přítomnost zpožděných vizuálních evokovaných potenciálů (VEP). Tento test umožňuje určit správnou či porušenou funkci mozku. Jednoduše ukazuje na poruchy v mozku ovlivňující vidění.<sup>(44)</sup>

Polemiku v diagnostice pak způsobila pozitivita CSF (cerebrospinal fluid - mozkomíšní mok), který může být pouze dočasným kritériem, a to díky přítomnosti či nepřítomnosti specifických protilátek. Je však bezpochyby primárním vyšetřením při podezření na RS.

Podobně jako VEP, se začalo využívat somatosenzorických evokovaných potenciálů (SSEP), odhalující problémy s míchou. Obě tyto kritéria pak byly

nově začleněny do tzv. McDonaldových kritérií (využívají pokroku techniky - např. MRI). (52)

## 17.2 Laboratorní diagnostika

### 17.2.1 Analytické metody a jejich využití v praxi

Využití analytických metod je nezbytné např. při stanovení eikosanoidů, které jsou mediátory zánětu a hrají podstatnou roli v mnoha patofyziologických procesech, jako jsou hypertenze, ateroskleróza, rakovina, revmatoidní artritidy, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, RS, epilepsie a řada dalších. K biosyntéze eikosanoidů z polynenasycených mastných kyselin (především kyseliny arachidonové) dochází v závislosti enzymu cyklooxygenázy a cytochromu P450. Eikosanoidy jsou přítomny v malých koncentracích v biologických tekutinách a tkáních, včetně mozku. Právě zde jsou tyto markery důležité pro udržení homeostázy a normální funkce CNS (např. ochrana kortikálních nervů před glutamátovou toxicitou). Změny hladin těchto lipidů v mozku pak vedou k mnoha onemocněním včetně RS. (57)

Cyklooxygenáza je přítomna v těle v podobě tří izoenzymů: COX-1, COX-2 a COX-3. Přičemž COX-1 je zodpovědný za udržování homeostázy, COX-3 je považován za variantu sestřihu COX-1 a COX-2, se podílí na mnoha zánětlivých procesech. COX-1 i COX-2 jsou v mozkové tkáni a mohou katalyzovat reakci, která přeměňuje kyselinu arachidonovou na stabilní hydroxyendoperoxid (PGE<sub>2</sub>), který se dále převádí na primární prostanoidy. Tyto se dále dělí na prostaglandiny (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>), prostacykliny (PGI<sub>2</sub>) a tromboxany (TXA<sub>2</sub>), kdy právě PGD<sub>2</sub> je nejhojnějším prostaglandinem syntetizovaným v CNS a chrání jeho funkce. PGE<sub>2</sub> se podílí na dozrávání mozku, je důležitý pro regulaci synaptické aktivity a plasticity a podílí se na procesech vedoucích ke klasickým známkám zánětu a bolesti. (88)

Stanovení eikosanoidů pomocí HPLC s UV detekcí či UPLC je příliš obtížné, proto se konkrétně zde přistupuje k mnohem výhodnější detekci pomocí např. plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) či kapalinové chromatografie s

hmotnostním spektrometrem (liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS). (57)

Pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií lze stanovit i další neurospecifický marker N-acetylaspartát (NAA), který slouží hlavně k hodnocení viability nervových buněk. Axonální poškození a ztráty axonálních funkcí jsou důležitými rysy patologie RS. Axonální degenerace pak hraje hlavní roli ve vývoji přetrvávajícího zdravotního postižení. Dokázalo se, že nižší koncentrace NAA je spojena s menší axonální odezvou, s rostoucí demyelinizací a funkčním poškozením neuronů. Snížení NAA souvisí i s nižším objemem mozku a hojnějšími T2 lézemi, což jasně odráží axonální degeneraci. NAA lze použít jako biomarker pro progresi onemocnění RS. (58)

Další metody využívané pro vyšetření mozkomíšního moku jsou např. elektroforéza, kterou lze určit mnoho proteinů, jako je albumin, prealbumin, transferin a především imunoglobuliny. Citlivějšími metodami se může stanovit celá řada proteinů. V dnešní době existuje asi 400 proteinů detekovaných v normálním CSF. Některé se ukazují být dobrými markery pro chorobné procesy v CSF. Velmi průkazným ukazatelem RS je vyšetření na přítomnost oligoklonálních proužků (OCB, pásy IgG – imunoglobulinu G) v CSF. Abnormálně zvýšená intratekální IgG syntéza tvoří základ OCB. Zvýšený IgG index, známý také jako „Link Index“ je poměr IgG v CSF/albuminu v CSF a sérového IgG/sérového albuminu. Pokud je tento poměr nad 0,7 jedná se o abnormální stav. Proto se v praxi využívá odečtení OCB v séru a CSF. V minulosti se využívalo techniky barvení stříbrem na agarosových gelech, což bylo zdlouhavé a těžkopádné a proto se později přistoupilo k imunoblotové technice za využití nitrocelulóзовého papíru. Tato metoda sebou nese lepší reprodukovatelnost a rozlišovací schopnost.

S příchodem moderních technik, které generují velké množství dat a poskytují cenné informace nejen pro diagnostiku, ale i výzkum lze určit i řadu markerů, které dříve nebylo možné stanovit a studovat.

Mezi mediátory zánětu sledované u pacientů s RS patří prostaglandiny, chemokiny, komplement C5b-9 a lymfokiny. Markery demyelinizace označujeme myelinové proteiny v CSF, markery remyelinizace v současné

době nebyly žádné potvrzeny. Markery progresu jsou označovány cytoskeletální vlákna tzv. neurofilamenta, složená ze tří podjednotek, tedy popisovány jako lehké, střední a těžké řetězce. Bylo zjištěno, že lehké řetězce jsou zvýšeny v CSF u většiny pacientů s relaxující, remitující RS. Těžké řetězce mohou být zvýšeny v CSF u pacientů s oční neuritidou či RS. U RS se v séru a CSF vyskytují protilátky proti neurofilamentům, které byly pozorovány především u recidivujícího a progresivního onemocnění a mohou tak sloužit jako markery progresivního axonálního poranění. (59)

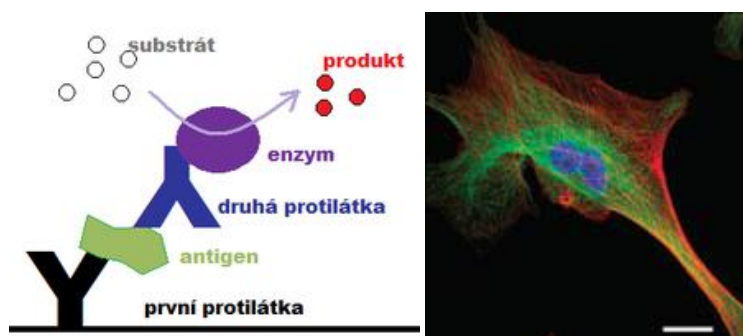
Pomocí hmotnostní spektrometrie a sekvenovacích technik bylo prokázáno, že i lidský trypsin 4 může být zahrnut do patomechanismů RS. (60)

Své místo našla i imunofluorescenční laboratorní technika (IF), která je v laboratořích v hojné míře využívána nejen pro klinickou diagnostiku, ale i ve výzkumných programech. Ve velké míře se používá IF např. při zjišťování antigenů (Ag) a to pomocí protilátek (Ab), které jsou konjugovány s fluorescenčními barvivy. Velmi často se využívá fluorescein isothiokyanát (FITC) nebo tetramethylrhodamin isothiokyanát (TRITC). FITC absorbuje světlo při 495 nm a mezi jeho nevýhody se jednoznačně řadí citlivost vůči změnám v pH a jeho poměrně snadná fotodestrukce. Výsledná fluorescence se následně kvantifikuje pomocí průtokového cytometru či za pomoci automatického zobrazovacího přístroje.

Rozlišujeme dva hlavní způsoby imunofluorescenční metody a to přímou a nepřímou IF. V praxi se využívá častěji nepřímá imunofluorescence, neboť jde o metodu více citlivou, k dispozici je zesílení signálu a především je možné použít komerčně dodávané sekundární Ab. Jsou levné, dodávané v mnoha barvách a jsou podrobeny kontrole jakosti. U nepřímé IF se pracuje s primární Ab, která je neznačená a Ab sekundární, která je značená fluoresceinem. Následně dochází ke kontaktu s Ag a tvorbě komplexu AgAb se značením, kdy se posléze hodnotí tento komplex pod fluorescenčním mikroskopem. (61)



Pro lepší představu principu nepřímé IF poslouží obr. č. 7.



**Obrázek 7 Princip nepřímé imunofluorescence a jeho následné znázornění pod fluorescenčním mikroskopem – cytoskelet a jádro buňky**  
(zdroj: [www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf), staženo: prosinec 2015)

Využití v laboratořích našla i metoda izokratické fokusace (IEF), pomocí které lze studovat supernatant IgG v postižených mozkových tkáních.(62)

### 17.2.2 Nejvýznamnější analytické metody u RS - obecně

V současné době je diagnóza RS založena na klinických kritériích a to včetně příznaků a symptomů. Zároveň se však opírá o řadu vyšetření, jako je MRI, lumbální punkce, identifikace zánětlivých proteinů. Přistupuje se také k zařazení do tzv. McDonaldových kritérií.(53)

Jak je zřejmé z kapitol 17.2., diagnostiku RS usnadňuje řada specializovaných laboratorních technik, které jsou v dnešní době nezbytnou součástí. Mezi nejvíce využívané techniky patří např. kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, imunofluorescenční metody, ELISA či vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Metody využívány ať už k diagnostice samotné či sloužící k výzkumu RS je celá řada a jsou nutností pro získání kvalitních dat.

#### 17.2.2.1 Chromatografie - obecně

Chromatografie je separační metoda, při které se rozdělované analyty distribuují mezi dvě části a to mobilní a stacionární část. Principiálně lze chromatografii popsat jako metodu při níž dochází k dělení směsi látek dle jejich

rozdílné rychlosti pohybu, kdy jsou složky unášeny mobilní fází (MF) a následně různě poutány k fázi stacionární (SF). Fází stacionární může být různě porézní gel - porézní materiál, nejčastěji silikagel, oxid hlinitý, celulóza apod. Fází mobilní představuje kapalina nebo plyn. Během měření se zjišťuje retenční čas a retenční rychlost a následně jsou data zpracovány do chromatografu pomocí chromatogramu. (54)

Rozeznáváme různé typy chromatografií. Pro lepší přehled slouží uvedená tabulka.

**Tabulka 1 Typy chromatografií: dělení dle SF, MF, principu dělení, dle podmínek.**

Dle uspořádání	Dle mobilní fáze	Dle principu dělení	Dle podmínek
SLOUPCOVÁ	PLYNOVÁ	ROZDĚLOVACÍ	IZOKRATICKÁ
PAPÍROVÁ	KAPALINOVÁ	GELOVÁ	GRADIENTOVÁ
	FLUIDNÍ	ABSORBČNÍ	
	PLAZMOVÁ	IONTOVÁ	

### 17.2.2.2 Kapalinová chromatografie - HPLC

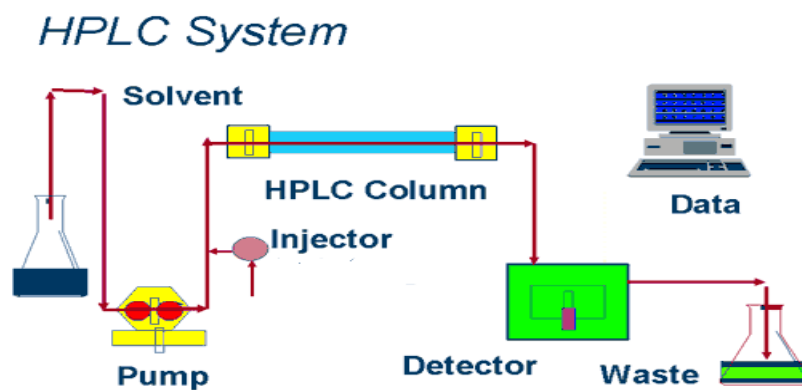
Kapalinovou chromatografii dělíme na kolonovou a plošnou, při čemž u kolonové chromatografie je stacionární fáze umístěna v koloně (např. sklo) a u plošné pak např. na filtračním papíře. Mobilní fáze je vybrána dle rozpustnosti analytu v mobilní fázi a dle síly, kterou je látka zadržována ve fázi stacionární. Jsou vybírána rozpouštědla dle jejich polarit, přičemž nesmí nikterak reagovat se stacionární fází a ani nesmí narušovat detekci. (55)

V dnešní době se využívá především tzv. vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC - high-performance liquid chromatography), která využívá dělení směsi látek za vysokého tlaku.



**Obrázek 8 Rozdělení chromatografie, postavení HPLC** (zdroj: Image\_025.jpg, staženo: prosinec 2015)

U HPLC metody je použita navíc vysokotlaká pumpa, která pohání mobilní fázi. Stacionární fázi tvoří silikagel a fázi mobilní pak pufr s organickými rozpouštědly jako je např. metanol. Integrace na stacionární fázi probíhá dle polaritě látek, přičemž vysoce polární látky interagují velmi málo, obráceně je tomu u látek nízkomolekulárních.



**Obrázek 9 Schéma HPLC metody** (zdroj: web.nmsu.edu, Waters HPLC/MS, staženo: prosinec 2015)

HPLC technika je dnes jednou z nejpoužívanějších analýz a to nejen pro diagnostiku RS. Účinnost separace závisí na velikosti částic, velikosti pórů a plochy stacionární fáze.

Velikost částic HPLC kolon se postupně snížila, a to z 10  $\mu\text{m}$  na 3  $\mu\text{m}$  a tím se i zvýšila účinnost separace. U UPLC (modifikace HPLC) je dokonce velikost

částic kolon na 1,7  $\mu\text{m}$ . V důsledku zvýšené rychlosti analýzy UPLC se snižuje množství použitého rozpouštědla, čímž snižují náklady na výrobu a technika je šetrnější k životnímu prostředí. UPLC má kromě jiného i velmi dobrou schopnost udržovat tlak. Kolony UPLC obsahují pevné jádro, které zlepšuje tvar píku.

Pro stanovení prostaglandinů (látky podobné hormonům) se využívá metody UPLC-MS/MS, kdy separace proběhne během 4 minut. (56)

### 17.3 Protilátky vyskytující se u RS

Protilátky zodpovědné za správnou funkci imunitního systému se nazývají protilátky přirozené. Laboratorně připravené protilátky jsou označovány jako monoklonální protilátky (mAb), které mají stejné vlastnosti, ale jsou určeny proti jedinému cíli, proto jsou velmi specifické. Vytvořeny byly z B-lymfocytů. Díky mAb lze zkoumat nejen RS, ale i další imunologická onemocnění.

Monoklonální protilátky se staly častým cílem pro výzkum pacientů s RS. Reaktivní Ab byly zkoumány pomocí aglutinačních testů, též metodou ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay). Použity byly Ab proti izolovanému lidskému myelinu. Buňky produkující reaktivní Ab byly klonovány a množeny, aby následně produkovaly mAb. Výsledky studie prokazují specifické reakce mAb pouze u pacientů s RS. (63)

Pro léčebné účely RS jsou používány nejen interferony, ale právě i mAb. Autoprottilátky a autoantigeny hrají významnou roli pro imunopatogenezi, diagnostiku a terapeutiku RS. (64)

Zánětlivé léze RS se vyznačují vysokou infiltrací různých buněčných populací a rozpustných mediátorů imunitního systému, jakými jsou T-buňky, B-buňky, makrofágy, mikroglie, ale též cytosiny, chemokiny a Ab. B-buňky a autoprottilátky zaujímají své místo jako biomarkery a to především v detekci Ab proti myelinovému bazickému proteinu (MBP) a myelinovému oligodendrocytovému glykoproteinu (MOG).

Další důkaz o úloze Ab u RS poskytují imunoglobuliny typu IgG a IgM lokalizované u demyelinizovaných axonů a oligodendrocytů spolu s imunitními komplexy byly detekovány u aktivních lézí. Typ lézí I je zprostředkovaná T-buňkami, kde dochází k demyelinizaci vlivem makrofágů či jejich toxinů, u typu lézí II jsou hlavními představiteli T-buňky a Ab. Obě podskupiny pomocných T buněk (Th1, Th2) jsou zapojeny do patogeneze RS, avšak úloha Th1 je výraznější.(65)

Významnou molekulou sehrávající svoji úlohu při autoimunitní odpovědi je aquaporin-4 (AQP4). Tato molekula je v astrocytech a tvoří transportní a kontrolní kanál pro vodu v mozku. Zapojuje se i při rozvoji edému mozku. AQP4 se vyskytuje i v buňkách glie, epitelových tkáních, plicích a ledvinách. Při diagnostice RS je nutné brát v potaz diagnostiku neuromyelitis optica (NMO), neboť léčba je odlišná. Proto se určují Ab proti AQP4, které jsou specifické pro onemocnění NMO.(5)

Další protilátky vyšetřované při onemocnění CNS jsou anti-MOG (myelinový oligodendrocytární glykoprotein) a anti MBP (myelinový bazický protein). Jedná se o Ab proti myelinu, které nalézáme u onemocnění RS. Protilátky anti-MOG byly izolovány pomocí afinitní chromatografie a vazba Ab byla následně detekována za pomoci ELISA metody. MOG byl pozorován u MBP, T-buněčných reaktivních klonů.

Údaje ze studií, zkoumající neurodegenerativní procesy v CNS. Reakce zahrnují multifaktoriální ztrátu ochrany myelinu, imunologicky zprostředkovanou histotoxicitu, poškození mitochondrií, metabolické změny, změněnou signalizaci či naznačují zapojení humorálních imunitních faktorů. (64)

## 18 Léčba RS

V současné době existuje několik variant léčby tohoto onemocnění. Mezi nejvíce užívané je řazena injekční terapie, novější orální formy a cílené monoklonální protilátky.

Injekční terapie zahrnuje především IFN- $\beta$  a glatiramer acetát (GA). Výhodou těchto látek je skutečnost, že nežádoucí účinky se vyskytují jen velmi zřídka. Nevýhodou je fakt, že ne všichni pacienti dostatečně reagují, tudíž účinek může být poměrně nevýrazný. Jejich mechanismus účinku je zaměřen na modulaci T lymfocytů, jejich diferenciaci a funkci, jedná se o tzv. imunomodulační účinek.<sup>(73)</sup> Do nedávné doby jediným lékem u RS byl již zmíněný interferon  $\beta$ -1b (IFN- $\beta$ 1b). Jde o endogenní cytosin, u kterého bylo zřetelně prokázáno snížení relapsů. Podávání těchto léků se provádí v pravidelných intervalech, při čemž mnozí pacienti pociťují chřipkové vedlejší účinky různé závažnosti. INF- $\beta$  je také podáván pacientům, u kterých byla prokázána pouze jediná klinická demyelinizace, tito pacienti jsou klasifikováni jako pacienti s klinicky izolovaným syndromem. Kromě INF- $\beta$ 1b je podáván i INF- $\beta$ 1a, který prokazatelně snižuje riziko relapsu. Prokázán byl vyšší účinek při vyšší dávce INF- $\beta$ 1a. <sup>(72)</sup>

Glatiramer acetát je náhodný kopolymer čtyř aminokyselin, který vyvolává imunitní odpověď na tolerogenní myelinový basický protein. Jeho afinita k T-lymfocytovým receptorům potlačuje odpověď na další související imunogeny.

Mezi další léky RS se řadí např. Mitoxantron. Jedná se o velmi malou molekulu, která je schopna projít přes hematoencefalitickou bariéru a dochází následně k integraci s buňkami v CNS (centrálním nervovém systému). Při užívání je třeba dbát na dlouhodobou bezpečnost, která je spojena s rizikem kardiotoxicity a leukemií. Lék je řazen mezi cytostatika.

Jak již bylo uvedeno, při léčbě se musí brát ohled na případnou toxicitu či nežádoucí účinky léků. Mitoxantronu je přesto schválen a užíván při léčbě sekundární progresivní RS bez recidivy. Mnozí pacienti nejsou však dostatečně informováni o kardiotoxickém účinku Mitoxantronu, což jasně naznačují některé

studie zabývající se tímto tématem. Všeobecně převládá nedostatečná informovanost a podhodnocení rizik spojené s touto léčbou. Podobně toxický jako Mitoxantron je i Cyklofosfamid a Methotrexát, které jsou využívány k léčbě u progresivní RS.

Kladribin je silným imunosupresivním agens, opět užíván u progresivní RS. Slouží k selektivnímu odstranění lymfocytů.

Dalším lékem při léčbě RS je často používaný Alemtuzumab, což je humanizovaná IgG1 monoklonální protilátka namířená proti CD52, tedy glykoproteinu na T-lymfocytech a B-lymfocytech, NK buňkách, dendritických buňkách a většině monocytů a makrofágů.

U jiných léků pro léčbu RS, jakými jsou např. Natalizumab a Ocrelizumab, Fumarát či Laquinimod byl potvrzen protizánětlivý účinek. Tyto léky, stejně jako Kanabinoidy (látky obsažené v konopí) jsou stále ve fázi testování.

Jak již bylo uvedeno, při léčbách často dochází k různým nežádoucím účinkům. Nejčastějším uváděným problémem jsou lokální reakce v místě vpichu, a to především zarudnutí, otoky, bolesti, svědění, modřiny, záněty, zatvrdnutí kůže, vyrážky či jiná podráždění pokožky, včetně kožních nekrotů a lipoatrofie. Reakce se posléze odstupňovali na mírné, střední či těžké.

U léčby GA byly často hlášeny lipoatrofie. Při studii v Kanadě bylo dokonce prokázána lipoatrofie u 45 % pacientů. GA je spojován i s některými alergickými reakcemi.

Lipoatrofie byla zjištěna i u pacientů s léčbou IFN- $\beta$ , ovšem v menším procentuálním měřítku.

IFN- $\beta$ 1b byl spíše spojován s kožními vředy, kopřivkami a nekrotami kůže v místě vpichu.

Cílem terapie je zabránit progresi onemocnění, přičemž účinnost a snášenlivost léků by měla být co největší. (71)

## 18.1 Léčba akutní ataky RS

Pod pojmem akutní ataky chápeme nové symptomy nemoci či zhoršený stav symptomů stávajících, na kterých se nepodílí infekce ani přehřátí a zároveň musí tyto příznaky trvat alespoň 24 hodin.

Léčbu akutní ataky je nutno zahájit co nejdříve, což se provádí především pomocí kortikoidů snižující propustnost hematoencefalitické bariéry a snižující možnost pomnožení lymfocytů. Avšak jak ukázaly některé studie, kortikoidy jsou sice výbornou volbou, zdaleka však ne jedinou možností léčby akutních atak.

Dalším možným lékem je síran hořečnatý. Zde byl prokázán ochranný účinek na integritu hematoencefalitické bariéry. Síran hořečnatý zeslabuje propustnost hematoencefalitické bariéry a zmírňuje hematoencefalitická poranění, což prokazují i výsledky světelné a elektronové mikroskopie.

Hematoencefalitická bariéra je komplexní skladba buněk, a to mozkových endoteliálních buněk, pericyty a jejich bazální laminy, které jsou obklopeny a podporovány astrocyty spolu s perivaskulárními makrofágy. Bez této bariéry by došlo k zaplavení humorálních neurotransmiterů krví a došlo by k narušení normální funkce centrálního nervového systému (CNS). Dysfunkce hematoencefalitické bariéry je hlavním charakteristickým znakem RS. Nejčastější jsou u akutních lézí abnormality těsných buněčných spojů. Zvýšení propustnosti koreluje se závažností nemoci.

Síran hořečnatý se používá k léčbě eklampsie (závažný křečovitý stav např. u rodiček), přičemž právě eklampsie je spojena se zvýšenou propustností hematoencefalitické bariéry a tím i tvorbou cerebrálního edému. Tato léčba v časném stádiu může otok mozku zmírnit a brání zvýšené propustnosti bariéry, což by mohlo být přínosem u akutních recidiv RS.<sup>(74)</sup>

Na léčbu akutních atak jsou zaměřeny i zobrazovací metody. V průběhu onemocnění je možné detekovat významné změny v parametrech MRI. MRI je velice citlivá metoda pro detekci fokálních lézí u pacientů s RS. Sériové vyšetření jsou proto velmi užitečné při rozlišení akutních a chronických lézí RS.



Identifikace lézí se ztrátou myelinu je důležitým hlediskem, neboť mohou být méně citlivé na léčbu než edematózní a zánětlivé léze.(11)

Některé zobrazovací metody umožňují zobrazení některých funkčních vlastností mozkové tkáně. Mezi tyto nepochybně patří DWI metoda (difúzně vážený obraz). Na základě směru difuze lze pak určit svazky bílé hmoty mozku. Existují studie, které se zabývaly rozdílem u DWI u normální bílé hmoty a u pacientů s akutní RS a korelací mezi EDSS a hodnotami ADC (aparentní difuzní koeficient - ADC). ADC mapy jsou využívány k lepšímu odlišení nádorů mající vyšší stupeň malignity. Pečlivé vyšetření může včas odhalit abnormality tkáně u pacientů s RS. (75)

## 18.2 Léčba modifikující chorobu

U recidivující roztroušené sklerózy se jako první volba podává GA či oba intramuskulární interferony (IFN- $\beta$ -1b, IFN- $\beta$ -1a). Pro terapii relaps-remitentní RS byla prokázána vyšší účinnost u léčby pomocí Alemtuzumabu oproti IFN- $\beta$ , i když dlouhodobé snížení leukocytů je často spojené se zvýšeným rizikem závažných oportunních infekcí. (79)

Ukázalo se, že terapie INF- $\beta$ -1b, INF- $\beta$ -1a i kopolymeru 1 snižují frekvenci relapsů až o 1/3 a zároveň snižují rozsah patologických lézí v mozku, což prokazují i zobrazovací vyšetřovací metody MRI.(84)

Nově podávané léky, jako jsou natalizumab, fingolimod či kladribin jsou sice silnější, ale také více rizikové, což by při léčbě mělo být bráno v potaz.(76)

Při dlouhodobé terapii často dochází k různým projevům, a proto je třeba dbát i na životní úroveň pacienta. Často je tak vyvinuta snaha o nové preparáty či způsoby aplikace léků. Poměrně nové je využití endermologie (buněčná stimulace). Provádí se u pacientů, u kterých dochází k panikulitidě a lipoatrofii při podávání GA, kdy se jedná o hlubokou mechanickou masáž. Při této metodě časem dochází ke snížení či dokonce vymizení indurace a zároveň se tak přispívá k posílení tolerance GA.(77)

Při takto obtížné terapii jsou podávány tzv. doplňující léky. V současnosti jde například o léčbu IFN- $\beta$  a přidání dalšího medikamentu, jako je

adrenokortikotropní hormon (ACTH). ACTH může mít imunomodulační mechanismus. Použitím ACTH pulzní terapie došlo v průběhu času ke zlepšení zdraví u pacientů s RS, což naznačuje potenciální přínos v léčbě. (78)

Snahou kombinací některých léčiv je příznivější výsledek terapie. Pomocí kombinace Mitoxantronu a GA dojde k dosažení příznivých výsledků, naproti tomu u kombinací statinů, Natalizumabu a Azathioprinu s IFN- $\beta$  nebyly pozorovány prokazatelně lepší výsledky.

Kombinací určitých léků lze dosáhnout daleko lepších výsledků či případně minimalizovat druhotné nepříznivé projevy a proto stále probíhají studie zaměřující se na tuto tematiku. (80)

Vyvažování přínosů a rizik je nedílnou součástí před zahájením každé léčby RS.

### **18.3 Alternativní a symptomatická léčba**

Symptomatická léčba je zaměřena na odstranění či snížení příznaků zhoršujících se funkčních schopností a na kvalitu života postižených pacientů. Navíc se pomocí symptomatické léčby může alespoň z části zabránit rozvoji sekundárního tělesného poškození pacientů. Před každou léčbou je však nutné dobře zhodnotit celkový stav pacienta.

Terapií RS se zabývá společnost Consensus Group (MSTCG), která se skládá

s členů Lékařské poradní rady pro RS, která zahrnuje několik států. Doporučení rady obsahují znalosti a znalecké posudky založené na přímých důkazech a značnou měrou tak napomáhají lékařům v ambulantních poradnách. Jsou zde též zahrnuty směrnice pro zacházení s nejdůležitějšími příznaky RS.

Důležitým předpokladem pro účinnou léčbu je správná klasifikace symptomů prezentovaných pacientem. Pro lepší přehled nejběžnějších symptomů a léčby slouží níže uvedená tabulka. (81)

**Tabulka 2 Symptomy nemoci a jejich léčba** (vytvořeno z textu – odkaz 81)

Symptomy	Specifická opatření	Příklad léčivé látky
křečovitost	fyzioterapie	baklofen, tizanidin
únava	snížení tělesné teploty	amantadin, 4-aminopyridin, L-karnitin
bolest	////////////////////////////////////	gabapentin, topiramát
dysfunkce močového ústrojí	fyzioterapie, spec.pomůcky	oxybutynin, tolterodin, darifenacin
střevní dysfunkce	fyzioterapie, spec.pomůcky	projímadla, léky rozšiřující střevní motilitu
sexuální dysfunkce	////////////////////////////////////	sildenafil, vardenafil, tadalafil, klonidin
ataxie a třes	fyzioterapie	antiepileptika, beta-blokátory
kognitivní dysfunkce	nácvik dochovaných funkcí a kompenzaci deficitů	fysostigmin, donepezil
deprese	psychoterapie	sertralin, moklobemid
paroxysmální příznaky	////////////////////////////////////	karbamazepin, gabapentin
okohybné příznaky	////////////////////////////////////	methylprednisolon, gabapentin
dysartrie a dysfonie	logopedie, neurologie	u disfonie => botulotoxin

Doplňková a alternativní medicína (CAM) není jednotně chápána. Terapie CAM může být v každé zemi jiná a tato skutečnost se může následně odrážet i v informovanosti u pacientů s RS, kteří nemusí dostat jednotná a spolehlivá fakta o konvenční terapii.

V dnešní době jsou u alternativní terapie RS zmiňovány především bylinné léky, vitamíny a minerály, marihuana a transdermální gelová náplasti histaminu a kofeinu.

CAM terapie je u RS poměrně výrazně diskutována, neboť účinnost a bezpečnost CAM terapií je variabilní. (82)

## 19 Prognóza

Pro zjištění prognózy u pacientů s RS se často přistupovalo k jednoduchému grafickému znázornění života pacienta. Toto ilustrativní znázornění RS se ukázalo jako nejlepší pro monitoring počátečních poruch, smyslových poruch, věku, pohlaví, relapsů i remisí.(83)

Prognóza přirozeného průběhu roztroušené sklerózy se určuje pomocí Kurtzkeho stupnice (Expanded Disability Status Scale - EDSS), a to v rozpětí od nula do deseti. Průměrná věková hranice při nástupu nemoci u remitentní formy je 30 let, u progresivních typů pak odpovídá 37 letům pacienta.(84)

Do ukazatelů příznivější prognózy patří poruchy zrakového nervu, nižší věk při diagnóze RS, ženské pohlaví a delší interval mezi dvěma relapsy. Prognózu lze odhadnout i pomocí tzv. „Index“ progresu, dle kterého lze stanovit míru malignity. Epidemiologická skupina byla řazena spíše do benigní kategorie, avšak pacienti s „Index“ progresu 1,4 a vyšší, byly zařazeny do maligní kategorie.(86)

Ze statických dat vyplývá, že průměrný nástup nemoci je kolem 30 roku života u remitentní formy a 37,3 let u progresivních forem. Pro tzv. „čisté“ fáze relapsu byl věk stanoven na 29,2 roků a u relapsů z následků nemoci pak činil 33,9 let. Pozdní nástup nemoci, krátký interval mezi prvními dvěma relapsy a výskytem progresivní fáze jsou spojeny se špatnou prognózou. (85)

Spojením invalidního skóre s dobou trvání nemoci a interval mezi prvními dvěma relapsy je důležitým ukazatelem dalšího postupu nemoci.(84)

## 20 Závěr

Snahou této práce byl rozbor velmi závažného a stále více se rozšiřujícího onemocnění postihující převážně mladou populaci lidí.

Bylo zde vyvinuto úsilí sjednotit projevy nemoci, diagnostická kritéria a její léčbu. Integrovat převážně nejvýznamnější možné činitele nemoci a poukázat na imunologicky orientovanou část onemocnění.

V části laboratorní jsem se pak zabírala převážně laboratorním výzkumem a diagnostikou nemoci.

Jedním z důležitých bodů práce bych zmínila faktory dědičnosti a genetickou predispozici onemocnění, jako jsou molekuly II. třídy HLA systému.

Vytyčeny byly hlavní imunologické body RS, možné hormonální zastoupení při jejím onemocnění i při rozvoji RS. Shrnuty byly i časté rizikové faktory a to jak infekční např. virus Epstein – Barrové, tak rizikové faktory prostředí, kde stojí za připomenutí např. vitamín D.

Dále bych ráda vyzdvihla kapitolu o buněčné a humorální imunitě. Též T-reg buňky, které při RS nemají dostatečné regulační účinky.

RS je i v současné době stále jedno z onemocnění, které ještě nebylo dostatečně prozkoumáno. Pomocí nových studií se snažíme získat další informace, které by vedly k lepší diagnostice i léčbě nemoci, případně by pomohli zabránit dalšímu rozvoji nemoci.

## 21 Souhrn

**Autor:** Vendula Lhotáková

**Název:** Roztroušená skleróza z pohledu laboratorního pracovníka

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

**Studijní obor:** Zdravotní laborant, kombinovaná forma

**Cíl práce:** Bakalářská práce je sepsána formou literární rešerše. Hlavní snahou je poukázat na problematiku diagnostiky roztroušené sklerózy, vytyčit její hlavní rizikové faktory, vyzdvihnout imunologické pozadí a v neposlední řadě i najít možné biomarkery nemoci.

**Hlavní poznatky:** Roztroušená skleróza RS (Multiple sclerosis – MS) je zánětlivé autoimunitní onemocnění postihující především mladší generaci lidí. Při onemocnění dochází k poškození myelinu – ochranné vrstvy axonů (neuronových výběžků). Vyznačuje se zánětlivými lézemi v mozku, které způsobují dysfunkci centrální nervové soustavy.

Historie RS sahá až do 14. století, i když ke zvratu v diagnostice nemoci došlo teprve ve 20. letech. Diagnostika byla složitá, neboť projevy nemoci nejsou jednotné.

S technologickým pokrokem se diagnostika poměrně zlepšila. V dnešní době se opírá především o nejrůznější laboratorní vyšetření zahrnující především magnetickou rezonanci. Velmi přínosné je vyšetření mozkomíšního moku, ale i dalších markerů nemoci.

RS je podmíněna geneticky a imunologicky. T – buňky a Treg buňky sehrávají v patogenezi nemoci značnou roli. Vliv na onemocnění mají i steroidní hormony. K rozvoji nemoci pak řadíme i další faktory, jako je životní prostředí, strava, ale také geologické rozmístění obyvatel.

**Závěr:** Dříve se léčba RS opírala pouze o posílení imunitního systému, v dnešní době je k dispozici řada terapeutik, které značně zlepšují celkový stav

pacienta. I když stále nejsou zjištěny veškeré příčiny nemoci, je již k dispozici celá řada léků, které zlepšují celkový životní standard pacienta. Možné biomarkery RS mohou pomoci k rychlejšímu odhalení nemoci, a tudíž i ke včasné terapii.



## 22 Abstract

**Author:** Vendula Lhotáková

**Title:** Multiple sclerosis – laboratory aspects

Bachelor work

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

**Field of study:** Medical laboratory technician, combined study form

**Background:** Bachelor work thesis is written as a literary review. The main effort is to point to the diagnosis of multiple sclerosis, to set out its main risk factors highlighted immunological background and last but not least, to find possible biomarkers of disease.

**Main findings:** Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory auto-immune disease affecting especially the younger generation. When the disease causes damage to the myelin -protective layer of axons (neuronal projections), it is characterized by inflammatory lesions in the brain causing CNS dysfunction.

MS history dates back to the 14th century , although the reversal in the diagnosis of the disease occurred only in the 20s. Diagnosis is difficult because symptoms of the disease are not uniform. With technological advances, however, the diagnosis is considerably improved. Nowadays, diagnostic processes are based on a particular variety of laboratory tests including Magnetic resonance imaging. Very useful is the test of the cerebro spinal fluid, as well as other markers of the disease.

MS is determined genetically and immunologically. T - cells and Treg cells play a significant role in the pathogenesis of the disease. Steroid hormones also have an impact on the diseases. To develop the disease, we classify also other factors such as the environment, diet, as well as geographical deployment of the population.

**Conclusions:** Previously MS treatment relied solely on boosting the immune system, nowadays it is a number of therapeutic methods which significantly improves the general condition of the patient. Although still not identified all the causes of the disease, it is already available to a number of drugs that improve the overall standard of living of the patient. Potential biomarkers MS may help in faster detection of the disease, and hence to early therapy.

## 24 Seznam zkratek

Ab	protilátka
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADC	aparentní difuzní koeficient
ADEM	akutní roztroušená encefalomyelitida
Ag	antigen
AGER	rozpoznávající receptor,
Anti-MOG	protilátky proti MOG
APC	antigen prezentující buňky
AQP4	aquaporin 4
ATP	adenosintrifosfát
CD	buňky nesoucí CD znaky, CD-buňky
CIS	klinicky izolovaný syndrom
CNS	centrální nervový systém
COP1	kopolymer 1
COX	cyklooxygenáza
CSF	mozkomíšní mok, cerebrospinal fluid
DIS	diseminace v prostoru, dissemination in space
DIT	diseminace v čase, dissemination in time
DNA	deoxyribonukleová kyselina, deoxyribonucleic acid
DWI	difuzně vážený obraz
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
EBV	Epstein-Barrové virus
EDSS	rozšířená stupnice stavu invalidity, Expanded Disability Status Scale
ELISA	analytická enzymatická metoda, enzyme – linked immuno sorbent assai
FITC	fluorescein isothiokyanát
FoxP3	transkripční faktor Forkhead Box P3
GA	glatiramer acetát
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HBsAg	australský antigen, hepatitis B surface antigen
HLA / MCH	hlavní histokompatibilní komplex, major histocompatibility complex

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie,
IF	imunofluorescence
IgG / M	imunoglobulin G / M
IL	interleukin
INF	interferon
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem,
mAb	monoklonální protilátka
MBP	myelinový basický protein, myelin basic protein
MF	mobilní fáze
MOG	myelin oligodendrocytový glykoprotein
MRI	magnetická resonance
MS	hmotnostní spektrometrie
MSTCG	společnost Consensus Group
NAA	N-acetylaspartát
NK-buňky	přirození zabíječi, natural killer cells
NMO	onemocnění neuromyelitis optika
NO	oxid dusnatý
OCB	oligoklonální proužky, oligoclonal band
PGE2	prostaglandin E2
PGF2	prostaglandin F2
PGD2	prostaglandin D2
PGI2	prostacykliny
PPMS	primární progresivní RS
RRRS	relaps remitující roztroušená skleróza
RRMS	relaps remitující roztroušená skleróza
RS / MS	roztroušená skleróza, multiple sclerosis
SF	stacionární fáze
SPMS	sekundárně progresivní RS
SSEP	somatosenzorické evokované potenciály
TLR	Toll – like receptory
TNF	tumor nekrotizující faktor, tumor necrosis factor
T-reg	T – regulační buňky
TRITC	tetramethylrhodamin isothiokyanát
TXA2	tromboxyny

UPLC	ultra vysokotlaká kapalinová chromatografie,
UV	ultrafialové záření
VEP	vizuální evokované potenciály

## 25 Seznam obrázků a tabulek

<b>Obrázek 1</b> Porovnání zdravého a demyelinizovaného neuronu .....	9
<b>Obrázek 2</b> Porovnání zdravého mozku oproti mozku s lézemi u RS .....	10
<b>Obrázek 3</b> Souhrn možných spouštěcích faktorů RS, uvedeno dle Van der Valk, P., Amor, S.....	11
<b>Obrázek 4</b> Přehled umístění HLA I. a II. třídy na lidském chromozomu 6, změny na chromozomu mohou zvyšovat pravděpodobnost výskytu RS .....	15
<b>Obrázek 5</b> Ovlivnění buněk pomocí T-reg buněk u zdravých a nemocných RS .....	26
<b>Obrázek 6</b> Mapa světa, která ukazuje incidenci RS, která je závislá na vzdálenosti od rovníku (zvyšuje se) .....	29
<b>Obrázek 7</b> Princip nepřímé imunofluorescence a jeho následné znázornění pod fluorescenčním mikroskopem – cytoskelet a jádro buňky .....	40
<b>Obrázek 8</b> Rozdělení chromatografie, postavení HPLC .....	42
<b>Obrázek 9</b> Schéma HPLC metody.....	42
<b>Tabulka 1</b> Typy chromatografií: dělení dle SF, MF, principu dělení, dle podmínek. ....	41
<b>Tabulka 2</b> Symptomy nemoci a jejich léčba.....	50

## 26 Seznam literatury

1. Ebers, G. C. (2001). Natural history of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 71(suppl 2), ii16-ii19.
2. Orrell, R. W. (2005). Multiple Sclerosis: The History of a Disease. *J Royal Soc Med*, 98(6), 289-289.
3. Lublin, F. (2005). History of modern multiple sclerosis therapy. *J Neurology*, 252(3), iii3-iii9.
4. Roth E., The History of Multiple Sclerosis: How far have we come?, Medically Reviewed 2013; [www.healthline.com/health/multiple-sclerosis/history](http://www.healthline.com/health/multiple-sclerosis/history)
5. Compston A., Coles A., (2008) Multiple sclerosis, *Lancet*, 372:1502-17, [S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
6. Dyment, D. A., Sadnovich, A. D., Ebers, G. C. (1997). Genetics of multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*, 6(10), 1693-1698.
7. Weissert, Robert. (2013). The immune pathogenesis of multiple sclerosis." *J Neuroimmun Pharmacol* 8(4) 857-866.
8. Huseby, E. S., Huseby, P. G., Shah, S., Smith, R., Stadinski, B. D. (2012). Pathogenic CD8T cells in multiple sclerosis and its experimental models. *Molecular Mechanisms Chronic Inflammation Development*, 22.
9. Wu, G. F., Alvarez, E. (2011). The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*, 29(2), 257-278.
10. Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Lublin, F. D. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69(2), 292-302.
11. Naismith R. T.,- Polman CH. (2011) Update on Multiple Sclerosis Diagnostic Criteria, *Ann Neurol*; 58:840, [www.jwatch.org/jn201101250000001/2011/](http://www.jwatch.org/jn201101250000001/2011/)
12. Olerup, O., Hillert, J. (1991). HLA class II associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tiss Antig*, 38(2), 1-15.
13. Ebers, G. C., Kukay, K., Bulman, D. E., Sadovnick, A. D., Rice, G., Anderson, C., Paty, D. W. (1996). A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Gen*, 13(4), 472-476.

14. Sawcer, S., Jones, H. B., Feakes, R., Gray, J., Smaldon, N., Chataway, J., Compston, A. (1996). A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Gen*, 13(4), 464-468.
15. Okuda, D. T., Srinivasan, R., Oksenberg, J. R., Goodin, D. S., Baranzini, S. E., Beheshtian, A., Lincoln, R. (2009). Genotype–phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by 1HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain*, 132(1), 250-259.
16. Barcellos, L. F., Oksenberg, J. R., Begovich, A. B., Martin, E. R., Schmidt, S., Vittinghoff, E., Swerdlin, A. (2003). HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Amer J Hum Genet*, 72(3), 710-716.
17. Compston, A. (1997). Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 62(6), 553-561.
18. Oksenberg, J. R., Barcellos, L. F., Cree, B. A., Baranzini, S. E., Bugawan, T. L., Khan, O., Goodin, D. (2004). Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Human Genet*, 74(1), 160-167.
19. Epplen, C., Jäckel, S., Santos, E. J., D'Souza, M., Poehlau, D., Dotzauer, B., Stöver, J. (1997). Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol*, 41(3), 341-352.
20. Haegert, D. G., Marrosu, M. G. (1994). Genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 36(S2), S204-S210.
21. Favorova, O. O., Favorov, A. V., Boïko, A. N., Sudomoina, M. A., Andreevskii, T. V., Alekseenkov, A. D., Ochs, M. F. (2008). [Genetic predisposition to multiple sclerosis as a polygenic autoimmune disease]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni SS Korsakova/Ministerstvo zdravookhraneniia i meditsinskoi promyshlennosti Rossiiskoi Federatsii, Vserossiiskoe obshchestvo nevrologov [i] Vserossiiskoe obshchestvo psikiatrov*, 109(7 Suppl 2), 16-22.
22. Dyment, D. A., Sadnovich, A. D., Ebers, G. C. (1997). Genetics of multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*, 6(10), 1693-1698.



23. Zuvich, R. L., McCauley, J. L., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L. (2009, December). Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Semin Immunol* 21 (6), 328-333).
24. Caillier, S. J., Briggs, F., Cree, B. A., Baranzini, S. E., Fernandez-Viña, M., Ramsay, P. P., Oksenberg, J. R. (2008). Uncoupling the roles of HLA-DRB1 and HLA-DRB5 genes in multiple sclerosis. *J Immunol*, 181(8), 5473-5480.
25. Gilden, D. H. (2005). Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 4(3), 195-202.
26. Bickley S., Infections and MS - what is that evidence?, SC041990, [nationalmssociety.org/](http://nationalmssociety.org/) 2014
27. Hayes, C. E. (2000). Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc*, 59(04), 531-535.
28. Ramagopalan, S. V., Maugeri, N. J., Handunnetthi, L., Lincoln, M. R., Orton, S. M., Dymont, D. A., Ebers, G. C. (2009). Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1\* 1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet*, 5(2), e1000369.
29. Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M. M., Cortinovis-Tourniaire, P., Moreau, T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *N Eng J Med*, 339(5), 285-291.
30. Voskuhl, R. R., Palaszynski, K. (2001). Sex hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neuroscientist*, 7(3), 258-270.
31. Gilmore, W., Weiner, L. P., Correale, J. (1997). Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol*, 158(1), 446-451.
32. Soldan, S. S., Retuerto, A. I. A., Sicotte, N. L., Voskuhl, R. R. (2003). Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estriol. *J Immunol*, 171(11), 6267-6274.
33. Gold, S. M., Voskuhl, R. R. (2009). Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Prog Brain Res*, 175, 239-251.

34. Zorgdrager, A., De Keyser, J. (1997). Menstrually related worsening of symptoms in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 149(1), 95-97.
35. El-Etr M, Vukusic S, Gignoux L, Durand-Dubief F, Achiti I, Baulieu EE, Confavreux C (2005) Steroid hormones in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 233, 49–54
36. El-Etr, M., Ghomari, A., Sitruk-Ware, R., Schumacher, M. (2011). Hormonal influences in multiple sclerosis: new therapeutic benefits for steroids. *Maturitas*, 68(1), 47-51.
37. Ascherio, A., Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*, 61(4), 288-299.
38. Ramagopalan, S. V., Dobson, R., Meier, U. C., Giovannoni, G. (2010). Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*, 9(7), 727-739.
39. Figved, N., Myhr, K. M., Larsen, J. P., Aarland, D. (2007). Caregiver burden in multiple sclerosis: the impact of neuropsychiatric symptoms. *J Neurol Neurosurg Psychiat*, 78(10), 1097-1102.
40. Regenold, W. T., Phatak, P., Makley, M. J., Stone, R. D., Kling, M. A. (2008). Cerebrospinal fluid evidence of increased extra-mitochondrial glucose metabolism implicates mitochondrial dysfunction in multiple sclerosis disease progression. *J Neurol Sci*, 275(1), 106-112.
41. Shahrbanian, S., Duquette, P., Kuspinar, A., Mayo, N. E. (2015). Contribution of symptom clusters to multiple sclerosis consequences. *Qual Life Res*, 24(3), 617-629.
42. Plow, M., Bethoux, F., McDaniel, C., McGlynn, M., Marcus, B. (2013). Randomized controlled pilot study of customized pamphlets to promote physical activity and symptom self-management in women with multiple sclerosis. *Clin Rehab*, 0269215513494229.
43. Lassemi, E., Sahraian, M. A., Motamedi, M. H. K., Valayi, N., Moradi, N., Lasemi, R. (2014). Oral and facial manifestations of patients with multiple sclerosis. *Dentistry*, 2014.
44. Thompson, A. (2004). Overview of primary progressive multiple sclerosis (PPMS): similarities and differences from other forms of MS, diagnostic criteria, pros and cons of progressive diagnosis. *Multip Scler*, 10(3 suppl), S2-S7.

45. Weiner, H. L. (2004). Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Archiv Neurol*, 61(10), 1613-1615.
46. Loma, I., Heyman, R. (2011). Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuropharmacol*, 9(3), 409-416.
47. Wu, G. F., Alvarez, E. (2011). The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*, 29(2), 257-278.
48. Kidd, D., Barkhof, F., McConnell, R., Algra, P. R., Allen, I. V., Revesz, T. (1999). Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain*, 122(1), 17-26.
49. Geurts, J. J., Bö, L., Pouwels, P. J., Castelijns, J. A., Polman, C. H., Barkhof, F. (2005). Cortical lesions in multiple sclerosis: combined postmortem MR imaging and histopathology. *Am J Neuroradiol*, 26(3), 572-577.
50. Kidd, P. M. (2001). Multiple sclerosis, an autoimmune inflammatory disease: prospects for its integrative management. *Alternat Med Rev*, 6(6), 540-566.
51. Frischer, J. M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C. F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132(5), 1175-1189.
52. Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Lublin, F. D. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*, 69(2), 292-302.
53. Reinke, S. N., Broadhurst, D. I., Sykes, B. D., Baker, G. B., Catz, I., Warren, K. G., Power, C. (2014). Metabolomic profiling in multiple sclerosis: insights into biomarkers and pathogenesis. *Multip Scler J*, 20(10), 1396-1400.
54. Giddings, J. C., Byring, H. (1955). A molecular dynamic theory of chromatography. *J Physic Chem*, 59(5), 416-421.
55. <http://www.slideshare.net/cryz-kae24/liquid-chromatography-principles>
56. <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
57. Puppolo, M., Varma, D., Jansen, S. A. (2014). A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue. *J Chromatograph B*, 964, 50-64.

58. Jasperse, B., Jakobs, C., Eikelenboom, M. J., Dijkstra, C. D., Uitdehaag, B. M., Barkhof, F., Teunissen, C. E. (2007). N-acetylaspartic acid in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients determined by gas-chromatography-mass spectrometry. *J Neurol*, 254(5), 631-637.
59. Rammohan, K. W. (2009). Cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Ann Ind Acad Neurol*, 12(4), 246.
60. Medveczky, P., Antal, J., Patthy, A., Kékesi, K., Juhász, G., Szilágyi, L., Gráf, L. (2006). Myelin basic protein, an autoantigen in multiple sclerosis, is selectively processed by human trypsin 4. *FEBS letters*, 580(2), 545-552.
61. Robinson J. P. PhD, Sturgis J. BS, Kumar G. L. PhD, Immunofluorescence, IHC Staining Methods, 2009; kapitola 10, 61-65, [www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf)
62. Tavolato, B. F. (1975). Immunoglobulin G distribution in multiple sclerosis brain: an immunofluorescence study. *J Neurol Sci*, 24(1), 1-11.
63. Uhlig, H., Dernick, R. (1989). Monoclonal autoantibodies derived from multiple sclerosis patients and control persons and their reactivities with antigens of the central nervous system. *Autoimmunity*, 5(1-2), 87-99.
64. Vyshkina, T., Kalman, B. (2008). Autoantibodies and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Lab Invest*, 88(8), 796-807.
65. Mirshafiey, A., Kianiaslani, M. (2013). Autoantigens and autoantibodies in multiple sclerosis. *Iran J Allerg, Asthma Immunol*, 12(4), 292.
66. Brenner, T., Arnon, R., Sela, M., Abramsky, O., Meiner, Z., Riven-Kreitman, R., Teitelbaum, D. (2001). Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copaxone®. *J Neuroimmunol*, 115(1), 152-160.
67. Gawlik, B. B., Hafler, D. A. (2013). Regulatory T Cells in MS. In *Multiple Sclerosis Immunology* (pp. 27-47). Springer New York.
68. Dalla Libera, D., Di Mitri, D., Bergami, A., Centonze, D., Gasperini, C., Grasso, M. G., Martino, G. (2011). T regulatory cells are markers of disease activity in multiple sclerosis patients. *PLoS One*, 6(6), e21386.
69. Long, S. A., Buckner, J. H. (2011). CD4+ FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol*, 187(5), 2061-2066.

70. Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N., Mills, K. H. G. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*, 162(1), 1-11.
71. Comi, G. (2013). Disease-modifying treatments for progressive multiple sclerosis. *Multip Scler J*, 19(11), 1428-1436.
72. Durelli, L., Verdun, E., Barbero, P., Bergui, M., Versino, E., Ghezzi, A., Zaffaroni, M. (2002). Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet*, 359(9316), 1453-1460.
73. Balak, D. M., Hengstman, G. J., Çakmak, A., Thio, H. B. (2012). Cutaneous adverse events associated with disease-modifying treatment in multiple sclerosis: a systematic review. *Multip Scler J*, 18(12), 1705-1717.
74. Abokrysha, N. (2010). Iranian J of Medical Hypotheses and Ideas. *Irn J Med Hypot Id*, 4, 5.
75. Yurtsever, I., Hakyemez, B., Taskapilioglu, O., Erdogan, C., Turan, O. F., Parlak, M. (2008). The contribution of diffusion-weighted MR imaging in multiple sclerosis during acute attack. *Eur J Radiol*, 65(3), 421-426.
76. Marriott, J. J., O'Connor, P. W. (2010). Lessons learned from long-term multiple sclerosis treatment trials. *Multip Scler*, 16(9), 1028-1030.
77. Márquez-Rebollo, C., Vergara-Carrasco, L., Díaz-Navarro, R., Rubio-Fernández, D., Francoli-Martínez, P., Sánchez-De la Rosa, R. (2014). Benefit of Endermology on Indurations and Panniculitis/Lipoatrophy During Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis Long-Term Treatment with Glatiramer Acetate. *Adv Therap*, 31(8), 904-914.
78. Berkovich, R., Amezcua, L., Fernandez, M., Subhani, D., Kravtsova, I. (2012). Monthly Pulse Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) or Methylprednisolone Therapy for Long-Term Treatment of Multiple Sclerosis as an Add-On Therapy to beta-Interferons: Current Status of the Pilot Study (P04. 147). *Neurology*, 78(1 Supplement), P04-147.
79. Hill-Cawthorne, G. A., Button, T., Tuohy, O., Jones, J. L., May, K., Somerfield, J., Coles, A. J. (2012). Long term lymphocyte reconstitution

- after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 83(3), 298-304.
80. Gold, R. (2008). Combination therapies in multiple sclerosis. *J Neurol*, 255(1), 51-60.
81. Henze, T., Rieckmann, P., Toyka, K. V. (2006). Symptomatic treatment of multiple sclerosis. *Europ Neurology*, 56(2), 78-105.
82. Bowling, A. C., Ibrahim, R., Stewart, T. M. (2000). Alternative medicine and multiple sclerosis: an objective review from an American perspective. *Int J MS Care*, 2(3), 15-28.
83. McIntire, H. D., McIntire, A. P. (1943). Prognosis of multiple sclerosis. *Archiv Neurol Psychiat*, 50(4), 431-438.
84. Kesselring, J. (1997). [Prognosis in multiple sclerosis]. *Schweiz Med Wochenschr*, 127(12), 500-505.
85. Confavreux, C., Aimard, G., Devic, M. (1980). Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *J Neurol*, 103(2), 281-300.
86. Poser, S., Bauer, H. J., Poser, W. (1982). Prognosis of multiple sclerosis. *Act Neurol Scan*, 65(4), 347-354.
87. Evlice, A., Demir, T., Kaleağası, C., Özcan, F., Demirkıran, M. (2016). Rare onset symptoms in multiple sclerosis. *Act Clin Belg*, 1-4.