

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Patogeneze roztroušené sklerózy

Eva Flídrová

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Eva Havrdová, CSc.

Praha

2007

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a souhlasím s jejím eventuálním zveřejněním v tištěné nebo elektronické podobě.

V Praze dne 3.5.2007

.....

Eva Flídrová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Doc. MUDr. Evě Havrdové, CSc. za vedení této práce a odborné konzultace. Dále moje poděkování patří MUDr. Heleně Marečkové, jejíž zásluhou jsem se naučila práci na průtokovém cytometru. Oběma pak děkuji za jejich čas a ochotu a těším se na naši další spolupráci.

Abstrakt

Roztroušená skleróza patří mezi autoimunitní onemocnění centrální nervové soustavy a klíčovou roli v patogenezi sehrává autoimunopatologická reakce namířená proti myelinovým antigenům nacházejících se v bílé hmotě.

Pohled na patogenetické pochody se stále mění a během posledních let bylo objeveno mnoho zásadních mechanismů. Například množství zničených oligodendrocytů, jež vysvětluje individuální úzdravy z atak nemocných, nebo míra axonální destrukce, které objasňují rozdílné trvalé neurologické deficity pacientů s RS.

To, že CD4+ T lymfocyty jsou centrálními imunitními buňkami rozehrávající imunitní kaskády vedoucí k zánětlivé reakci v CNS, se ví již déle, nově však nabývají na důležitosti dříve opomíjené CD8+ T lymfocyty, které se jedním subtypem účastní na destruktivních mechanismech nemoci a druhým subtypem regulují imunitní reakce a podílejí se na vytváření tolerance k vlastním tkáním. I ostatní regulační T buňky se dostávají do středu zájmu vědců a ukazuje se jejich zásadní úloha. Právě ony rozhodují, zda dojde k progresi onemocnění u jedince či nikoliv.

Rovněž vyšetřovací metody dostaly značného pokroku a magnetická rezonance a vyšetření mozkomíšního moku značně usnadnily stanovení diagnózy.

Cílem mé práce je nejen zpracování novějších poznatků o patogenezi roztroušené sklerózy, ale i pohlédnutí na nemoc jako celku, protože primárním úmyslem všech studií je pomoci pacientům a díky účinné léčbě je navrátit do společenského života

klíčová slova:

autoimunita, CD4+, CD8+, centrální nervová soustava, experimentální alergická encefalomyelitida, myelin, oligodendrocyt, roztroušená skleróza, záněť

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system. The pivot element of the pathogenesis is an autoimmune pathological reaction directed against myelin antigens situated in the white matter.

The existing view on the pathogenesis is still changing and many breakthroughs were made during last years. For example the number of destroyed oligodendrocytes made clear the individual recovers from attacks or a degree of an axonal damage which explained different persistent neurological effects.

It has been known for a long time that CD4+ T lymphocytes are the central immune cells which start immune cascades leading to an inflammatory reaction in the CNS. However on newly evolving concepts in MS pathogenesis have come into the focus CD8+ T lymphocytes. One subtyp of CD8+ participates in destructive mechanism of the disorder and second subtyp regulates immune reaction and it is concerned in formation autotolerance. Other T regulatory cells are discussed in detail and they have been found to play an important role.

The progress of the investigative methods such as the magnetic resonance imaging or the analyses of the cerebrospinal fluid, facilitate the diagnosing.

The primary purpose of all studies is to help patients and offer them new therapeutic opportunities which return them to a social life. Therefore the aim of this study is not only focused on recent developments in MS pathology but also at the disease generally.

Keywords:

autoimmunity, CD4+, CD8+, central nervous system, experimental autoimmune encephalomyelitis, inflammation, myelin, multiple sclerosis, oligodendrocytes

<u>Obsah</u>	
<u>Seznam zkratek</u>	7
<u>Úvod</u>	9
<u>1 Epidemiologie, etiologie</u>	10
1.1 Geografické faktory	10
1.2 Demografické faktory	11
1.3 Migrace	11
1.4 Pohlaví	12
1.5 Hygienické podmínky, urbanizace	12
1.6 Virová a bakteriální infekce	12
1.7 Genetické faktory	13
<u>2 Typy, průběh a prognóza nemoci</u>	13
2.1 Typy a průběh onemocnění	13
2.2 Prognóza	15
<u>3 Patogeneze roztroušené sklerózy</u>	16
3.1 Zvířecí model RS	16
3.2 Iniciace RS - narušení principu tolerance vlastního	16
3.3 Klonální expanze T lymfocytů charakteru CD4+ a jejich vstup HEB	19
3.4 Myelin – terč autoreaktivních T lymfocytů	20
3.5 Aktivace glií a makrofágů	22
3.6 Plasmatické buňky, intratekální produkce imunoglobulinů	23
3.7 Role CD8+ T buněk	24
3.8 Demyelinizace a axonální degenerace	24
3.9 Osud oligodendrocytů, remyelinizace	26
3.10 Reparace poškozené tkáň	28
<u>4 Klinické příznaky</u>	31
<u>5 Pomocné vyšetřovací metody – určení diagnózy</u>	31
5.1 Magnetická rezonance (Magnetic Resonance Imaging, MRI)	32
5.2 Vyšetření mozkomíšního moku	33
5.2.1 Cytologie	34
5.2.2 Propustnost hemato-likvorové bariéry	34
5.2.3 Oligoklonální IgG proužky	34
5.2.4 Kvantitativní stanovení intratekální syntézy IgG, IgM, IgA	35
5.2.5 MRZ reakce	36
5.2.6 Vyšetření likvoru na průtokovém cytometru	36
5.3 Evokované potenciály	37
5.4 Oftalmologické vyšetření	38
5.5 Imunologické vyšetření periferní krve	39
<u>6 Terapie</u>	39
6.1 Léčba ataky RS	39
6.2 Možnosti dlouhodobé terapie	40
6.3 Experimentální terapie	41
6.4 Symptomatická terapie	42
<u>7 Budoucí směr mé práce</u>	42
<u>Závěr</u>	43
<u>Seznam použité literatury</u>	44
<u>Přílohy</u>	47

Seznam zkratk

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
APC	antigen prezentující buňky
CCR	chemokinový receptor
CD znaky	cluster of differentiation, lymfocytární antigeny
CMV	cytomegalovirus
CNS	centrální nervový systém
CXCR	chemokinový receptor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAE	experimentální alergická encefalomyelitida
EBV	Epstein-Barrův virus
EBNA	Epstein-Barrův nukleární antigen
EDSS	rozšířená stupnice stavu invalidity
ERG	elektroretinogram
GA	glatiramer acetát
HLA	human leukocyte antigens
HEB	hematoencefalická bariéra
HSP	heat shock protein
HSV	herpes simplex virus
ICAM	intercelulární adhezivní molekula
IFN	interferon
IL	interleukin
MAG	glykoprotein asociovaný s myelinem
MBP	myelinový bazický protein
MCP	membránový kofaktorový protein
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MIP	makrofágový chemotaktický protein
MMP	matrixová metaloproteináza
MOG	myelinový oligodendrocytární glykoprotein
MRI	magnetic resonance imaging
NADP	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NK	natural killer, přirozený zabíječ
NO	oxid dusnatý
NF κ B	nukleární faktor kappa B
ODC	oligodendrocyt
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy

PLP	proteolipid protein
PML	progresivní multifokální leukoencefalopatie
RA	označení subpopulace naivních CD4+ T lymfocytů
RANTES	chemotaktický faktor
RO	označení subpopulace paměťových CD4+ T lymfocytů
RS	roztroušená skleróza
TCR	T buněčný receptor
T _H	pomocný T lymfocyt
TNF	tumor nekrotizující faktor
T _R	regulační T lymfocyt
VCAM	vaskulární adhezivní molekula
VLA	pozdní aktivační antigen
VZV	varicella zoster virus

Úvod

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je chronické zánětlivé neurologické onemocnění, které je charakterizováno jak demyelinizací nervových vláken, tak jejich přímou ztrátou v centrálním nervovém systému (CNS). RS je nejčastější příčinou invalidity mladších věkových skupin z neurologické příčiny v naší zeměpisné šířce. Většina lidí je postižena mezi 20 a 40 lety a ženy dvakrát častěji než muži. Je řazena mezi autoimunitní onemocnění, kdy imunitní reakce vede k poškození vlastní tkáně, přičemž jako hlavní antigeny jsou prezentovány proteiny myelinové pochvy, obalující nervová vlákna.

Příčiny vzniku nejsou stále zcela známy, vedle sebe se promítají genetické dispozice a environmentální faktory. Komplexita a různorodost těchto vlivů zatím nedovoluje činit jednoznačné závěry v otázkách rizika vzniku.

Nejedná se o nemoc přenosnou.

V současné době neexistuje léčba, jež by vedla k úplnému uzdravení.

Má práce chce nastínit patogenetické mechanismy této nemoci, které jsou v současnosti hojně studovány a pomáhají nám pochopit klinické projevy RS, a jsou nutnou znalostí pro vývoj nových terapeutických možností. Ačkoliv se zaměřuji na patogenezi, považuji za nevyhnutelné zmínit se o nemoci jako celku, tedy i o průběhu, typech RS, klinických příznacích, diagnostických a terapeutických schopnostech dnešní medicíny.

Proč právě RS? Tato choroba mě zaujala hned z několika důvodů. Jako studentku, která se zajímá o imunologii a neurobiologii, je RS ideálním příkladem, kde se tyto dvě odvětví kříží. Jako mladou ženu, kdy mi není lhostejné, že právě mé vrstevnice až po ženy ve věku mé matky, jsou nejohroženější skupinou. A naposledy jako budoucí vědkyni mě láká příležitost objevit něco nového, protože naše vědomosti v patogenezi RS mají stále trhliny.

1 Epidemiologie, etiologie

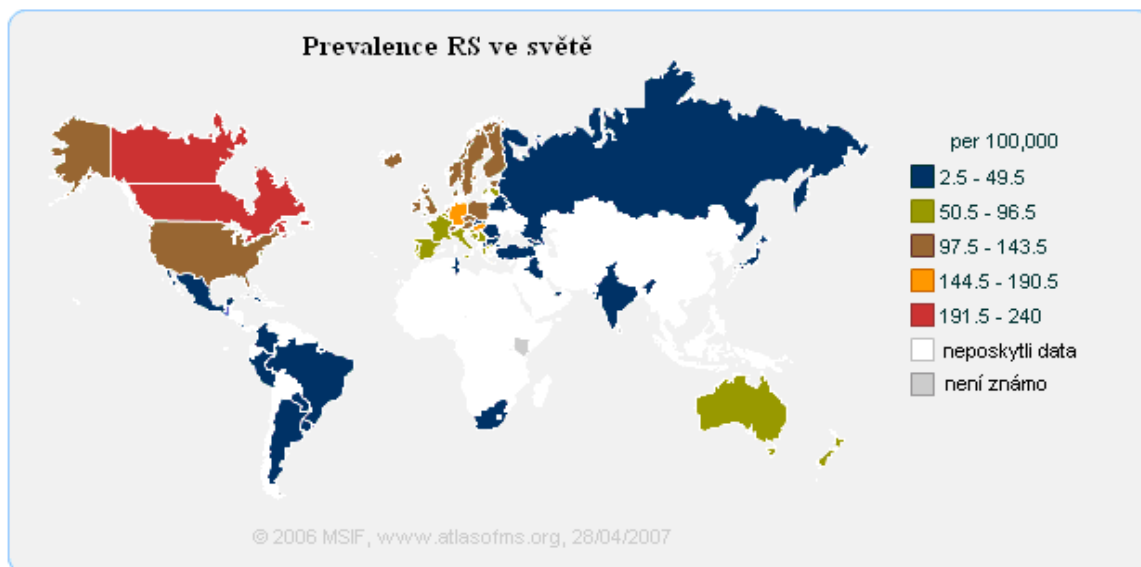
Na celém světě je odhadováno dva a půl miliónů nemocných. V České republice je přibližně každý tisící obyvatel nemocný, tedy jedno promile obyvatelstva.

1.1 Geografické faktory

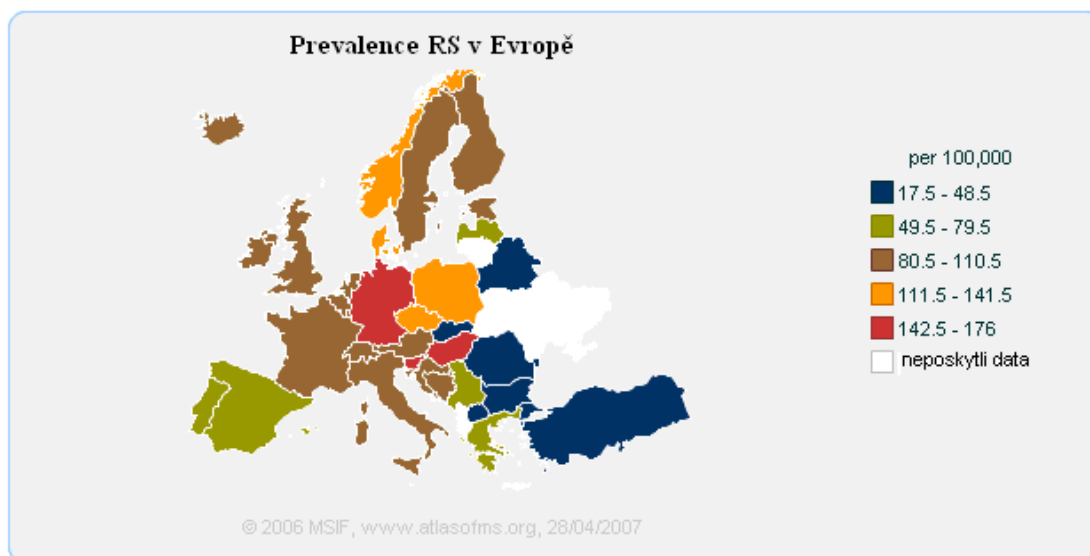
Vzorec výskytu nemoci svědčí o existenci určitých zón různého rizika, které do značné míry sledují zeměpisnou šířku. Incidence RS vzrůstá ve státech vzdálenějších od rovníku. Nejhojnější je v mírném pásmu severní polokoule. Oblasti vysokého rizika, tzn. oblasti s prevalencí více než 30 nemocných na 100 000 obyvatel, jsou: severní Evropa, severní část USA, jižní Kanada, jižní Austrálie a Nový Zéland. Zjevnější je závislost na zeměpisné šířce v zemích s rasově homogenní populací.

Další teorie navrhuje souvislost mezi snížením sluneční expozice a poklesem vitamínu D, který je jak se ukázalo významným imunoregulátorem (6). Tlumí činnost makrofágů a u pokusných zvířat potlačuje rozvoj zvířecího modelu RS – experimentální alergické encefalomyelitidy.

Obrázek 1. Prevalence RS ve světě



Obrázek 2. Prevalence RS v Evropě



1.2 Demografické faktory

Prevalence RS je nejvyšší v severní Evropě a v zemích osídlených evropskými vystěhovalci. Existují i skupiny obyvatel, většinou kulturně a geneticky oddělené, kteří tuto chorobu v podstatě neznají, jedná se například o americké Indiány, Eskymáky, Laponce či Maory. Všeobecně můžeme říci, že vnímavost indoevropské rasy k onemocnění je největší a naopak u obyvatel černošského původu nejmenší. Ovšem neplatí to absolutně a znamená to, že rasová vnímavost není jediným a rozhodujícím faktorem vzniku nemoci.

1.3 Migrace

Vliv migrace na prevalenci RS je hojně studována na obyvatelích Izraele. Jedná se o relativně malé geografické území s rozdílnými etnickými skupinami, bohatě dotovanými zdravotními zařízeními a s národním registrem pacientů. (National MS Registr).

Například jedna studie izraelských vědců porovnávala etnickou skupinu stejného původu, narozenou a žijící v rozdílných geografických podmínkách. Zjistili, že židovští imigranti z Asie a Afriky mají mnohem menší prevalenci RS než Židé původem také z Asie a Afriky, ale rodilí Izraelci, přestože tyto skupiny měli stejnou genetickou náchylnost k chorobě (8). Z toho vyplývá, že děti, již narozené v zemi, kam imigrovali jejich rodiče, mají stejné riziko vzniku nemoci, jaké se vyskytuje v dané oblasti. Migrační studie dávají tušit, že schopnost onemocnět RS se zakládá v dětství, nejspíše do 15 let.

Poslední studie z roku 2006 přišly však s tím, že rozdílné populace žijící na stejném místě mohou mít podstatně odlišnou frekvenci nemoci (7), čímž si protirečí, a proto jsou dnes migrační studie hodnoceny s velkou opatrností, jelikož jsou zatíženy řadou metodologických chyb.

1.4 Pohlaví

Populační studie jasně ukazují, že RS se vyskytuje u žen až s 50% větší frekvencí než u mužů, v poměru 2:1. U časného začátku nemoci - před 16. rokem - je poměr mezi dívkami a chlapci dokonce 3:1 a u pozdního začátku - po 45. roce - je poměr žen a mužů 2,4:1. U časného a pozdního nástupu nemoci u žen, se předpokládá vliv výkyvů hormonů na imunitní systém (menarche a puberta, menopauza).

1.5 Hygienické podmínky, urbanizace

Z předběžných výsledků studií vyplývá, že RS se častěji vyskytuje u obyvatel s vyšším hygienickým standardem a lepšími zdravotními podmínkami, podobně jako většina autoimunitních nemocí.

Změna životního stylu zapříčiněná rozvojem technologií a urbanizací je rovněž spojována se zvýšením rizika onemocnění RS. Na toto téma je třeba provést další výzkumy.

1.6 Virová a bakteriální infekce

RS je podle dnešních představ autoimunitní onemocnění, což ovšem nevyklučuje účast infekčního agens při indukcii autoimunity. Předpokládá se, že jedním ze spouštěcích faktorů může být chronická virová infekce například virem Epstein-Barrové (herpesvirus). Epidemiologické průzkumy potvrdili, že pokročilá EBV infekce zvyšuje riziko vzniku RS. U pacientů s RS znovuprobuzení viru zesiluje zánětlivou aktivitu nemoci a protilátky proti EBV byly u nich nalezeny v séru i cerebrospinálním moku (11). Zejména IgA proti EBV virovým kapsidovým antigenům a IgG proti jaderným antigenům. Nalezení IgG proti EBNA komplexu nebo EBNA-1 v séru se ukázaly jako nejsilnější predikční markery onemocnění (9). Německá studie zkoumala specifitu protilátek IgG pacientů s RS a zmapovala proteinové epitopy, na které se imunoglobuliny vázaly s největší afinitou. Mezi dva nejvíce frekvencované patřily peptidové sekvence získané z EBV proteinů exprimovaných infikovanými buňkami, konkrétně opět EBNA-1 a BRRF2 (12). I běžné viry spalniček (paramyxovirus), viry chřipky, parainfluenzy či herpes mohou být spouštěčem nemoci. Mnohá virová agens mají dokonce tropismus k nervovým tkáním. Do CNS prostupují přes hematoencefalickou bariéru (HEB) přenesením buňkami imunitního systému nebo se šíří centripetálně po nervových vláknech. Jejich přítomnost samozřejmě vede k indukcii imunitní odpovědi (10). Řada atak nemoci přichází po právě prodělaných virových infektech. Zvažuje se i antigenní podobnost některých částí virů s antigeny myelinu, jedná se o tzv. molekulární mimikry. Dalším kandidátem, tentokrát bakteriálním, se zabývala Vanderbiltova lékařská fakulta v Nashvillu, a to Chlamydií pneumoni. Prokázala zvýšenou přítomnost Ch. pneumoni v cerebrospinálním moku pacientů s RS

oproti pacientům s jinými neurologickými nemocemi (13). U chlamydiových infekcí je poškození tkání způsobeno imunitními mechanizmy.

Úloha infekcí není dodnes jednoznačně objasněna.

1.7 Genetické faktory

RS není striktně dědičné onemocnění, nicméně zdá se, že genetické pozadí hraje roli v citlivosti osob k chorobě. Je potvrzen častější výskyt RS u příbuzných pacientů než v ostatní populaci a to s rizikem: pro jednovaječná dvojčata až 30%, dvojevaječná dvojčata a sourozence 4%, rodiče 3%, děti 2,5%, strýce, tety, bratrance, sestřenice, neteře a synovce pod 2%. Nejvyšší riziko u sourozenců znamená, že geny zodpovědné za vnímavost mají recesivní způsob dědičnosti. Zároveň musíme vzít v úvahu stejné vlivy environmentální, které sourozenci většinou sdílí.

Hlavními aspiračními geny pro vznik RS jsou bezpochyby geny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC u člověka označované HLA). Zkoumání v severní Evropě a Americe objevilo tři HLA, jež jsou častější u lidí s RS než celkově v populaci, a to D2, DQW1 a DQB1 (jedná se o MHC molekuly II. třídy). Studií amerických pacientů se přišlo na to, že tyto HLA jsou vystaveny v kombinacích - to je, mají více jak jednu ze tří HLA - na buňkách s větší frekvencí než ve zbytku populace. Mimoto, je zde důvod domnívat se, že rozdílná kombinace HLA koresponduje s variantami nemoci (viz 2.1).

Spolupodílet se dále mohou geny pro TcR (T-cell receptor) řetězce, konstantní a variabilní části imunoglobulinových molekul, geny pro některé složky komplementu, geny pro prozánětlivé cytokiny jako je např. tumor nekrotizující faktor, jehož nadměrná tvorba vede k aktivaci zánětlivých buněk a možná geny pro struktury myelinu.

Výzkum genetických podkladů RS ztěžuje fakt, že některé lokusy jsou vysoce polymorfní, dále efekt jednoho lokusu může být ovlivněn či zrušen jiným lokusem.

2 Typy, průběh a prognóza nemoci

2.1 Typy a průběh onemocnění

Průběh nemoci může být ve svém výsledku benigní i maligní. Někteří pacienti jsou postiženi nemocí minimálně - benigní průběh, zatímco jiní mají rychlý vývoj k úplné invaliditě - maligní průběh, ke ztrátě hybnosti dochází do 2-3 let. Směr vývoje je nepochybně dán brzkou aktivací resp. selháním mechanismů suprese imunitního systému a mírou axonálního poškození v lézích. Velmi často začíná choroba zcela nespecificky, například horečnatým onemocněním, které ustoupí a zanechá klinické i laboratorní projevy RS.

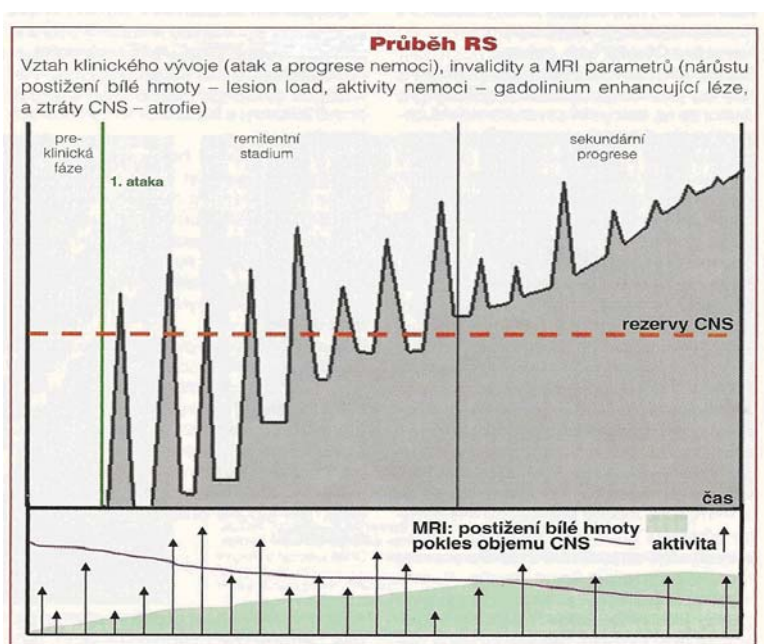
Pro RS je typický náhlý vznik potíží a neurologického nálezu, jenž však může spontánně zcela odeznít. Tento náhlý vznik příznaků se nazývá ataka (klinický důkaz zánětlivé činnosti) nebo při opakování relaps nemoci. Spontánní či léčbou navozené zlepšení stavu se nazývá remisí.

Histologicky se nacházejí roztroušená ložiska ztráty myelinu, v akutním stadiu s perivaskulárním infiltrátem, v chronickém stadiu nahrazená astroglální jizvou.

Ačkoliv každý jedinec má různé kombinace symptomů RS, podle průběhu můžeme RS rozdělit do čtyř typů:

- remitentní – relabující: představuje typ, kterým onemocnění většinou začíná až u 80%. Probíhá v atakách a remisích po dobu několika let. Pokud ataky nezanechaly žádný neurologický deficit, remise jsou bezpříznakové. Přibližně po 10 letech se u každého druhého pacienta nemoc rozvine do další fáze:
- sekundárně chronicko – progresivní: je charakterizována zhoršováním stavu pacienta a částečnou invalidizací s výskytem nebo bez přítomnosti relapsů. Opravné mechanismy CNS jsou vyčerpány.
- primárně progresivní: vyskytuje se v méně častých případech např. u lidí, jež onemocněli v pozdějším věku (mezi 40-50 lety) a častěji u mužů. Tato forma má do jisté míry individuální průběh. Ataky nejsou příliš zřetelné, ale postupně dochází k zhoršení symptomů.
- relabující – progresivní: prognosticky nepříznivá forma nemoci, kdy každá ataka způsobuje trvalé poškození neurologického charakteru a v klidové fázi nedochází k ozdravným procesům vůbec, či jen z nepatrné části.

Obrázek 3. Průběh RS.



2.2 Prognóza

Podle rychlosti progresu, tedy míry malignity, lze orientačně odhadnout prognózu onemocnění, která závisí na počtu relapsů. Dnes se zdá, že čím více jich proběhne v prvních dvou letech choroby, tím dříve lze očekávat plnou invaliditu. Dále na době, jenž uplynula mezi prvním a druhým relapsem, na počtu lézích při prvních klinických příznacích a míře atrofie CNS, na době dosažení třetího stupně na stupnici škály klinického postižení tzv. Kurtzkeho Expanded Disability Status Scale, EDSS, Rozšířená stupnice stavu invalidity. EDSS hodnotí ve vztahu k RS zhoršení osmi funkčních systémů. V tomto systému představuje hodnota 0 normální neurologický nálezn, hodnotou 10 se označuje úmrtí v důsledku RS.

Tabulka 1. Kurtzkeho škála postižení hybnosti

Funkční skupiny (FS)	Stupeň postižení							
	0	1	2	3	4	5	6	
Pyramidové funkce	normální	Abnormální příznaky bez poruchy funkce	Minimální porucha	Lehká nebo střední para-, hemiparéza, těžká monoparéza	Těžká para-, hemiparéza, středně těžká quadraparéza, monoplegie	Paraplegie, hemiplegie, těžká quadraparéza	kvadruplegie	
Mozečkové funkce	normální	Abnormální příznaky bez poruchy funkce	Lehká ataxie	Středně těžká ataxie trupu a končetin	Těžká ataxie všech končetin	Neschopnost koordinovaného pohybu v důsledku ataxie	—	
Kmenové funkce	normální	Abnormální příznaky bez poruchy funkce	Ječný nystagmus nebo lehká porucha	Hrubý nystagmus, výrazná porucha okohybná	Významná dysartrie	Neschopnost polykat nebo mluvit	—	
Senzorické funkce	normální	Minimální porucha pro vibraci na 1–2 končetinách	Lehká porucha čítí pro dotyk, bolest a polohocit, event. střední porucha pro vibraci na 1–2 končetinách	Středně těžká porucha čítí pro dotyk, bolest a polohocit, event. ztráta čítí pro vibraci na 1–2 končetinách	Těžká porucha čítí pro dotyk, bolest a polohocit na 1–2, event. více končetinách	Ztráta senzitivní funkce pro všechny kvality na 1–2 končetinách, event. středně těžká porucha čítí pro dotyk, bolest a polohocit celého těla vyjma hlavy	Ztráta senzitivní funkce pro všechny kvality vyjma hlavy	
Funkce střev a močového měchýře	normální	Lehká porucha	Střední porucha	Častá močová inkontinence	Potíba nebo permanentní katetrizace močového měchýře	Ztráta funkce močového měchýře	Ztráta vylučovací funkce střev a močového měchýře	
Znakové funkce	normální	Skotom při lepším visu než 5/7,5	Horší oko se skotomem	Horší oko s velkým skotomem, event. několika menšími skotomy	Horší oko s významným zmenšením zorného pole, lepší oko st. 3	Lepší oko st. 4	Lepší oko st. 5	
Mentální funkce	normální	Alterace náiaay	Lehký pokles intelektových funkcí	Středně těžký pokles intelektových funkcí	Těžký pokles intelektových funkcí	Demence	—	
Ostatní funkce	normální	Další specifické neurologické příznaky pro MS	—	—	—	—	—	
EDSS	0,0	Normální neurologický nálezn						
	1,0	St. 1 u 1 FS						
	2,0	St. 2 u 1 FS						
	3,0	St. 3 u 1 FS nebo st. 2 u 3–4 FS						
	4,0	St. 4 u 1 FS nebo kombinace nižších stupňů při překročení definice předchozích						
	5,0	St. 5 u 1 FS nebo kombinace nižších stupňů při překročení definice předchozích						
	6,0	St. 3 u 2 FS						
	7,0	St. 4 u 2 FS						
	8,0	St. 4 u rozhodujících FS						
	9,0	St. 4 u všech FS						
	10,0	Smrt následkem MS						

3 Patogeneze roztroušené sklerózy

Jak již bylo řečeno, RS patří mezi autoimunitní neurodegenerativní zánětlivé onemocnění, o jehož patogenезi se vedou stále spory. V geneticky disponovaném jedinci vlivem ne zcela známých vnějších faktorů, které velmi pravděpodobně zahrnují působení infekčních agens, dojde k nastartování autoimunopatologické reaktivity. A to uvolněním autoantigenů, jež jsou zpracovány a vystaveny antigen prezentujícími buňkami (APC) na HLA molekulách, následuje aktivace autoreaktivních T lymfocytů a jejich infiltrace do míst, kde se nachází autoantigen, v tomto případě do CNS. Důsledkem zánětlivé odpovědi, kterou T lymfocyty vyvolají v CNS, je demyelinizace, smrt oligodendrocytů, axonální ztráta, glióza a neurodegenerace.

CNS byl dlouho považován za imunoprivilegovaný orgán nepodléhající imunitní „surveillance“, ovšem jak se ukázalo, při celkových infekčních onemocněních postihujících nervový systém, dochází působením cytokinů k masivnímu rozvolňování hematoencefalické bariéry (HEB) a možnému pronikání buněk imunitního systému do mozku.

K řadě patogenetických poznatků vedlo vytvoření zvířecího modelu nazvaného Experimentální alergická encefalomyelitida (EAE).

3.1 Zvířecí model RS

Základní zvířecí model RS je experimentální alergická encefalomyelitida, EAE. Je indukována v geneticky vnímavém kmeni inbredních myší parenterální aplikací imunogenních složek myelinu (myelinový bazický protein – MBP, myelinový oligodendrocytární glykoprotein - MOG, s myelinem asociovaný glykoprotein – MAG, proteolipid protein - PLP) spolu s tzv. Freundovým adjuvans. Freundovo adjuvans je suspenze usmrcených mykobakterií kmene BCG v purifikovaném rostlinném oleji, zvyšující antigenní vlastnosti očkovací látky a na níž je antigen adsorbován. Další možností, jak nemoc vyvolat, je přímým přenesením antigenně specifických senzitivovaných CD4+ T lymfocytů nebo zprostředkovat protilátkami proti myelinovým strukturám. U takto ovlivněných zvířat se vyvíjí onemocnění, které se histopatologicky i klinickým průběhem podobá RS člověka.

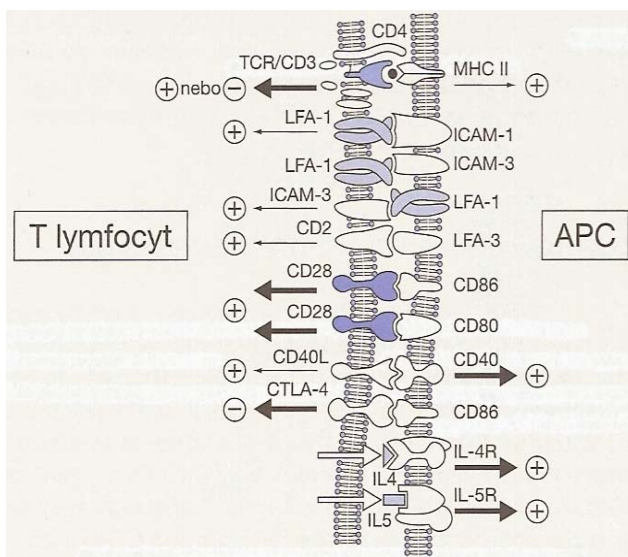
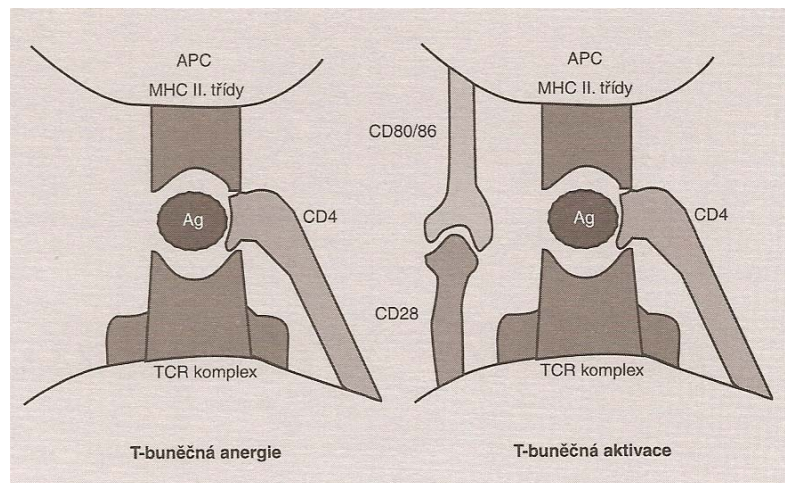
Výsledky transferových modelů se používají ke studiu mechanismů imunitní surveillance a zánětů v CNS.

3.2 Iniclace RS - narušení principu tolerance vlastního

Podle této koncepce sehrávají ústřední roli v udržení tolerance vlastního T lymfocyty a jsou proto považovány za iniciátory nemoci.

Během thymového vývoje T lymfocytů dochází k přeskupování genů kódujících variabilní části jejich TcR, což vede ke vzniku ohromného množství TcR s různou specifitou, mezi nimiž se nepochybně vyskytují i receptory s reaktivitou proti vlastním strukturám. Po tomto přeskupení je realizována tzv. pozitivní selekce, to je eliminace buněk, které nejsou schopny rozeznávat HLA molekuly, následovaná tzv. negativní selekcí. V ní jsou likvidovány buňky s vysokou afinitou k „self“ antigenům, buňky autoreaktivní, avšak lymfocyty méně agresivní eliminovány nejsou a zůstávají součástí imunitního repertoáru ve stavu jakéhosi spánku, tzn. jsou schopny pomnožení po velmi silném aktivačním podnětu nebo opakované stimulaci. Tento paradox je řešen tím, že T lymfocyt ke své aktivaci a klonální expanzi potřebuje I. signál zprostředkovaný TcR a řadu II. kostimulačních signálů, označovaných jako kontext rozpoznávání. Pokud lymfocytu není poskytnuta dostatečná stimulace II. signálem, je v něm indukován proces apoptózy nebo je funkčně vyřazen, anergizován.

Obrázek 4. Vazba antigenu na TcR. Bez kostimulačního signálu tato interakce vede k anergizaci T buňky.



Obrázek 5. Kostimulační signály při interakci antigen prezentující buňky s T lymfocitem. Mohou být stimulační nebo inhibiční.

Při porovnání přítomnosti autoreaktivních T lymfocytů u nemocných RS a zdravých osob byla nalezena prakticky

totožná frekvence výskytu. Rozdíl je ve schopnosti těchto buněk klonálně expandovat na určitý aktivační podnět. U pacientů s RS dojde k takovému pomnožení, které je už kritické pro zahájení autoagresivního útoku a T lymfocyty začnou aktivně vyhledávat cílový orgán obsahující antigeny, pro něž jsou specifické.

Ukazuje se, že HEB není tak neprostupná pro buňky imunitního systému, jak se soudilo. To bylo například prokázáno na modelu EAE, kdy imunitní tolerance k antigenům myelinu byla navozena vně CNS, konkrétně v brzlíku a sekundárních lymfoidních orgánech (16). Je tedy pravděpodobné, že cesta skrz HEB je otevřena v obou směrech a autoreaktivní T lymfocyty se dostávají do styku s mozgovými strukturami. Za normálních okolností ale k zánětlivé reakci nedochází, protože lymfocytům není poskytnut kontext rozpoznávání. Okolnostmi, které vedou k aktivaci a namnožení autoreaktivních T lymfocytů jsou velmi pravděpodobně virové infekce (viz 1.6), kdy kontext rozpoznávání je nespecifický a přítomnost obranného zánětu může poskytnout kontext rozpoznávání pro autoreaktivní T buňky, nebo virové antigeny mohou spustit reakci zcela nespecificky jako tzv. superantigeny. Významnou roli ve spuštění a udržení zánětu mají cytokiny, produkované buňkami prezentujícími antigen (makrofágy, dendritické buňky, APC) po rozeznání mikrobiálních agens tzv. s patogenem asociovaných molekulových vzorů, PAMP – Pathogen Associated Molecular Pattern. V APC dojde k aktivaci signální cesty NF κ B a výsledkem je tvorba prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, IL-12, TNF α , IFN γ), zvýšená exprese HLA I. a II. třídy, kostimulačních a adhezních molekul.

Dále následkem obranného zánětu se poškodí buněčné struktury CNS a objeví se nové peptidy, což jsou autoantigeny běžně nedostupné pro imunitní systém např. intracelulární antigeny, s kterými se T lymfocyt v thymu nesetkal a reaguje na ně jako na signál nebezpečí. Jedná se o tzv. „danger model“. Imunitní reakce prohlubuje místní zánět a odhaluje tak další kryptické autoantigeny. Tomuto jevu se říká „determinant spreading“.

V případě EAE je zahájení reaktivity vůči imunodominantnímu epitopu myelinového bazického proteinu (MBP) na pozicích aminokyselin 84 – 100. Zahájený imunopatologický proces vede k destrukci nervových tkání a uvolnění většího množství autoantigenů. Poškozující záněťová reakce zajistí zesílené cytokinové mikroprostředí a zvýšenou expresi kostimulačních a akcesorních molekul na antigen prezentujících buňkách. Tím je zabezpečena dostatečná úroveň druhých aktivačních signálů a při dlouhodobém sledování nemocných s RS je možné vidět, že se postupně začínají objevovat autoreaktivní T lymfocyty zaměřené proti dalším imunodominantním epitopům MBP a postupně se rozšiřují i vůči dalším proteinům myelinu (MAG, MOG a PLP). Z uvedeného je patrné, že autoimunitní imunopatologické procesy mají sebezesilující potenciál a zahrnují další a další terče.

3.3 Klonální expanze T lymfocytů charakteru CD4+ a jejich prostup HEB

Vlivem prozánětlivého cytokinového prostředí zprostředkovaného makrofágy, se T lymfocyty aktivují a prekurzorové CD4+ T_H buňky se vyvíjejí směrem k T_H1 subpopulaci, jež se množí, syntetizuje IL-1, IL-2, TNFβ a zpětně aktivuje další makrofágy svými cytokiny zejména IFNγ. Makrofágy produkují TNF. Makrofágy a T_H1 se tedy vzájemně podporují v rozšiřování zánětlivé reakce. V takovémto vzniklém cytokinovém prostředí se začnou aktivovat endotelové buňky cévních kapilár v CNS a zvyšují expresi adhezních molekul ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) a E-selektinu a umožňují tak „homing“ lymfocytů, na kterých je více exprimováno L-selektinů a integrinových molekul VLA-4 (Very Late Antigen), LFA-1 (Leukocyte Function associated Antigen) a CD44. T lymfocyty dokáží také snížit elektrické napětí endoteliálních buněk, které je významnou složkou nepropustnosti bariéry.

Vstup invadujících buněk do CNS není nahodilý a ve všech místech stejný, naopak je přesně regulovaný prostřednictvím chemokinů, cytokinů s chemotaktickou aktivitou usměrňující pohyb buněk a zajišťující nábor a akumulaci buněk imunitního systému v místě zánětu. Jsou produkovány zejména makrofágy, dendritickými buňkami, ale také mikroglie a astrocyty v CNS. Receptory pro chemokiny byly nalezeny na všech buněčných komponentách CNS, včetně neuronů. V mozkomíšním moku u nemocných s RS je zvýšena koncentrace C-C chemokinů RANTES (Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted) a MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein) (19). Aktivovaný mozkový endotel jako hlavní chemoatraktanty pro monocyty produkuje protein 1 a IL-8 (20)

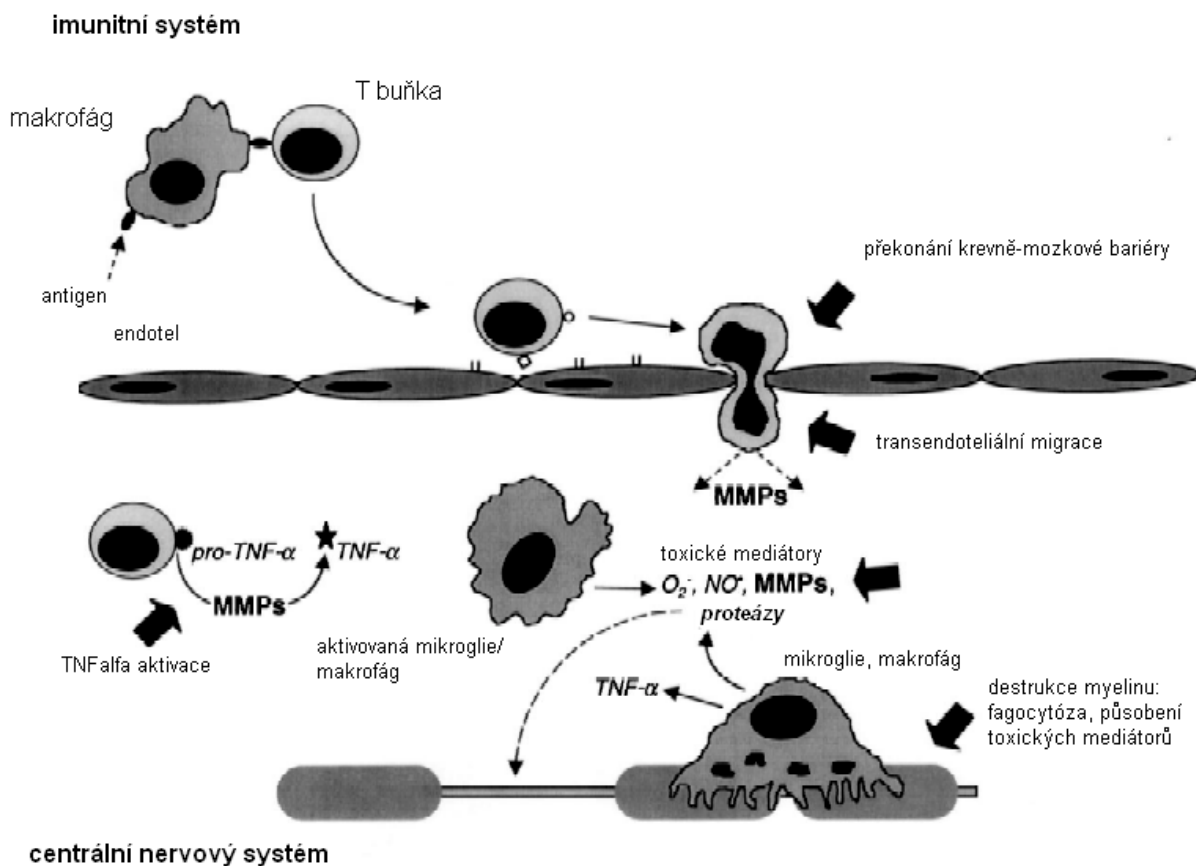
Adhezní interakce jsou zásadní pro průnik přes HEB a je na ně zaměřena pozornost při výzkumu nových terapeutických možností.

Místem prostupu imunitních buněk do CNS, jak se při studiích jasně prokázalo, jsou cirkumventrikulární orgány, zejména chorioidní plexy, které jsou aktivovány během modelového EAE. To se projeví zvýšenou expresí ICAM-1 a VCAM-1 na fenestrováných kapilárách cirkumventrikulárních orgánů a významnou up-regulací MHC molekul I. i II. třídy (17).

Po průniku vrstvou endotelu musí T buňky překonat mezibuněčnou hmotu, tvořící bazální membránu kapilár. Děje se tak pomocí proteolytických enzymů, označovaných jako matrixové metaloproteinázy (MMP). I ty slouží jako chemoatraktanty pro buňky imunitního systému (20). U pacientů s RS byla v mozkomíšním moku doložena zvýšená hladina MMP a jejich inhibitorů, zejména MMP-9 (gelatinóza B) (18). MMP inhibitory jsou schopni redukovat migraci lymfocytů o 50% (20).

Po zdolání krevně – mozkové bariéry začnou aktivované T buňky mizet z krevního oběhu. Je to doba před klinickým zahájením ataky.

Obrázek 6. Působení metaloproteináz v patogenezi RS



3.4 Myelin – terč autoreaktivních T lymfocytů

Další částí patogenetického řetězce je rozeznávání jednotlivých antigenů bílé hmoty v CNS, konkrétně myelinových antigenů.

Myelin je lipidový obal nervových vláken, který je od sebe vzájemně odděluje a elektricky izoluje. Tím zvyšuje rychlost nervového vzruchu, která je 5–10 násobná v porovnání s rychlostí vedení vzruchu na nemyelinizovaném vlákně o stejném průměru. Myelin je uspořádán do segmentů oddělených Ranvierovými zářezy, kde probíhá „saltatorní“ vedení vzruchu.

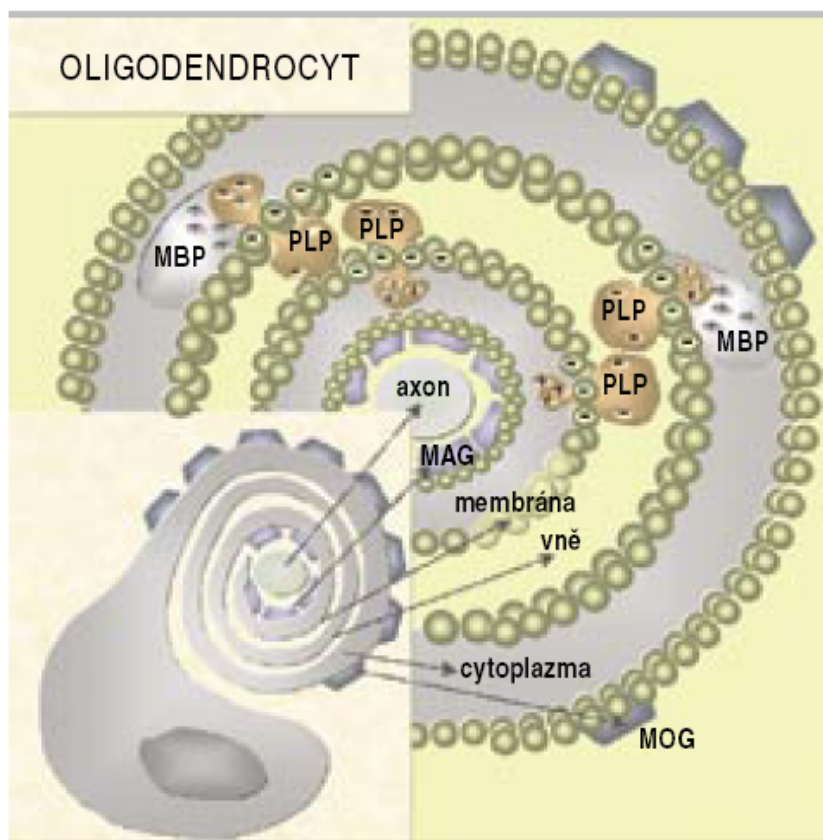
Jeho zdroj se liší v CNS a periferní nervové soustavě (PNS). V PNS je tvořen Schwannovými buňkami. Jedna Schwannova buňka vytváří jeden segment myelinu pro jeden axon. Centrální myelin je produkován oligodendrocyty, natahují své výběžky k několika axonům a formují vždy jedno internodium na tomto axonu. Mnohonásobným obtáčením membrány buněk kolem vláken a vytlačováním cytoplasmy vznikají husté laminární struktury z lipidů a membránových proteinů, myelin.

Prostory mezi vrstvami myelinu jsou extracelulární. V periaxonálním prostoru, tj. nejblíže axonu, je lokalizován MAG (Myelin-Associated Protein), jeden z terčů autoreaktivity u nemocných s RS, který zajišťuje interakci s neuronální membránou a tvoří asi 1% myelinových proteinů. Na vnější straně myelinové vrstvy se nachází MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein). Protilátky proti němu mohou způsobit demyelinizaci. Nejvíce zastoupeným proteinem je transmembránový PLP (ProteoLipid Peptide), a to až z 50-ti procent. Zodpovídá za adhezi zevních vrstev membrány. Uvnitř je lokalizován hlavní terč autoimunitní reakce, MBP (myelinový bazický protein), jenž v centrálním myelinu tvoří asi 30% jeho proteinové složky.

Imunodominantní epitopy MBP, zjištěné u modelu EAE, jsou aminokyselinové zbytky na pozicích 84–100. Na pozicích 84–101 tohoto proteinu byly prokázány shody se sekvencemi hemaglutininu viru chřipky, dřevovým proteinem adenovirů, polymerázou HBV, proteiny virů spalniček, HSV a EBV. Opět na modelu EAE bylo prokázáno, že k indukci onemocnění postačí shoda ve čtyřech aminokyselinách v MBP (37).

MBP je považován za nejdůležitější autoantigen v patogenezi RS.

Obrázek 7. Hlavní terče autoimunitní reakce – myelinové antigeny – u RS



3.5 Aktivace glií a makrofágů

Průnik hematoencefalickou bariérou se týká nejprve jen ojedinělých autoreaktivních senzitivovaných T lymfocytů, které však produkcí $IFN\gamma$ aktivují gliu a makrofágy a zvýšením produkce adhezivních molekul na endotelii připravují masivní průnik pro T i B lymfocyty bariérou.

Prakticky žádná činnost poškozujícího zánětu se neobejde bez regulačního nebo efektorového přispění buněk makrofágového původu. Aktivované makrofágy jsou intenzivně fagocytující buňky a nejvydatnějším zdrojem prozánětlivých cytokinů $TNF\alpha$ a IL-1. Jejich prostřednictvím se zvyšuje prostupnost krevně mozkové bariéry pro leukocyty. Dalšími produkty jsou chemokiny MCP-1 (Macrophage Chemoattractive Protein), MIP-1 α , MIP-1 β a RANTES, jež zajistí akumulaci lymfocytů v místě patologického procesu v CNS. Tím je umožněn vznik typických perivaskulárních infiltrátů (lézí, plak). Jsou klíčové v poskytování kontextu rozpoznávání T lymfocytům a určují, jakým směrem se bude ubírat vyžívání T_H0 lymfocytů.

Makrofágy mohou přímo poškozovat myelinovou pochvu, což bylo potvrzeno po nalezení MBP v makrofázích izolovaných z časných plaků. Mohou také negativně ovlivňovat buňky CNS, např. oligodendrocyty, astrocyty a neurony tvorbou matrixových metaloproteináz. Cytotoxický potenciál mají kyslíkové a dusíkové mediátory, jež jsou konečnými produkty NADPH oxidázy a NO syntázy, enzymatického komplexu pro likvidaci pohlceného materiálu.

Tkáňově vázaným makrofágem v CNS je mikroglie, jejíž spektrum produkce cytokinů po aktivaci je obdobné jako u makrofágů, jedná se opět o prozánětlivé cytokiny. Uvnitř CNS může sloužit jako antigen prezentující buňka, tato funkce je závislá na její aktivaci. Rovněž po aktivaci získává schopnost migrace do místa léze. Kromě tvorby řady toxických substancí (proteolytické a lipolytické enzymy, NO, volné radikály) je mikroglie schopna produkce trofických faktorů nutných pro normální vývoj nervové tkáně, tedy i pro proces reparace a remyelinizace. Trofické faktory syntetizuje poté, co odstraní zbytky myelinu a zničenou tkáň fagocytózou.

Aktivita mikroglie může být významně down-regulována pohlcováním apoptotických autoagresivních T buněk z tkáně, čímž může dojít k ukončení zánětlivé odpovědi v počátcích. Terapeuticky lze tento jev podpořit podáváním interferonu-beta ($IFN\beta$) (21). Pohlcováním myelinového debris, obzvláště je-li opsonizováno protilátkami, aktivitu mikroglie naopak zvyšuje. Stresované a poškozené neurony uvolňují řadu cyklických nukleotidů, které se mohou vázat na purinergní receptory exprimované na mikroglie, a zapříčiní tak produkci prozánětlivých cytokinů (22).

3.6 Plasmatické buňky, intratekální produkce imunoglobulinů

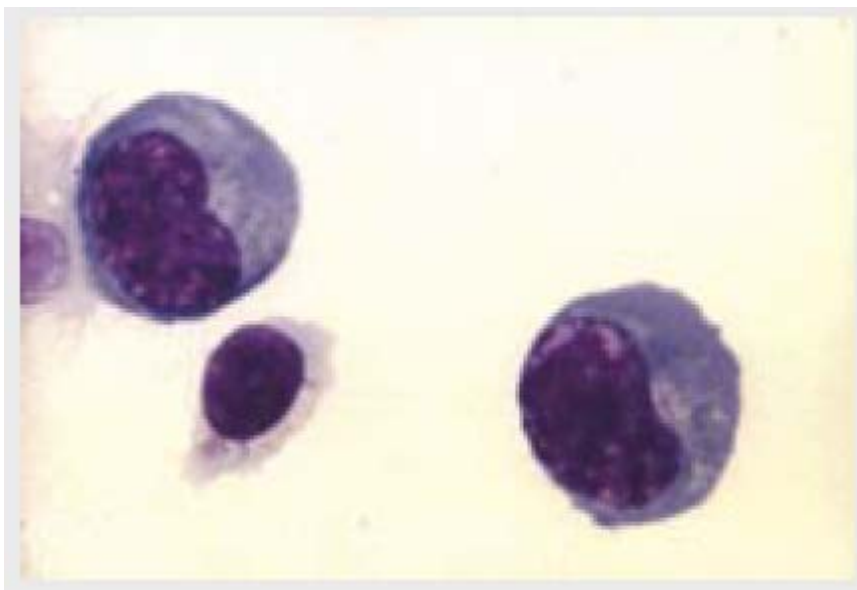
Třebaže u RS dominantní úlohu sehrává buňkami zprostředkovaná imunitní reaktivita, nelze pomíjet ani podíl humorálních složek imunity na poškozující zánětové reakce.

B lymfocyty za HEB dávají vznik klonům plasmatických buněk, jejichž produkty jsou detekovány jako oligoklonální pásy v mozkomíšním moku. Protilátky, s největší měrou IgG, jsou produkovány intratekálně, uvnitř mozkových plen.

V mozkomíšním moku pacientů nacházíme specifické autoprotiátky proti MOG. Prakticky pravidlem jsou autoprotiátky proti MBP, ty se však mohou uplatnit až po narušení povrchu myelinové pochvy. Další frakcí imunoglobulinů v likvoru jsou protilátky namířené proti virovým agens (viru EBV, CMV, HSV, VZV) a proti antigenním strukturám Haemophilus influenzae, Streptococcus pyogenes a dalším (37).

Úloha protilátek v poškozujícím zánětu u nemocných s RS je protichůdná a jejich význam v patogenezi nemoci není zcela jasný. Protilátky namířené proti myelinovým antigenům se podílejí na destrukci myelinu dvěma způsoby. A to mechanismem na protilátkách závislé buněčné cytotoxicity, ADCC, kdy jsou protilátky shromážděny na makrofágu, který ničí myelin. A aktivací komplementového systému, k čemuž je nutné vytvoření komplexů imunoglobulinů s antigeny, neboli opsonizace povrchu myelinové pochvy. Svou cytolytickou aktivitou může komplement přispět k poškození buněčných struktur CNS. Na druhou stranu specifické protilátky mohou vyvazovat a tak neutralizovat autoantigeny, které se uvolňují v průběhu poškození nervových struktur, a usnadňovat jejich odstraňování. Jsou tedy důležitou součástí při reparaci tkáně.

Obrázek 8. Cytologický nálezn v likvoru pacientů s RS – plazmocyty - buňky zodpovědné za intratekální produkci protilátek



3.7 Role CD8+ T buněk

Většina infiltrujících T lymfocytů do CNS se řadí k subpopulaci CD4 pozitivních T lymfocytů, v poslední době je však přehodnocována role menší části CD8 pozitivních cytotoxických T lymfocytů, které mohou hrát významnou roli v destrukci axonů.

Klonální expanze CD8+ cytotoxických T lymfocytů byla zjištěna v mozkomíšním moku pacientů s RS a v aktivní placi dokonce převyšovala počtem CD4+ T buňky. V krvi byly také nalezeny. Studie z roku 2004, identifikovala několik stejných expandujících klonů CD8+ cytotoxických T buněk nacházejících se v mozku, moku a krvi. Překvapivé bylo, že některé klony, jež infiltrovaly do mozku, persistovaly více než pět let v mozkomíšním moku a/nebo v krvi, a tudíž přispívaly k progresi onemocnění.(24). Zvýšený počet paměťových CD8+ T buněk v periferní krvi nemocných RS zaznamenali také vědci z Číny, kteří navíc na nich zjistili vyšší expresi chemokinového receptoru CCR7 a CD45RA oproti zdravým jedincům (25).

Antigeny rozpoznávané cytotoxickými T lymfocyty jsou prezentovány na MHC glykoproteinech první třídy. Expresí molekul MHC I. třídy na buňkách v CNS nemocných RS se zabývali rakouští vědci a našli konstitutivní expresi na mikroglíích a endoteliálních buňkách. Na astrocytech, oligodendrocytech, neuronech a axonech se vyskytovaly tyto molekuly v závislosti na fázi nemoci a aktivitě lézí. To znamená, že potenciální cíl cytotoxických T buněk rozeznávajících MHC I. třídy v lézi pacientů mohou být všechny buňky CNS. Pro úplnost MHC molekuly II. třídy jsou exprimovány pouze mikroglíemi a makrofágy, buňkami prezentující antigen (23). Za normálních okolností je exprese MHC molekul I. třídy v CNS velmi nízká, během zánětu ovšem vzrůstá (26).

Autoreaktivní CD8+ T lymfocyty získané od pacientů s RS rozeznávají jako antigen MBP. Jejich signifikantní odpověď byla zaznamenána na 9-mer MBP peptidy, konkrétně MBP (111-119) a MBP (87-95). Tyto peptidy se vážaly na HLA-A2 molekulu s daleko větší afinitou u pacientů s RS v porovnání se zdravými jedinci. Ve výsledku se T lymfocyty proliferovaly do subsetu paměťových buněk CD45RA-/ CD45RO+. Tyto CD8+ T buňky projevovaly specifickou cytotoxicitu proti endogenně zpracovaným peptidům pocházejících z MBP a vystaveným na povrchu buňky v kontextu MHC molekul I. třídy, a lyzovaly COS buňky transfekované genem kódující MBP a HLA-A2 (38).

3.8 Demyelinizace a axonální degenerace

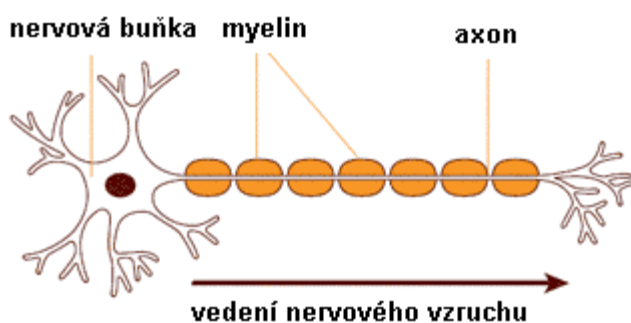
Ve vzniklém ložisku zánětu, placi, s rozměry méně než jeden milimetr po vzácně několik centimetrů, se nachází T buňky, B buňky přeměněné na plasmatické s produkcí autoprotilátek, makrofágy, jednotlivé části komplementu a chemické mediátory zánětu. Všechny tyto komponenty se podílejí na destrukci myelinu, jež může být pozorována již během prvních 24 hodin od propuknutí zánětu a jež začíná od středu léze. S jeho rozpadem

jsou odhalovány další myelinové antigeny a mohou tak být aktivovány další klony T lymfocytů. Díky spolupráci T a B lymfocytů jsou tvořeny protilátky, které se dále účastní poškození myelinu.

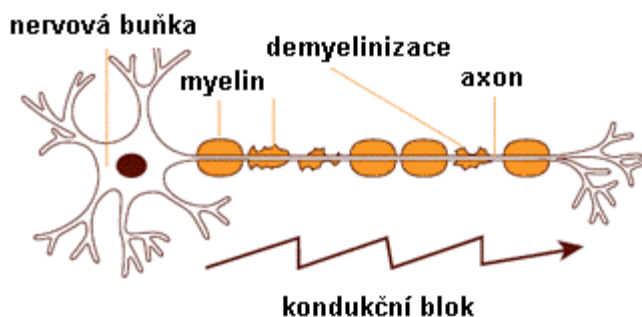
Destrukce myelinu však není jediným důsledkem autoimunitního onemocnění. Stejně významné, ne-li významnější, je ničení axonů, nositelů nervové funkce, v akutním zánětlivém ložisku. Mechanismus axonální transekce není zcela probádaný. Obnažené vlákno je určitě náchylnější k jakémukoli poškození než vlákno obalené a rovněž vlákno neschopné vést elektrický vzruch je extrémně citlivé ke zranění než vlákno s normální elektrickou aktivitou, která vlákno chrání.

V demyelinizovaném vláknu dochází ke vzniku kondukčního bloku, trvajících několik dnů. Důvodem je porucha sodíkových kanálů a zmnožení draslíkových kanálů jako následek zničení myelinu, což vede k lokální depolarizaci axonu a blokádě vedení. Na obnaženém vlákne nejsou iontové kanály, kterými vzruch běží, uspořádány rovnoměrně. Ty jsou u myelinizovaného vlákna nashromážděny pouze v Ranvierových zářezích, oddělujících internodia myelinu. Tato blokáda vedení je podkladem klinických příznaků.

Obrázek 9. Zdravá nervová buňka s myelinizovaným axonem



Obrázek 10. Demyelinizované vlákno nervové buňky



Jen v době kondukčního bloku exprimuje axon na svém povrchu molekuly MHC I. třídy a může tak být rozpoznán cytotoxickými CD8⁺ T lymfocyty a zničen jeho produkty – perforiny. K tomuto mechanismu se přiklání většina vědců a nacházejí korelaci mezi mírou

akutního axonálního poškození, počtem CD8⁺ T cytotoxických lymfocytů a makrofágů (jejich produkty enzymy, NO). Vliv na poškození či přímo smrt neuronů a oligodendrocytů, buněk produkujících myelin, má i abnormální metabolismus glutamátu. Ten je v místě zánětu zvýšen aktivitou buněk imunitního systému. Zejména T lymfocyty jsou významným zdrojem tohoto neurotransmiteru. Glutamát se poté váže na své receptory na povrchu neuronů a oligodendrocytů (37).

V akutní place, kde probíhají aktivní demyelinizační procesy, je možné vidět poškození axonů včetně jejich transekce. V chronické place lze prokázat ztrátu 50–80% axonů. K transekci dochází u pacientů v různé míře. U některých je přerušovaných vláken jen kolem 200/ mm³, u jiných vědci napočítali až 11.000/ mm³. To vysvětluje individuální rozdíly v úzdravě z atak RS a odlišný průběh nemoci.

Všechny nervové dráhy jsou jištěny nadměrným počtem nervových vláken, než je pro normální funkci potřeba, proto ztráta malé části se nemusí klinicky projevit. Trvalý neurologický deficit není dán mírou demyelinizace, ale mírou axonální ztráty, která je zanechána po akutní atace. Transekce axonů je procedura ireverzibilní.

Pokud nedojde k tomuto definitivnímu ukončení funkce axonu, po několika dnech se rozprostřou iontové kanály rovnoměrně po obnaženém vláknu a obnoví jeho funkci, tedy vede vzruch jako vlákno nemyelinizované, ale za mnohem vyšších energetických nároků pro nervové vlákno. Pokud nenastane remyelinizace, vlákno se vyčerpá a degeneruje.

3.9 Osud oligodendrocytů, remyelinizace

Hlavní funkcí oligodendrocytů (ODC) je tvorba myelinové pochvy, což je vlastně výběžek dvojité membrány této buňky okolo axonu nervové buňky. Vytváří všechny složky nebo prekurzory myelinu (myelinové lipidy, proteiny: MBP, MAG, MOG, PLP) a enzymy nutné k syntéze (cerebrosid sulfotransferáza, myelinová lipidová galaktocerebrosidáza aj.). Je jediným možným zdrojem myelinu v CNS.

V zánětlivých lézích se spolu s neurony stává ODC terčem autoimunitní poškozující reakce. ODC je vnímavá vůči řadě toxických látek a je mnoho mechanismů, které vedou k její destrukci.

K nejvíce toxickým substancím pro ODC patří tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α) produkovaný především mikroglie a makrofágy, a tumor nekrotizující faktor beta (TNF β) syntetizovaný aktivovanými T lymfocyty. Oba dva jsou schopné přímé destrukce myelinu. Pokusy na transgenních myších ukázaly, že samotné TNF indukuje u ODC apoptózu a vakuolizaci myelinu, aniž by v místě došlo k poruše HEB a infiltraci leukocytů do CNS. Tato primární demyelinizace vyvolá klasický způsob nábory fagocytujících makrofágů do CNS a progresi lézí do akutní nebo chronické plaky s axonální destrukcí, rozvolněním HEB a výraznou oligodendrocytární ztrátou (39). Jiná studie ukázala, že TNF může na ODC

působit jen v přítomnosti interferonu gamma ($\text{IFN}\gamma$). $\text{IFN}\gamma$ je výlučně exprimován T buňkami a přirozenými zabíječi (natural killers, NK buňkami). Když vědci experimentálně přenesli $\text{IFN}\gamma$ do CNS, začaly probíhat patologické změny, jež se vyskytují u imunitně zprostředkovaných demyelinizačních nemocí. Například vyvolal apoptózu u ODC. Škodlivý vliv $\text{IFN}\gamma$ na myelin v CNS je pravděpodobně spojen skrz přímý vliv na ODC stejně jako skrz aktivaci makrofágů a mikroglíí (27).

Nedávná zajímavá publikace od Barnetta a Prinease (29) také vyzdvihuje možnost imunitní odpovědi na antigen u akutního relapsu RS jako sekundární reakci na prvotní impuls nemoci, kterým je smrt ODC a rozpad myelinu. Autoři analyzovali mozky mladých pacientů s relabující – remitující formou RS, jež zemřeli na začátku ataky v důsledku fatální léze v mozковém kmeni. Sledovali rozsáhlou apoptózu ODC v malé ohraničené oblasti a navrhli toto jako počáteční událost tvorby léze. Smrt ODC by mohla být příčina aktivace rezidentních mikroglíí, které fagocytují debris. Součástí apoptotické dráhy je i aktivace komplementu, jenž nasedá na myelinovou pochvu, a ta se začne během pár dnů vakuolizovat a atrahovat monocyty, které jsou nezbytné k odstranění apoptotických membrán. Zánět se tedy jeví pouze jako vedlejší fenomén a iniciálním momentem se stávají apoptotické ODC.

Další možností zničení ODC je cytotoxickým působením γ/δ T lymfocytů, jejichž cílem útoku jsou proteiny na povrchu ODC, exprimované v zánětlivém prostředí pod vlivem IL-1. Jedná se o Heat Shock Proteiny (HSP), zejména HSP 60, HSP 65, HSP 70.

Protilátky proti povrchovým buněčným determinantám ODC vedou k fixaci a aktivaci komplementu, jehož výsledkem je lyze buňky. Zdrojem komplementových částí jsou makrofágy a mikroglie.

Mezi další možné příčiny smrti ODC jsou navrhovány virové infekce, toxiny zprostředkovaná destrukce (28), hypoxie až ischemie, produkty oxidativního vzplanutí makrofágů.

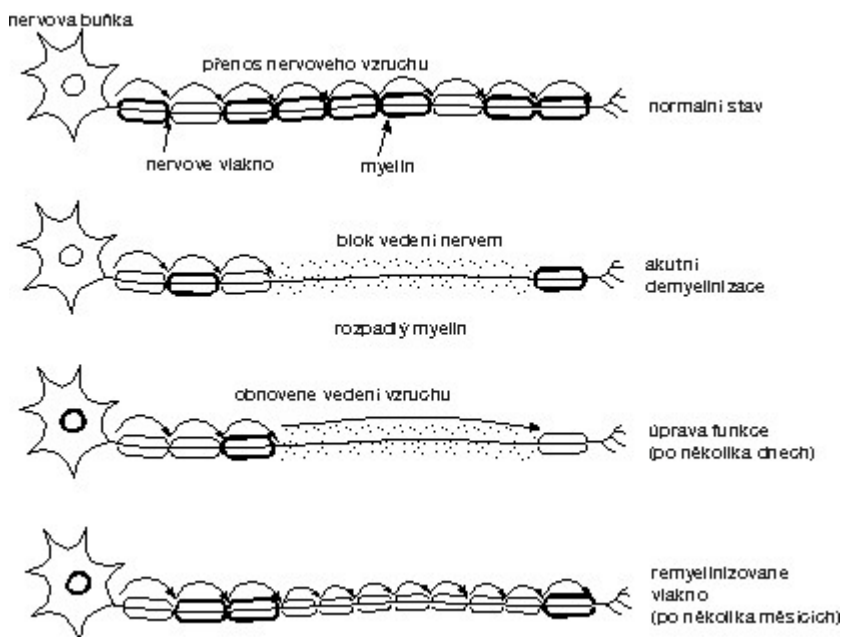
Kvantitativní studie ODC během formace zánětu ukázaly, že u 70% pacientů v centru demyelinizace byly redukovány ODC v různé míře, ale znovu se objevily v neaktivní či remyelinizované oblasti. V 30% případů docházelo k rozsáhlému ničení ODC a v neaktivních částech remyelinizace zcela chyběla. Rovněž byla zaznamenána negativní korelace mezi množstvím ODC a T lymfocyty, plasmatickými buňkami a axonální ztrátou (30).

Míra zachování ODC rozhoduje o tvorbě nového myelinu na poškozených vláknech. Schopnost nahradit rozpadlý myelin novým je v CNS dospělého organismu značně omezená. Takový myelin je tenčí a Ranvierovy zářezy jsou blíže u sebe. Dochází-li k opakovanému vzplanutí zánětu a ke ztrátě myelinu, znamená to, že buňka opakovaně ztrácí část sama sebe, a tento opakovaný stres vede k vyčerpání jejích regeneračních

schopností a smrti ODC. Axony po dlouhodobé a masivní ztrátě myelinu vedou vzruch výrazně pomaleji a nakonec hynou v důsledku trofického vyčerpání. Tento způsob zániku se uplatňuje kromě akutní léze především ve fázi chronické progresse.

Prekurzory ODC byly v dospělém mozku nalezeny, pro jejich aktivaci je však třeba řada signálů od okolních buněk, které musí přijít ve zcela přesném sledu. Samotná přítomnost prekurzorů tak není dostatečná.

Obrázek 11. Kondukční blok vedení nervového vzruchu a následná remyelinizace



3.10 Reparace poškozené tkáně

Úloha imunitního systému je u demyelinizačních onemocnění tradičně vnímána jako negativní, ale každá zánětlivá reakce v sobě zahrnuje prvky nezbytné pro proces hojení. Imunitní reakce je tudíž zpětnově regulována a dříve či později dochází k vyhasínání zánětu. Buňky imunitního systému, které jsou přítomny v CNS, se aktivně zapojují do odstranění poškozených nervových struktur. Navíc tyto aktivované buňky produkcí cytokinů a membránovými interakcemi stimulují buněčné složky CNS k zvýšené aktivitě včetně proliferace.

Hlavními mechanismy vyhasínání zánětlivé aktivity jsou zprostředkovány apoptotickou smrtí zánětlivých buněk a přilákáním buněk, produkujících protizánětlivé cytokiny.

Proces apoptózy je v buněčných elementech CNS a v buňkách imunitního systému, které jsou součástí zánětlivého procesu, indukován skrze TNF α , jenž se naváže na své receptory p55 a p75, nebo skrze ligand Apo/FasL, vážící se na receptor Apo/Fas. Nitrobuněčně mohou proces apoptózy stimulovat molekuly cytotoxických buněk označované jako granzymy. Vnější cesta indukce apoptózy aktivuje proteolytické enzymy, kaspázy. Aktivací

kaspázy-8 začíná ireverzibilní sled reakcí, který vyústí aktivací endonukleáz, štěpících genetický aparát buňky na nukleosomální fragmenty. Vnitřní cesta apoptózy je spojena s aktivitou cytochromoxidázového systému.

V ložisku, kde zánět vzplanul, se vyskytují prozánětlivé cytokiny IL-1, IL-2, IFN γ , TNF α i β . Ve fázi vyhasínání se v place nachází protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF β .

Interleukin 10 je zejména syntetizován CD4⁺ T_{H2} lymfocyty, CD8⁺ T lymfocyty, makrofágy jako inhibitor produkce cytokinů IFN γ , IL-1, IL-6, TNF α a cytokinů T_{H1} buněk. Rovněž blokuje prezentaci antigenu.

Transformující růstový faktor beta je jedním z nejdůležitějších cytokinů tlumící zánět. Je produkován T_{H3} T lymfocyty, makrofágy a trombocyty. Snižuje proliferaci T buněk navozenou cytokiny a snižuje aktivaci a proliferaci zralých T lymfocytů, která byla navozena IL-2, a NK buněk, navozenou IFN α . Suprimuje aktivaci makrofágů, snižováním exprese molekul MHC II. třídy. Inhibuje proliferaci buněk kostní dřeně. Má vliv na izotypový přesmyk na IgA u B lymfocytů. Urychluje hojení ran. Do budoucna má potenciál stát se imunopresivem, například při transplantacích.

Poměr prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů rozhoduje z části o průběhu a tíži nemoci a může být geneticky podmíněn, ale také ovlivněn environmentálními faktory. Remyelinizace nemůže proběhnout tam, kde se vyskytuje mnoho prozánětlivých cytokinů.

Velmi důležitou roli mají regulační T buňky. Jejich selháním je umožněn další autoimunitní útok. Můžeme je rozdělit podle znaků, jež nesou na svém povrchu na CD4⁺ a CD8⁺. Přirozené CD4⁺ T lymfocyty označované Treg nesou na svém povrchu autoreaktivní TCR, ale na rozdíl od jiných autoreaktivních T buněk vlastní tkáň nenapadají, ale naopak potlačují autoimunitní reakce produkcí IL-10 a TGF β a přímým kontaktem na aktivované buňky imunitního systému, zřejmě cytotoxickým působením.

Mezi další regulační subpopulace patří Tr1, produkující IL-10 a T_{H3}, produkující TGF β .

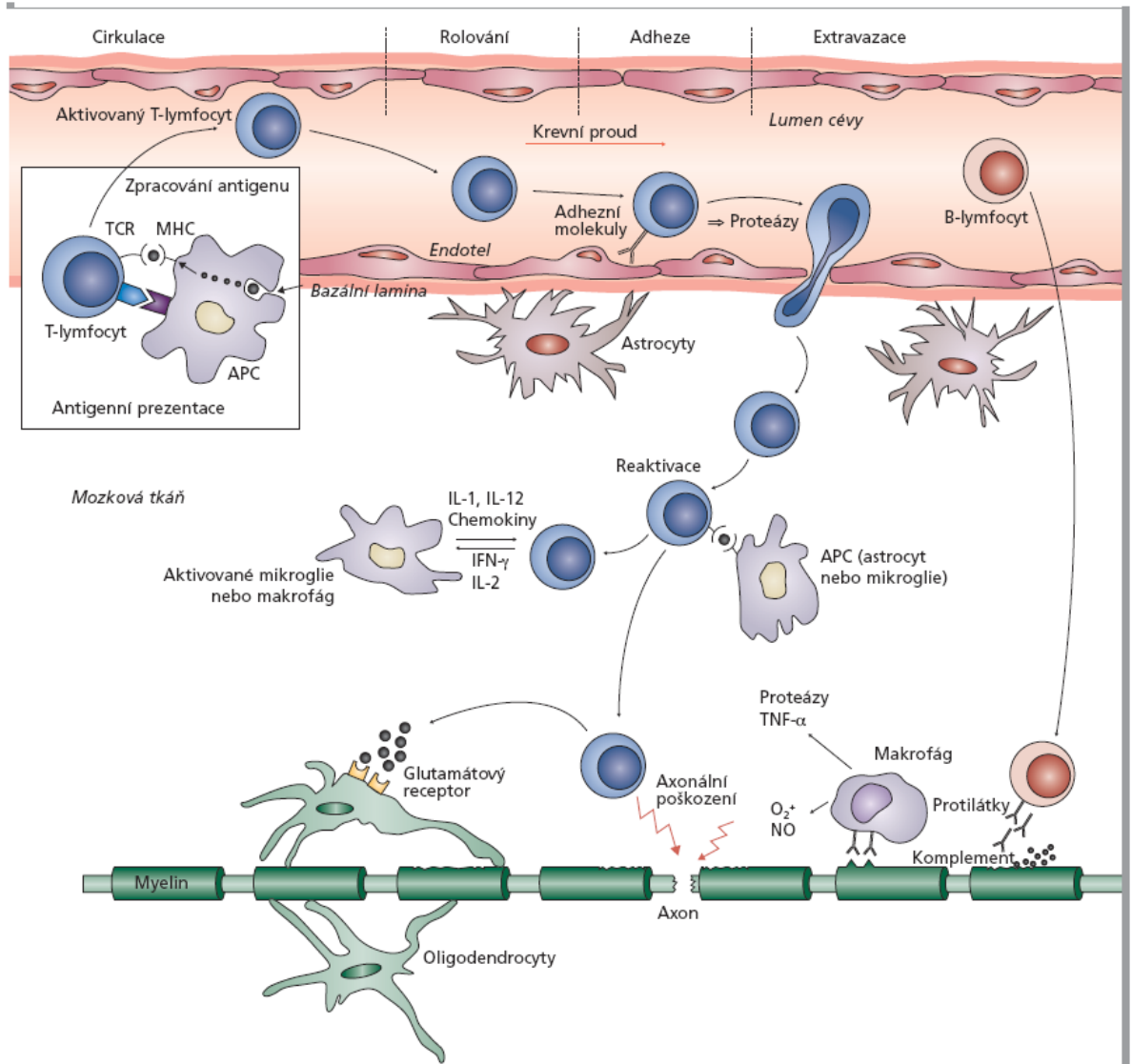
Méně probádanou populací jsou CD8⁺ regulační T lymfocyty, které mají jistě také tlumivou aktivitu.

Při vyhasínání zánětu se jeho činnost přesunuje na tenký okraj zánětlivého ložiska a tento kraj je stále aktivní. Probíhá zde demyelinizace a nachází se tu infiltrát. Při vhodném stimulu může dojít k novému vzplanutí a rozšíření zánětu. Právě při takto opakovaných demyelinizacích v centru plak už ODC není schopen remyelinizace a poškozená tkáň se hojí za pomoci astrocytů gliovou jizvou. V bílé hmotě, kde probíhají zánětlivé procesy u RS, se vyskytují fibrilární astrocyty. Za normálních okolností jsou jejich hlavní funkce udržovat intersticiální pH, sloužit jako nárazník extracelulárního K⁺ uvolňovaného při depolarizaci neuronu, syntetizovat neurotransmitery a jejich prekurzory a secernovat neurotrofiny, růstové faktory nutné pro diferenciaci a růst neuronů. Astrocytární výběžky interagují s endotelem i neurony. Po poranění či zánětu v CNS a odklizení destruovaných neuronů se

astrocyty reaktivují a pod vlivem IL-1 a IL-6 spolu s fibroblasty jsou schopny vytvořit v nervové tkáni jizvu, jde o tzv. astrogliózu.

Ve výsledku dominuje úbytek tkáně a je možné pozorovat atrofii CNS, která je dána ztrátou axonů a myelinu, prostorově velmi náročné struktury.

Obrázek 12. Imunopatogeneze RS



Vysvětlivky
 APC – antigen prezentující buňka; TCR – T-buněčný receptor; MHC – hlavní histokompatibilní komplex.

4 Klinické příznaky

Onemocnění je charakterizováno vznikem mnohočetných zánětlivých ložisek v bílé hmotě mozku, především kolem mozkových komor, v corpus callosum, v mozkovém kmeni a v bílé hmotě míchy. Neurologické příznaky jsou dány mírou zánětu, demyelinizací a axonální transsekci, postihující určité dráhy. Akutní rozvoj příznaků je důsledkem bloku vedení v demyelinizované vlákne. Trvalé příznaky jsou způsobeny významnou destrukcí axonů – nositelů funkce.

Žádný z příznaků není pro RS specifický.

Primární příznaky se mohou projevovat *optickou neuritidou* (poruchy zraku např. zamlžené vidění, porucha barvocitu, výpadek zorného pole až slepota, bolest bulbu při pohybu), *ztrátou či změnou citlivosti* zejména taktilní (brnění, píchání), *motorickými symptomy* (spastické parézy, to je zvýšená únavnost, nejistota při chůzi, slabost, neobratnost končetin, obrny), *mozečkovými poruchami* (intenční tremor, ataxie, porucha rovnováhy), *postižením mozkových nervů* (paréza n. abducens – diplopie, nystagmus, paréza n. glossopharyngeus), *kmenovými poruchami* (vertigo, poruchy polykání, dysarthrie), *sfinkterovými poruchami* (imperativní mikce, retence, inkontinence), *sexuálními poruchami* (snížené libido, citlivost, erektilní dysfunkce), *kognitivními* (poruchy paměťových funkcí a soustředění) a *afektivními potížemi* (deprese), *únavou, bolestí* (neuralgie trigeminu).

Sekundární příznaky vznikají jako komplikace primárních. Jedná se například o infekce močových cest, svalové atrofie, sníženou hustotu kostí či proleženiny.

Mezi terciální příznaky patří sociální, pracovní a psychologické potíže. RS jako chronické onemocnění výrazně ovlivňuje kvalitu života nemocných a omezuje je v nejproduktivnější části života.

5 Pomocné vyšetřovací metody – určení diagnózy

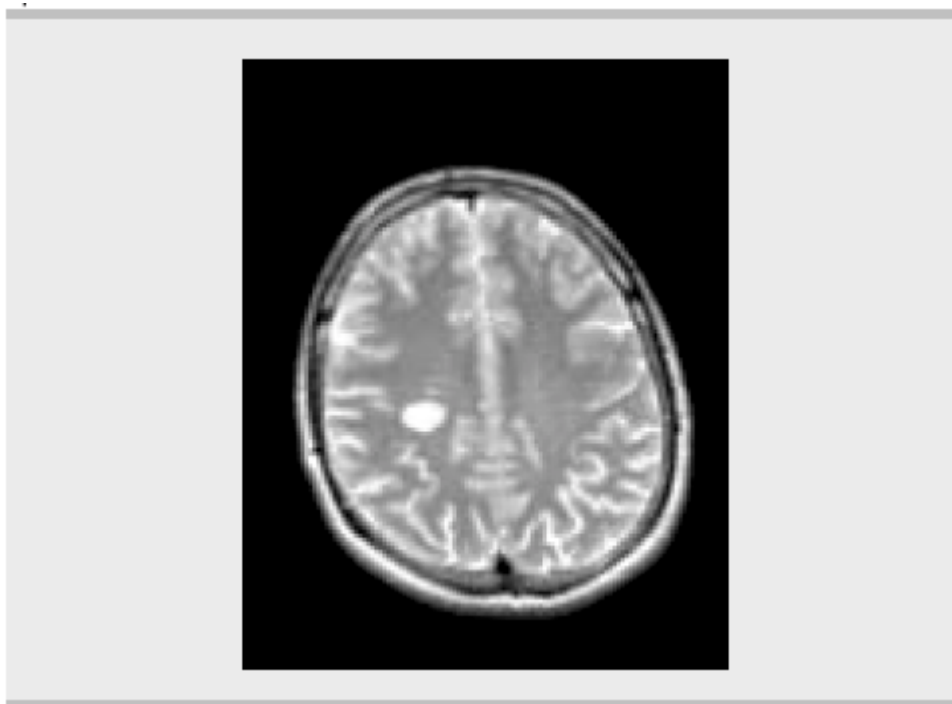
Na rozdíl od mnoha nemocí, u RS neexistuje přímočarý test, pro potvrzení resp. vyloučení nemoci. Ačkoliv je k dispozici mnoho vyšetřovacích metod dosahujících různých procent senzitivity, žádná nemá stoprocentní specifčnost, a proto klinický obraz nemoci je základním vodítkem při stanovení diagnózy. Ke klinicky jisté diagnóze jsou vyžadovány alespoň dvě ataky s časovým odstupem nejméně jednoho měsíce a průkaz dvou různě lokalizovaných ložisek zánětu v CNS. Přitom platí obecná zásada, že čím dříve je nemoc stanovena, tím větší jsou následné možnosti léčby.

5.1 Magnetická rezonance (Magnetic Resonance Imaging, MRI)

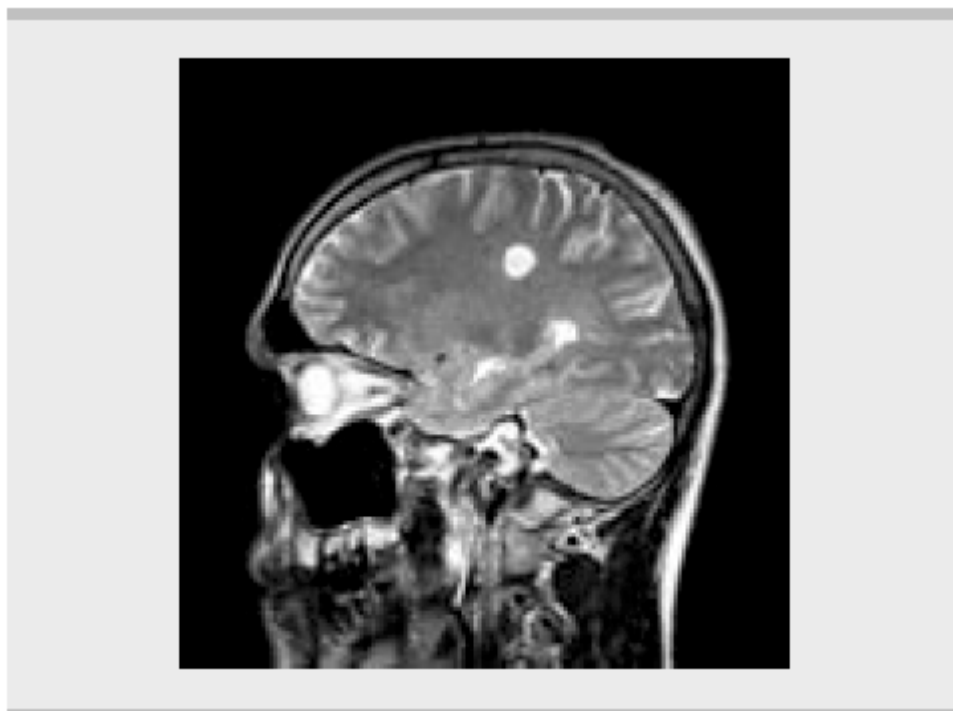
Tato metoda přinesla revoluční zvrát v nahlížení na RS, protože umožnila vizualizaci i drobných zánětlivých ložisek a sledování jejich dynamiky. Bylo tak poprvé možno zjistit, že zánětlivých lézí vzniká 5 – 10x více, než se vyskytuje klinických příznaků (po podání trojnásobné dávky gadolinia). Je třeba zdůraznit, že počet ložisek na MRI není přímo úměrný tíži onemocnění. Zároveň MRI ukázala, že ke ztrátě tkáně dochází i disperzně v tzv. normálně vypadající bílé hmotě. Je to dokladem difúzního zánětu v CNS.

Standardně se používají T2 vážené obrazy, na kterých lze pozorovat ložiska signálu o vysoké intenzitě – hyperintenzní signál. Po podání kontrastní látky gadolinia lze s přesností jednoho milimetru zobrazit místa změněné tkáně či abnormně propustné krevně – mozkové bariéry, jež charakterizují zánětlivá ložiska a jež je podmínkou vstupu gadolinia do CNS. V některých případech rozliší i rozpadové produkty myelinu a místa ztráty nervových vláken, což se projeví zmenšením celkového objemu tkáně – atrofii – a na obraze se sníží intenzita signálu. Těmto ložiskům se říká „černé díry“. Dnes nedokážeme přesně rozlišit, kde probíhá jen zánět, kde reparační pochody a kde destrukce tkáně, proto se hledají jiné způsoby MRI zobrazení, které by lépe korelovaly s klinickým nálezem. V současné době je k dispozici magneticko – rezonanční spektroskopie ke zkoumání axonálního poškození a magnetizační transfer k detekci ložisek i v normálně vypadající bílé hmotě.

Obrázek 13. MRI vyšetření, T2 obrazy – axiální rovina. Hyperintenzní plak v centrum semiovale vpravo



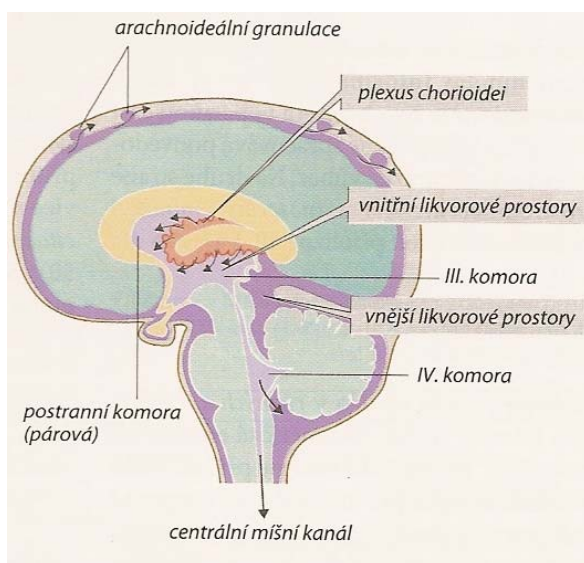
Obrázek 14. MRI vyšetření, T2 obrazy – sagitální rovina. Tentýž hyperintenzní plak v centrum semiovale vpravo. Hyperintenzní je rovněž mozkomíšni mok v postranní komoře.



5.2 Vyšetření mozkomíšního moku

Mozkomíšni mok je čirá, bezbarvá tekutina vyplňující prostory (subarachnoidální, komory, cisterny) v CNS. Na rozdíl od krve neobsahuje žádné červené krvinky, téměř žádné buňky a velmi málo bílkovin. Vzniká aktivní sekrecí chorioidálního epitelu a ultrafiltrací plazmy. Resorpce se děje převážně v malých invaginacích arachnoidei do sinů v duře mater a

lymfatickým systémem.



Pro vyšetření je třeba likvor získat lumbální punkcí, kdy tenkou jehlou v oblasti čtvrtého bederního až prvního křížového obratle se odebere 10-15 mililitrů, což je celkem bezvýznamný objem, když uvážíme, že celkové množství moku je přibližně 150 mililitrů.

Likvorová analýza zahrnuje řadu vyšetření a platí, že je nutné současně vyšetřovat i krev a veškeré výsledky z moku vztáhnout na hodnoty v krvi.

Obrázek 15. Mozek – likvorové prostory

5.2.1 Cytologie

Patří k základním vyšetřením, kdy nález hodnotíme kvantitativně a kvalitativně.

- kvantitativní cytologie: tj. stanovení počtu buněčných elementů na 1 μ l ve Fuchs-Rosenthalově komůrce o objemu 2,88 μ l. Norma u dospělých je 0-5 buněk/1 μ l, u dětí 7-10/1 μ l. V 60% případů se u pacientů s RS nachází lehká lymfocytární pleocytóza, tzn. zvýšený počet buněk.
- kvalitativní cytologie: v likvoru se za normálních okolností vyskytuje přibližně 62% lymfocytů, 36% monocytů a 2% neutrofilů. Pro diagnózu RS je typická přítomnost plazmocytů, zodpovědných za intrathekální produkci imunoglobulinů, a aktivovaných B-lymfocytů, mezistupněm mezi B-lymfocylem a plazmocylem.

5.2.2 Propustnost hematolikvorové bariéry

Hematolikvorová bariéra je tvořena chorioideálním plexem a endotelem kapilár. Dominantním transportním mechanismem je difuze proteinů ze séra do likvoru. Zvýšení koncentrace určitého proteinu v séru má za následek zvýšení koncentrace téhož proteinu v likvoru. Při poruše této bariéry dochází k patologickému zvýšení koncentrace proteinu v likvoru.

Stav hematolikvorové bariéry je vyjadřován albuminovým koncentračním kvocientem Q_{alb} , jenž vyjadřuje poměr koncentrace albuminu v likvoru (cerebrospinal fluid, CSF) a v séru $Q_{\text{alb}} = \text{Alb}_{\text{CSF}}/\text{Alb}_{\text{sérum}}$. Úvaha vychází z předpokladu, že albumin se v lidském těle vytváří pouze v játrech, a proto albumin stanovený v likvoru pochází výhradně ze séra. Zvýšené hodnoty albuminového kvocientu upozorňují buď na zánět nebo na překážku v likvorových cestách (snížená cirkulace moku). U RS je funkce hematolikvorové bariéry obvykle normální nebo lehce porušena (zvýšení Q_{alb}).

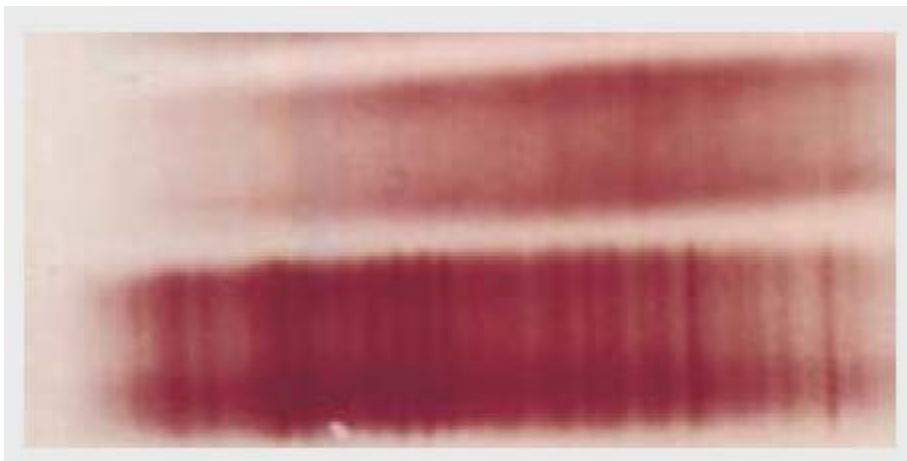
5.2.3 Oligoklonální IgG proužky

Oligoklonální imunoglobuliny převážně třídy IgG1 reagují např. s řadou běžných virových antigenů s nízkou afinitou, jedná se nejspíše o nespecifickou aktivaci B buněk.

Pro diagnostiku RS je dnes požadován průkaz alespoň dvou oligoklonálních proužků přítomných v likvoru, které nelze prokázat v séru. Stanovení IgG pásů probíhá metodou izoelektrické fokusace, využívá pH gradientu v separaci celkového IgG na základě elektrického náboje s následným imunoblotem a enzymovým barvením. U pacientů s RS je stanovení oligoklonálních IgG pásů pozitivní v 98% vyšetřených vzorků likvoru (14). Specifičnost je zvýšena, nacházejí-li se tyto pásy v alkalické oblasti (v kyselé oblasti jsou pásy typické pro bakteriální či virový původ zánětu). U 44% nemocných se nachází i sérové oligoklonální proužky (IgG v moku i v séru).

Tyto proužky jsou považovány za důkaz oligoklonální expanze B lymfocytů, které se nacházejí přímo v CNS.

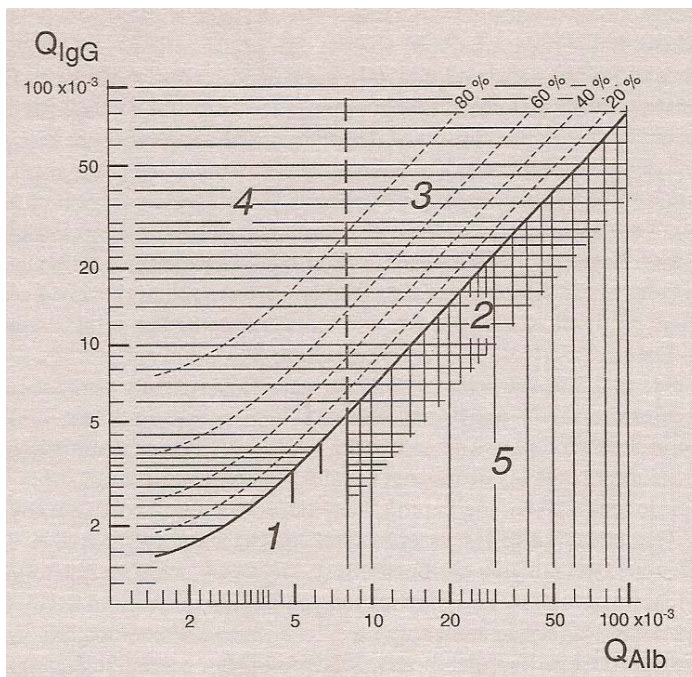
Obrázek 16. Oligoklonální pásy IgG přítomné pouze v likvoru nikoli v plasmě pacientů s RS.



5.2.4 Kvantitativní stanovení intrathekální syntézy IgG, IgM, IgA

Nejpřesnější metodou ke stanovení intrathekální syntézy imunoglobulinů je využíván Reiberův diagram, při kterém po grafickém vynesení albuminových Q_{alb} a imunoglobulinových Q_{Ig} ($Q_{Ig} = Ig_{CSF}/Ig_{sérum}$) kvocientů získáme křivku, hyperbolu, z níž je patrné, zda se jedná o normální nález, poruchu hematolikvorové bariéry, intrathekální syntézu s přítomností nebo bez přítomnosti dysfunkce hematolikvorové bariéry. U diagnózy RS je frekvence výskytu intrathekální syntézy jednotlivých tříd imunoglobulinů následující: IgG syntéza v 72%, IgM ve 20% a IgA v 9% případů (14).

Graf 1. Reiberův diagram pro IgG. 1 – oblast normálních hodnot, 2 – porucha funkce HEB bez lokální syntézy IgG,



3 – porucha funkce HEB s intrathekální syntézou IgG, 4 – intrathekální syntéza IgG při normální funkci HEB, 5 – v této oblasti by se neměli vyskytovat žádné hodnoty

5.2.5 MRZ reakce

Takto je označována intrathekální syntéza specifických antivirových protilátek třídy IgG proti neurotropním virům spalniček (morbilli – M), zarděnek (rubeola – R) a viru planých neštovic (varicella zoster – Z). Syntéza specifických imunoglobulinů je vyjádřena tzv. specifickým protilátkovým indexem AI (antibody index). Teoreticky je normální hodnota $AI = 1$, hodnoty $AI > 1,4$ jsou patologické a indikují intrathekální syntézu specifických protilátek.

MRZ reakce je typická pro chronická autoimunitní zánětlivá onemocnění nervového systému již v období prvních často monosymptomatických příznaků, asi 84 – 94% pacientů s RS má pozitivní kombinovanou MRZ reakci, tj. průkaz specifické syntézy imunoglobulinů proti jednomu, dvěma nebo třem z uvedených neurotropních virů (15). Kombinace protilátek prakticky vylučuje jiné akutní infekční onemocnění. Nejvyšší četnost protilátek je prokázána u spalniček (78%), u zarděnek (60%) a nejmenší u planých neštovic (55%) (14).

Etiologie a patofyziologie reakce nebyla dosud plně objasněna. Přiklání se k názoru, že imunologická reakce indukovaná konkrétním antigenem, vyvolá rovněž produkci mnoha dalších protilátek a autoprotilátek (polyspecifická imunitní odpověď), které mohou v CNS perzistovat i tehdy, chybí-li původní antigen.

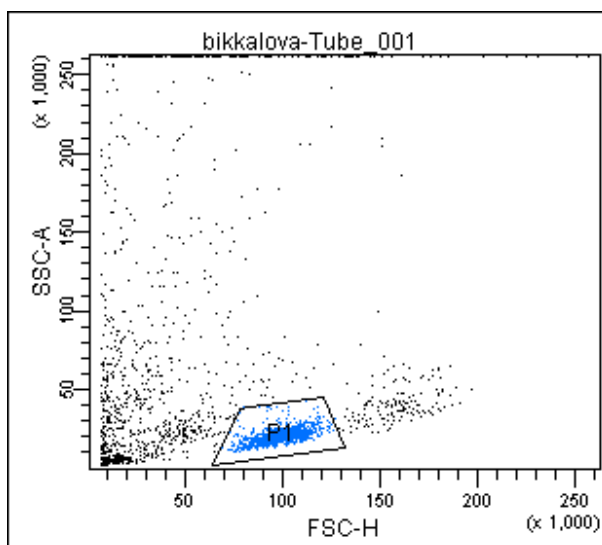
MRZ reakce je méně citlivá ale přesnější než stanovení oligoklonálních IgG pásů.

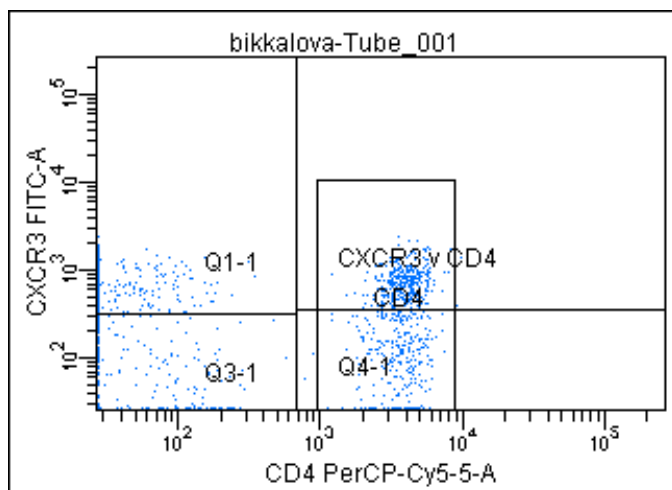
5.2.6 Vyšetření likvoru na průtokovém cytometru

Průtoková cytometrie je technika umožňující kvantitativně analyzovat velké množství buněk v suspenzi, respektive v mozkomíšním moku. Na základě různých přesně definovaných parametrů, jež si určíme, pak dovoluje cíleně separovat buňky splňující naše požadavky. Parametrem může být fyzikální nebo chemická vlastnost buňky (granularita, obsah DNA, pH) a vše co můžeme označit monoklonální protilátkou (povrchové molekuly, intracelulární molekuly včetně cytokinů).

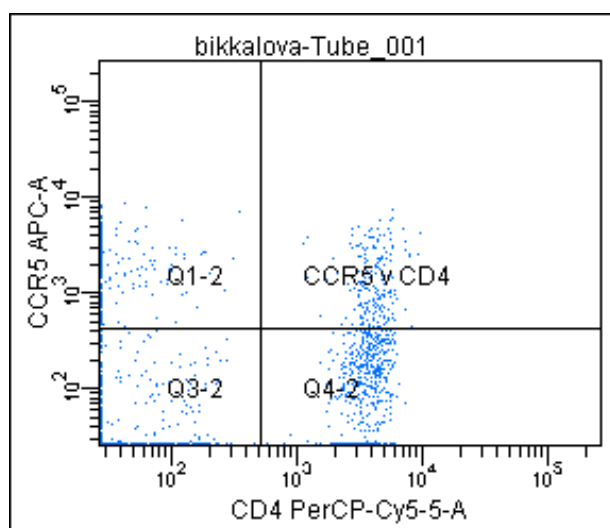
Nejedná se o rutinně prováděné vyšetření vzhledem k vysoké finanční nákladnosti

Graf 2. Výsledky vyšetření likvoru na průtokovém cytometru





Graf 3. Výsledky vyšetření likvoru na průtokovém cytometru. Rozdělení námi vybraných buněk podle exprese povrchových znaků CD4 a CXCR3.



Graf 4. Výsledky vyšetření likvoru na průtokovém cytometru. Rozdělení námi vybraných buněk podle exprese povrchových znaků CD4 a CCR5

5.3 Evokované potenciály

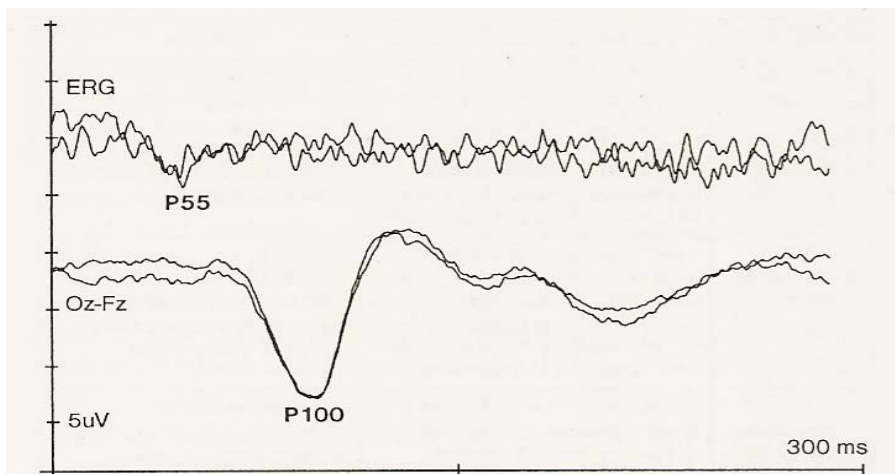
Evokované potenciály vyšetřují funkci nervových drah - a to zrakových, jenž mají nejvyšší vypovídací hodnotu, sluchových, somatosenzorických a motorických – po stimulaci přiměřeným podnětem a jsou zaznamenávány jako elektrické aktivity mozku (elektroencefalogram, EEG).

Abnormní nálezy ve více než jednom z těchto systémů jsou důkazem, že postižení nervového systému je víceložiskové.

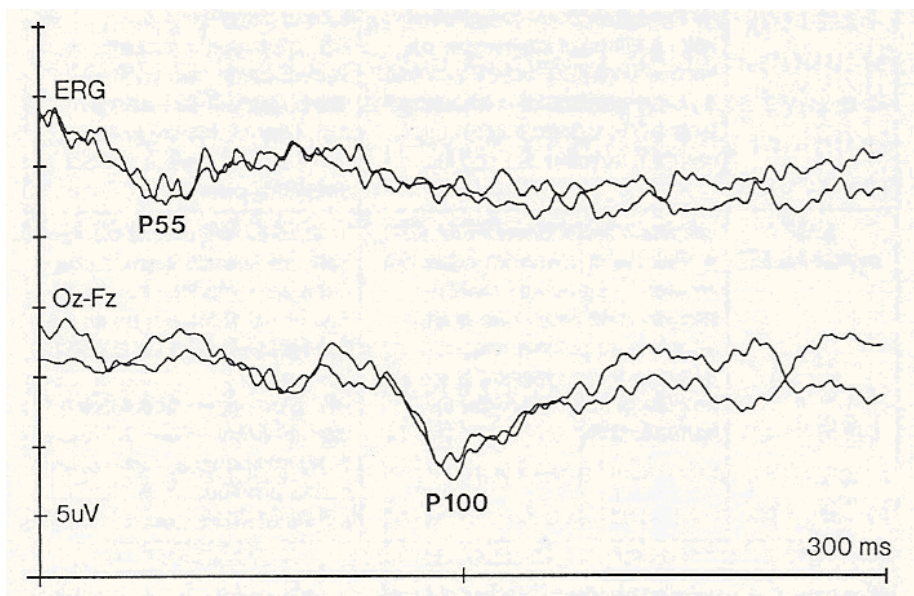
Demyelinizace způsobuje zpomalení vedení vzruchu, rozsáhlá plaka vede k úplnému bloku vedení poškozenou oblastí, což se na záznamu projeví prodloužením kondukčního času nebo nízkou amplitudou.

Evokované potenciály podporují diagnostický požadavek rozsevu ložisek v čase a prostoru a jsou přínosné pro posouzení terapeutického zásahu. Nyní však je upřednostňováno vyšetření pomocí MRI.

Graf 5. Vizuální evokované potenciály. Normální nález.



Graf 6. Vizuální evokované potenciály. Stav po retrobulbární neuritidě.



5.4 Oftalmologické vyšetření

I u pacientů, kteří nikdy neměli žádnou klinickou symptomatologii odpovídající optické neuritidě, nachází se na jejich očním pozadí velmi často patologický nález. To je dáno tím, že oční nerv není periferním nervem jako ostatní nervy, vystupující z mozku a míchy, ale přímým vychlípěním mozku. Jeho vlákna jsou tedy obalena myelinem stejného složení jako jinde v CNS. Následky zánětu očního nervu lze pozorovat jako atrofii papily tohoto nervu, jež se vyvíjí asi za 4 – 6 týdnů od akutního postižení.

Vyšetřuje se na očním pozadí, kdy lékař prosvěcuje oko a zkoumá sítnici nebo na počítačovém perimetru analyzujícím zorné pole, event. jeho výpadky.

5.5 Imunologické vyšetření periferní krve

Vyšetření buněk imunitního systému se rozšiřuje z mozkomíšního moku i na vyšetřování z krve. Zatím však studie nepřinášejí specifické výsledky pro RS a na celém světě probíhá rozsáhlý výzkum, zaměřený na hledání znaků aktivity nemoci, tzv. „surrogate markers“.

Zatím jsou odhaleny drobné abnormality ve funkci imunitního systému u nemocných osob, např. vyšší počty CD4+ buněk, nižší počty B – lymfocytů, snížená funkce regulačních lymfocytů či snížená produkce IgG a defekty v některých podtřídách imunoglobulinů. To může pacienta ohrozit opakovanými infekty a nespecifickou aktivací imunitního systému.

6 Terapie

K jakémukoli terapeutickému postupu je třeba rozumět imunopatologickým procesům, které jsou podkladem choroby. Výhodný experimentální model EAE relativně rozšířil znalost patogenetických mechanismů a umožnil vývoj léků, které pozitivně ovlivňují průběh onemocnění. Všechna dosavadní užívaná léčiva modifikují imunitní systém, ale doteď není k dispozici lék, pomocí kterého by bylo možno průběh RS zcela zastavit. Jediná fáze nemoci, kdy je možný cílený zásah, je akutní zánětlivé stadium. Proto se léčba zaměřuje zejména na zmírnění projevů nemoci a na zachování co nejvyšší kvality života pacienta. Nejeфекtivnějšího léčebného zákroku je dosaženo co nejčasnějším zahájením dlouhodobé terapie.

Jednotlivé fáze nemoci vyžadují specifický způsob léčby.

6.1 Léčba ataky RS

Vzplanutí zánětu se projeví klinicky jako ataka nemoci, tedy objeví se nové příznaky, nebo se zhorší již přítomné neurologické příznaky. Okamžitý efekt na tuto aktivitu nemoci má podání kortikosteroidů, zejména methylprednisolonu.

Kortikosteroidy se používají u všech autoimunitních chorob. Mají výrazný protizánětlivý, imunosupresivní a antiproliferativní efekt. Snižují schopnost makrofágů produkovat prozánětlivé a toxické cytokiny, exprimovat MHC molekuly a degradovat myelin. Snižují aktivaci a proliferaci specifických T lymfocytů, které rozpoznaly svůj antigen. Snižují aktivaci komplementu. Naopak protilátková imunitní odpověď je kortikosteroidy stimulována.

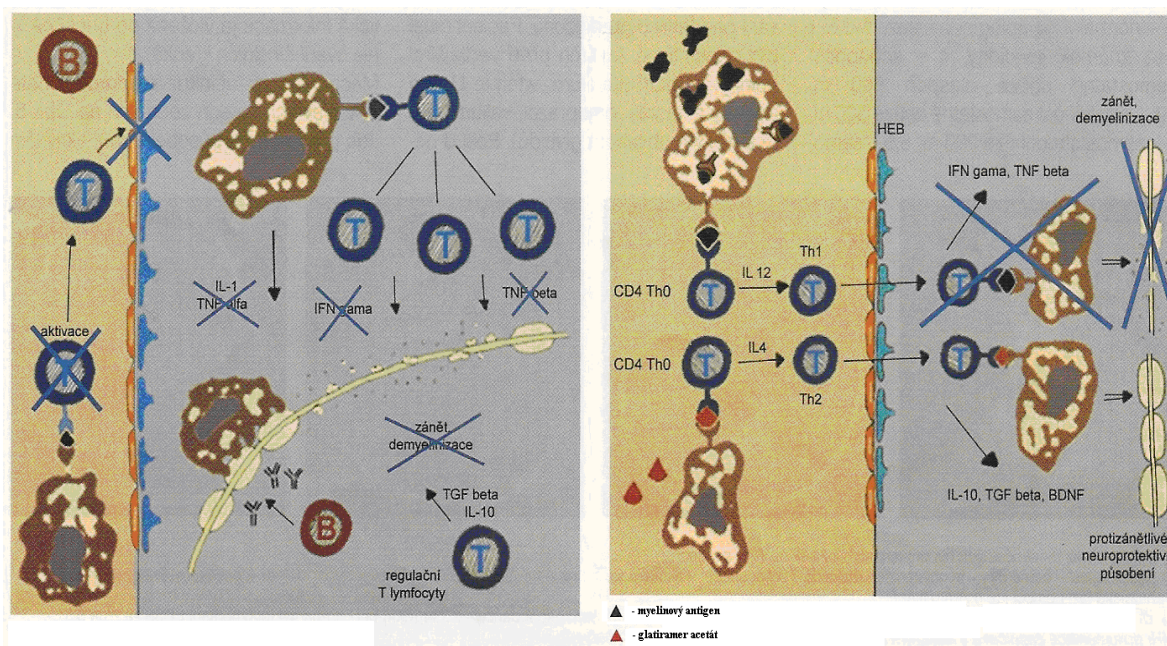
6.2 Možnosti dlouhodobé terapie

Dlouhodobá terapie je určena ke snížení relapsů a ke zpomalení progresu nemoci. Nejúčinnější je, pokud je zahájena včas. Pak může omezit počet atak a zpomalit atrofii CNS. V klinické praxi jsou již několik let velmi úspěšně užívány dva léky. Prvním je interferon beta (IFN β), druhým glatiramer acetát (GA). Jsou nazývány tzv. léky první volby.

- Interferon beta – jedná se o cytokin druhově specifický a pro léčebné účely musí být připraven náročnými biotechnologickými metodami. Je schopen zánět tlumit a působit tak proti aktivitám IFN γ , který rozpoutává kaskádu stimulace imunitní reakce. Snižuje produkci a účinky IFN γ , TNF a IL-1, expresi aktivačních molekul na buňkách imunitního systému, MHC molekul II. třídy. Působením IFN β se snižuje propustnost krevně mozkové bariéry. Dochází totiž k zablokování adhezních interakcí, tlumení účinku matrixových metaloproteináz a migrace leukocytů. Stimuluje tvorbu IL-10 a tím tlumí aktivitu subsetu T_H1 lymfocytů. Pomáhá zlepšit funkci tlumivých T buněk. Je také schopen zprostředkovat produkci neurotrofinu nervového růstového faktoru(31). V klinických pokusech byl schopen snížit počet relapsů o 30%, jejich závažnost a rovněž snížit počet nově vznikajících ložisek.
- Glatiramer acetát (GA) – je to synteticky připravený kopolymer čtyř aminokyselin (glutamin, alanin, lysin, tyrosin), nejčastěji se opakujících v MBP, hlavním myelinovém antigenu. Teoretickým základem účinku je představa navázání GA na vazebné místo pro antigen na APC, čímž nedovolí rozpoznat pravý antigen myelinu. T buňkami. Ty rozpoznají „antigenní šidítko“ a pomnoží se do subpopulací T_H2 a T_H3 a přestoupí HEB. Produkci protizánětlivých a imunosupresivních cytokinů tlumí zánět přímo v CNS. Jde o první antigen – specifickou léčbu RS. Snižuje počet relapsů a oddaluje progresi neurologického deficitu.
- Intravenózní imunoglobuliny – řadí se mezi tzv. léky druhé volby, a to pro nedostatek údajů o jejich nejvhodnějším dávkování. Vykazují imunosupresivní účinek (blokují prozánětlivé cytokiny a jejich receptory), regulují idiotypové – antiidiotypové sítě (protilátky proti autoprotiátkám) a přívod trofických faktorů nutných pro remyelinizaci a ochranu buněk CNS. Molekuly protilátek se rozpadají přibližně za čtyři týdny, proto je nutné dávkovat v tomto intervalu.
- Azathioprin – patří mezi cytostatika a léky druhé volby s imunosupresivním účinkem. Prokázal snížení aktivity nemoci v MRI obraze o téměř 60%.

Obrázek 17. Mechanismus působení IFN β

Obrázek 18. Mechanismus působení GA



6.3 Experimentální terapie

Asi 3% pacientů s RS nereagují dostatečně na konvenční metody léčby a dochází u nich k rychlé progresi nemoci. Těmto pacientům jsou nabízeny experimentální možnosti léčby.

Mezi ty patří vysokodávkovaná imunoablace, kdy po stimulaci cyklofosfamidem se z kostní dřeně do periferie vyplaví hematopoetické kmenové buňky, které jsou poté sesbírány leukaferézou (CD34+) a vyčištěny od zralých T lymfocytů a zamrazeny. Následuje vlastní imunoablace krevních a imunitních buněk podáním vysokých dávek cytostatik. Posledním krokem je navrácení kmenových buněk do tělního oběhu pacienta. Cílem léčby je likvidace autoagresivních T buněk a docílení větší tolerance autoantigenů. Nevýhodou je, že v každém štěpu kmenových buněk musí zůstat část T lymfocytů, které mohou být opětovným zdrojem relapsu nemoci.

Za terapeutický postup s velkým teoretickým i praktickým potenciálem je možné považovat perorální podávání antigenů vůči kterým má být indukována tolerance. Imunitní systém sliznic má tendenci neodpovídat na podněty, kterým je vystaven. Makromolekuly, jenž jsou požitý jsou degradovány jen částečně, zvláště pokud je podána velká dávka antigenů, a jsou schopny indukovat proliferaci regulačních T_r T lymfocytů. Ty produkují protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF β . Jsou očekávány výsledky z probíhajících klinických studií, ve kterých je podáván GA a IFN β orálně. Úspěch podávání MBP nebyl tak vysoký, jak se myslelo. Nejsnáze se tolerance dosahuje těsně po narození a u antigenů, na které není jedinec ještě senzitivován. Oba předpoklady bohužel neplatí pro pacienty s RS.

Zatím spíše teoretickou možností je zvýšená reparace poškozené tkáně modulací působením cytokinů nebo nahrazování poškozených lézí transplantací neuronálních kmenových buněk.

Novou terapií za posledních deset let je natalizumab, u kterého stále probíhá řada klinických studií a to i v Čechách (asi u sto padesáti pacientů). Jedná se o rekombinantní IgG-4 humanizovanou monoklonální protilátku proti alfa4beta1-integrinu, blokující adhezi imunitních buněk k mozkovému endotelu. Účinnost léčby natalizumabem na zánětlivou složku nemoci dosáhla v klinických pokusech 68%, došlo k redukci progresu celkového postižení měřeného na škále EDSS přibližně o polovinu. Závažným nežádoucím účinkem u pacientů s oslabenou imunitou užívajících natalizumab bylo pomnožení JC viru (polyomavirus latentně přítomný v organismu) v oligodendroglia, za jehož transport do CNS jsou zřejmě zodpovědné B lymfocyty. JC virus způsobuje progresivní multifokální leukoencefalopatii (PML) (32). Jde o oportunistickou infekci mozku s destrukcí myelinizace. V současné době je nemožné určit riziko propuknutí PML u pacientů (33).

6.4 Symptomatická terapie

Součástí léčby je i symptomatická terapie, která alespoň z části kontroluje příznaky jako je spasticita, sfinkterové a sexuální poruchy, bolest, třes, eventuálně únava.

Právě únava se stala předmětem nedávného výzkumu, při kterém byli porovnáváni pacienti s RS a pacienti po prodělané mozkové mrtvici. Ukázalo se, že únava je častější u lidí trpících RS, nezávisle na míře handicapu. Za nejvýznamnější jsou považovány dopady psychické, zhoršení koncentrace, pokles motivace a podrážděnost (34). S tím také souvisí výskyt deprese u pacientů, která se objevuje až u poloviny nemocných RS a negativně ovlivňuje průběh choroby. Depresivní nálady jsou hlavním faktorem negativně ovlivňujícím kvalitu života (36). Konstruktivní myšlení pacienta má naopak příznivý vliv na budoucí komplexní léčbu (35).

Velmi důležitá je prevence a léčba infekčních onemocnění, jež aktivují imunitní systém.

7 Budoucí směr mé práce

Tématu patogeneze roztroušené sklerózy bych se ráda věnovala i v rámci diplomové práce, konkrétně se zaměřením na přítomnost CD8+ T lymfocytů v cerebrospinálním moku pacientů s RS a expresi cytokinových receptorů na jejich povrchu v závislosti na typu RS, EDSS a terapii pacienta. A to v laboratoři Klinické imunologie a alergologie Všeobecné fakultní nemocnice na Karlově náměstí, kam jsem docházela již během bakalářské práce a pod vedením doktorky Heleny Marečkové se učila laboratorním úkonům potřebným pro analýzu mozkomíšního moku na průtokovém cytometru.

Závěr

Mnoho významných pokroků bylo učiněno v pohledu na patogenetické pochody RS během posledních let. Například objasnění mechanismu destrukce oligodendrocytů a axonálního poškození vysvětlilo řadu nejasností v klinickém průběhu nemoci. Naše vědomosti o patogenези vycházejí ze zjištění, že u tohoto onemocnění jsou přítomny všechny patogenetické mechanismy rozpoznané u experimentální alergické encefalitidy, která je prototypem autoimunitního onemocnění. Přesto stále v patogenези RS zůstávají nezodpovězené otázky. Rychlý pokrok molekulární biologie a imunologie slibují, že v blízké budoucnosti budou otázky zodpovězeny a tyto obory dají k dispozici klinicky využitelné postupy, jež budou schopny tlumit zánětlivé reakce účinněji a s menšími vedlejšími účinky než nynější léčebné možnosti.

Výzkum RS je neobyčejně náročný hned z několika důvodů. Příčina nemoci je stále neznámá. Často uběhne mnoho let, než se nemoc zřetelně projeví a je diagnostikována, proto je nemožné určit konkrétní příčinu nebo spouštěcí mechanismus. Všeobecně je přijímána představa o kombinaci genetických, enviromentálních a imunologických faktorů. Nemoc postihuje nejméně přístupné části těla – mozek a míchu. Ačkoliv rozlišujeme čtyři typy RS, nejsou zde žádné pevné hranice mezi modely a jednoduchá schémata nemoci. Vývoj nemoci je nepředvídatelný a počet a poloha lézí v CNS nutně nekoreluje s výskytem relapsů a mírou handicapu. Stále nejsou k dispozici definitivní testy k průkazu nemoci.

K diagnóze však významně pomohl rozvoj MRI, která dovolila sledovat proces zánětu in vivo s většími detaily a která snad ještě objasní změny pozorované v mozku pacientů s RS.

Bohužel stále platí, že onemocnění není možné vyléčit. U většiny pacientů nedochází již k podstatnému zkracování života, zato jeho kvalita je snižována narůstajícími omezeními v běžném životě. RS představuje důležitou medicínskou, psychosociální a ekonomickou zátěž pro jedince i pro společnost a proto zaslouží naši pozornost.

Seznam použité literatury:

1. Havrdová E, a kol. Neuroimunologie. Praha, Maxdorf, 2001.
2. Havrdová E. Roztroušená skleróza. 2. vydání. Praha, Triton, 2000.
3. Havrdová E, Horáková D. Postgraduální medicína, 2004, 6, č. 4.
4. Jedlička P, Keller O, et al. Speciální neurologie. Praha, Galén, 2005.
5. Hořejší V, Bartůňková J. Základy imunologie. 3. vydání. Praha, Triton, 2005.
6. van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, et al. *Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study.* BMJ 2003; 327:316.
7. Alter M, Kahana E, Zilber N, Miller A. *Multiple sclerosis frequency in Israel's diverse populations.* Neurology 2006; 66(7):1061-1066.
8. Karni A, Kahana E, Zilber N, Abramsky O, Alter M, Karussis D. *The frequency of multiple sclerosis in jewish and arab populations in greater Jerusalem.* Neuroepidemiology 2003; 22(1):82-86.
9. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, Ascherio A. *Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis.* JAMA. 2005; 293(20):2496-2500.
10. Di Rosa F, Barnaba V. *Persisting viruses and chronic inflammation: understanding their relation to autoimmunity.* Immunol. Rev., 1998; 164:17-27.
11. Christensen T. *The role of EBV in MS pathogenesis.* Int MS J. 2006; 13(2):52-57. Review.
12. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Bussow K, Sommer N, Hemmer B. *Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis.* J Clin Invest. 2005; 115(5):1352-1360.
13. Sriram S, Yao SY, Stratton C, Calabresi P, Mitchell W, Ikejima H, Yamamoto Y. *Comparative study of the presence of Chlamydia pneumoniae in cerebrospinal fluid of Patients with clinically definite and monosymptomatic multiple sclerosis.* Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9(6):1332-1337.
14. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. *The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis.* Mult Scler. 1998; 4(3):111-117.
15. Bednářová J, Adam P. *Likvorový profil u roztroušené sklerózy mozkomíšni.* Neurologie pro praxi 2002/5:249-251.
16. Cassan C, Liblau RS. *Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: from animal models to MS patients.* J Neurochem. 2007; 100(4):883-892. Epub 2006.

17. Schulz M, Engelhardt B. *The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis.* Cerebrospinal Fluid Res. 2005; 2:8.
18. Hartung HP, Kieseier BC. *The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system.* J Neuroimmunol. 2000; 107(2):140-147. Review.
19. Bacon KB, Harrison JK. *Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis.* J Neuroimmunol. 2000; 104(1):92-97. Review.
20. Prat A, Biernacki K, Lavoie JF, Poirier J, Duquette P, Antel JP. *Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium.* Arch Neurol. 2002; 59(3):391-397.
21. Chan A, Seguin A, Magnus T, et al. *Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta.* Glia 2003; 43:231-242.
22. Chakfe Y, Seguin R, Antel JP, Morissette C, Malo D, Henderson D, Seguela P. *ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels.* J Neurosci. 2002; 22(8):3061-3069.
23. Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H. *Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions.* Brain Pathol. 2004; 14(1):43-50.
24. Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R, Goebels N. *Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(8):2428-2433.
25. Liu GZ, Fang LB, Hjelmstrom P, Gao XG. *Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis.* Mult Scler. 2007; 13(2):149-155. Epub 2007.
26. Redwine JM, Buchmeier MJ, Evans CF. *In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection.* Am J Pathol. 2001; 159(4):1219-1224.
27. Popko B, Baerwald KD. *Oligodendroglial response to the immune cytokine interferon gamma.* Neurochem Res. 1999; 24(2):331-338. Review.

28. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination.* Ann Neurol. 2000; 47(6):707-717.
29. Barnett MH, Prineas JW. *Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion.* Ann Neurol 2004; 55:458-468.
30. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. *A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases.* Brain. 1999; 122 (Pt 12):2279-2295.
31. Biernacki K, Antel JP, Blain M, Narayanan S, Arnold DL, Prat A. *Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis.* Arch Neurol. 2005; 62(4):563-568.
32. Khalili K, White MK, Lublin F, Ferrante P, Berger JR. *Reactivation of JC virus and development of PML in patients with multiple sclerosis.* Neurology. 2007; 68(13):985-990.
33. Stuve O, Marra CM, Cravens PD, Singh MP, Hu W, Lovett-Racke A, Monson NL, Phillips JT, Cohen Tervaert JW, Nash RA, Hartung HP, Kieseier BC, Racke MM, Frohman EM, Hemmer B. *Potential risk of progressive multifocal leukoencephalopathy with natalizumab therapy: possible interventions.* Arch Neurol. 2007; 64(2):169-176. Review.
34. Gramigna S, Schlupe M, Staub F, Bruggimann L, Simioni S, Bogousslavsky J, Annoni JM. *Fatigue in neurological disease: different patterns in stroke and multiple sclerosis.* Rev Neurol (Paris). 2007; 163(3):341-8.
35. Emelin EV, Enikolopov SN, Boiko AN, Gusev EI. *The possibilities of adaptation of patients with multiple sclerosis: the results of clinical and psychological study.* Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova. 2006; Spec No 3:64-72.
36. Lobentanz IS, Asenbaum S, Vass K, Sauter C, Klosch G, Kollegger H, Kristoferitsch W, Zeitlhofer J. *Factors influencing quality of life in multiple sclerosis patients: disability, depressive mood, fatigue and sleep quality.* Acta Neurol Scand. 2004; 110(1):6-13.
37. Krejsek J, Kopecký O, Taláb R. *Imunopatogeneze roztroušené sklerózy.* Neurologie pro praxi. 2002; 5:236-243.
38. Zang YC, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, Killian J, Zhang JZ. *Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis.* J Immunol. 2004; 172(8):5120-7.

39. Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G, Probert L. *Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy.* Am J Pathol. 1998; 153(3):801-813.

Přílohy

Obrázek:

1. *Prevalence RS ve svět.* . <http://atlasofms.org>.
2. *Prevalence RS v Evropě.* <http://atlasofms.org>.
3. *Průběh RS.* Havrdová E, Horáková D. Postgraduální medicína, 2004, 6, č. 4.
4. *Vazba antigenu na TcR.* Havrdová E, a kol. Neuroimunologie. Praha, Maxdorf, 2001. str. 123.
5. *Kostimulační signály při interakci antigen prezentující buňky s T lymfocylem.* Hořejší V, Bartůňková J. Základy imunologie. 3. vydání. Praha, Triton, 2005. str 134.
6. *Působení metaloproteináz v patogenezi RS.* Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. J Neuroimmunol. 2000; 107(2):144. Review.
7. *Hlavní terče autoimunitní reakce – myelinové antigeny – u RS.* Krejsek J, Kopecký O, Taláb R. Imunopatogeneze roztroušené sklerózy. Neurologie pro praxi. 2002; 5:238.
8. *Cytologický nález v likvoru pacientů s RS – plazmocyty.* Bednářová J, Adam P. Likvorový profil u roztroušené sklerózy mozkomíšní. Neurologie pro praxi 2002/5:249.
9. *Zdravá nervová buňka s myelinizovaným axonem.*
http://mssociety.org.uk/about_ms/what_is_ms/index.html.
10. *Demyelinizované vlákno nervové buňky.*
http://mssociety.org.uk/about_ms/what_is_ms/index.html.
11. *Kondukční blok vedení nervového vzruchu a následná remyelinizace.* <http://roska-czmss.cz /onemoci.shtml>.
12. *Imunopatogeneze RS* Piřha J. Farmakoterapie – Novinky a trendy v terapii roztroušené sklerózy. <http://farmakoterapie.cz/cz/ClanekTisk/290>.
13. *MRI vyšetření, T2 obrazy – axiální rovina.* Feitová V. Současné možnosti a význam vyšetření magnetickou rezonancí v diagnostice roztroušené sklerózy mozkomíšní. Neurologie pro praxi 2002; 5:253.

14. *MRI vyšetření, T2 obrazy – sagitální rovina*. Feitová V. Současné možnosti a význam vyšetření magnetickou rezonancí v diagnostice roztroušené sklerózy mozkomíšni. *Neurologie pro praxi* 2002; 5:253.
15. *Mozek – limborové prostory*. Silbernagl S, Despopoulos A. Atlas Fyziologie člověka. 6. vydání. Praha, Grada, 2004. str.311.
16. *Oligoklonální pásy IgG*. Bednářová J, Adam P. Likvorový profil u roztroušené sklerózy mozkomíšni. *Neurologie pro praxi* 2002/5:250.
17. *Mechanismus působení IFN β* . Havrdová E, Horáková D. *Postgraduální medicína*, 2004, 6, č. 4.
18. *Mechanismus působení GA*. Havrdová E, Horáková D. *Postgraduální medicína*, 2004, 6, č. 4.

Graf:

1. *Reiberův diagram pro IgG*. Havrdová E, a kol. *Neuroimunologie*. Praha, Maxdorf, 2001. str.57.
2. *Výsledky vyšetření likvoru na průtokovém cytometru*.
3. *Výsledky vyšetření likvoru na průtokovém cytometru*.
4. *Výsledky vyšetření likvoru na průtokovém cytometru*. Grafy 2, 3, 4 zapůjčeny MUDr. H. Marečkovou, CSc., Ústav imunologie a mikrobiologie I.LF a VFN .
5. *Vizuální evokované potenciály. Normální nález*. Havrdová E. *Roztroušená skleróza*. 2. vydání. Praha, Triton, 2000. str.54
6. *Vizuální evokované potenciály. Stav po retrobulbární neuritidě*. Havrdová E. *Roztroušená skleróza*. 2. vydání. Praha, Triton, 2000. str.54

Tabulka

1. *Kurtzkeho škála postižení hybnosti*. Krhut J, Hradílek P, Mainer K, Zapletalová O. Funkce horních močových cest u pacientů s roztroušenou sklerózou. *Neurologie pro praxi*. 2006; 1:28