

**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Autorský referát

**PROTEOMIKA, LYMFOCYTÁRNÍ POPULACE
U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY A DISABILITA**

Disertační práce v oboru Neurologie

Školitel:
Doc. MUDr. Martin Vališ, Ph.D.

Autor:
MUDr. Zbyšek Pavelek

Hradec Králové, 2018

ÚVOD

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je imunopatologické onemocnění charakterizované zánětlivým poškozením struktur centrálního nervového systému a neurodegenerativními změnami mozku (Krejsek, 2014). Je charakterizována infiltrací leukocytů do centrálního nervového systému (CNS), lokální destrukcí myelinových obalů nervových vláken a postupnou ztrátou oligodendrocytů a axonů (Goodin et Bates, 2009). Onemocněním je v Evropě postiženo více než 700 000 pacientů, celosvětově pak více než 2,5 miliónů (Browne et al., 2013). Přes značné pokroky v diagnostice a léčbě tohoto závažného onemocnění zůstává etiologie RS neznámá.

V patogenezi se předpokládá vliv genetických i environmentálních faktorů (Steinman, 2001). Mezi environmentální vlivy řadíme nedostatek vitamínu D, nedostatečnou expozici slunečnímu záření, virové infekce, stres a rovněž kouření a střevní mikrobiota (Holick, 2004; Salzer et al, 2012; Pohl et al., 2006). Primární roli v patogeneze RS má pravděpodobně geneticky determinovaná imunitní odpověď. „Genome-wide association study“ jednoznačně potvrdily geneticky determinovanou dysfunkci T a B buněk (Matesanz et al., 2012; Hindorff et al., 2009). Na rozvoj RS prokazatelně působí HLA systém (Human Leucocyte Antigen). Zvýšené riziko mají nosiči alely HLA-DRB5*0101, HLA-DRB1*1501, HLA-DQA1*0102 a HLA-DQB1*0602 (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2005). U takto geneticky disponovaného jedince dojde vlivem působení vnějších faktorů k rozvoji zánětlivé odpovědi vedoucí k demyelinizaci, axonální a neuronální ztrátě.

RS je nemoc, jejíž imunopatogeneze je poměrně dobře známa a má vytvořen experimentální zvířecí model, tzv. experimentální autoimunitní encefalitidu (EAE).

ROLE IMUNITNÍHO SYSTÉMU V PATOGENEZI RS

CNS byl tradičně považován za imunoprivilegovanou část organismu (Weller et al., 2006). Předpokládalo se, že neexistuje imunitní dohled na CNS. Tento názor se však v současné době dramaticky změnil. Hematoencefalická bariéra je regulovaně prostupná pro buňky imunitního systému, což se dříve nepředpokládalo (Sallusto et al., 2012). Navíc mikroglie, které jsou součástí

monocyto-makrofágového systému, jsou velmi aktivní v imunitní regulaci (Ransohoff and Perry, 2009). Vzájemná interakce mezi T-lymfocyty a mikroglie pak hraje významnou roli ve vzniku demyelinizačních lézí CNS.

Bariéra mezi cévním řečištěm a CNS je nazývána hematoencefalická. Morfologickým podkladem hematoencefalické bariéry je z krevní strany souvislá vrstva endotelu mozkových kapilár přiléhající k bazální membráně a ze strany mozkového parenchymu vrstva astrocytů a mikroglie. Endotel mozkových kapilár se odlišuje od endotelu v jiných lokalizacích tím, že je bez fenestrací a endotelové buňky jsou spojeny těsnými kontakty (tight junction).

Vstup aktivovaných lymfocytů do CNS je několikastupňový proces, který je významně usnadněn v průběhu zánětlivé reakce. Za působení cytokinů, např. TNF α (Tumor Necrosis Factor α), interleukinu 1 (IL-1) nebo IL-6, dochází k adhezi aktivovaných převážně paměťových T-lymfocytů na endotelové buňky mozkových kapilár. Zde je nezbytná interakce mezi adhezní molekulou ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) na endotelové buňce a LFA1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) doplněná o interakce mezi integrinovou adhezní molekulou VLA-4 (Very Late Antigen-4) na lymfocytech a molekulou VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) na endotelových buňkách. Následuje průnik lymfocytu hematoencefalickou bariérou do mozkového parenchymu pomocí proteolytických enzymů (matrixových metaloproteáz). Tyto proteázy lymfocyty samy produkují. Jejich pohyb v CNS je řízen prostřednictvím cytokinů, které jsou tvořeny především buňkami imunitního systému. 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-1 α (Macrophage Inflammatory Protein) (Bacon and Harrison, 2000). Během zánětlivého procesu se také stává endotel prostupný pro makromolekuly z plazmy, zvyšuje expresi molekul HLA II.třídy a adhezních molekul.

Role T-lymfocytů v patogenezi RS

T-lymfocyty po vzniku v kostní dřeni migrují do thymu, kde dozrávají. Rozlišujeme dvě kategorie lymfocytů. T_C lymfocyt – cytotoxický T-lymfocyt ničí virem napadené a nádorové buňky. T_C lymfocyty se označují jako CD8⁺ T-lymfocyty pro přítomnou CD8 diferenciační skupinu povrchových glykoproteinů na jejich vnější straně cytoplazmatické membrány. T_H lymfocyt –

pomocný T-lymfocyt pomocí cytokinů stimuluje imunitní reakci. Dělí se především na Th1 lymfocyty a Th2 lymfocyty. Th lymfocyty označujeme jako CD4⁺ T-lymfocyty.

K aktivaci autoreaktivních T-lymfocytů dochází v periferních lymfatických uzlinách. Tohoto procesu se účastní antigen prezentující dendritické buňky, které na svém povrchu vystavují antigenní peptidy za pomoci MHC II. třídy (Major Histocompatibility Complex). Tyto MHC komplexy následně rozeznává T-lymfocyt pomocí svého T-buněčného receptoru. Aktivované T-lymfocyty poté migrují do CNS, kde dochází k zánětlivé reakci.

Už v modelu EAE bylo prokázáno, že některé struktury v CNS jsou pravděpodobným terčem autoreaktivních T-lymfocytů. Onou klíčovou strukturou jsou myelinové obaly nervových vláken. V CNS jsou myelinové obaly nervových vláken produkovány oligodendrocyty. Základním stavebním kamenem myelinu je myelinový bazický protein (MBP). MBP se zároveň považuje za nejdůležitější autoantigen v patogenezi RS. Je prokázána shoda v sekvencích aminokyselin tohoto proteinu se sekvencemi viru Epstein-Barrové (EBV) (Wucherpfennig and Strominger, 1995). Pomocí longitudinálních analýz vzorků séra sbíraných více než 10 let před propuknutím RS bylo zjištěno, že riziko vývoje RS se signifikantně zvyšuje se zvyšujícím se titrem protilátek ve třídě IgG vůči EBV (Lünemann et al., 2007). Dále existuje shoda v sekvencích aminokyselin MBP s polymerázou viru hepatitidy B, proteinů virů spalniček, herpes simplex viru, lidským herpes virem 6 (HHV-6), virem chřipky i adenovirem (Faure, 2005; Gudmundsdottir et al., 2006; Liebert, Linington et ter Meulen, 2008; Lünemann et al., 2007; Soldan et al, 2007). Jiné autoantigeny, resp. strukturální proteiny myelinu, podílející se na patogenezi RS jsou MAG, MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein), PLP (Proteolipid Peptide) a MOBP (Myelin-associated oligodendrocyte basic protein) (de Rosbo et al., 2004).

V zánětlivé reakci dominuje působení Th1 T-lymfocytů, Th17 T-lymfocytů a aktivovaných makrofágů. **Subpopulace Th1 T-lymfocytů** je odpovědný za rozvoj cytotoxické reakce. Th1 T-lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny interferon γ (INF γ), Tumor Necrosis Factor β (TNF β) a interleukin 2 (IL-2). Th17 T-lymfocyty mají pravděpodobně rozhodující roli v imunopatogenezi RS. Tento subset produkuje interleukiny IL-17, IL-21, IL-22 a IL-26. IL-17 receptory jsou přítomny v akutních i chronických plakách RS. Komiyama et al. (2006) prokázali významné snížení klinické závažnosti onemocnění u IL-17 deficientních myši. Treg T-lymfocyty působí regulačně proti

aktivitám subsetu Th17. Dysfunkce Treg T-lymfocytů má významnou roli v patogenezi RS (Costantino, Baecher-Allan et Hafler, 2008).

Th2 subpopulace T-lymfocytů působí v antagonistickém vztahu k Th1 subpopulaci T-lymfocytů. Produkují protizánětlivé cytokiny IL-4 a IL-13, rovněž reguluje diferenciaci B-lymfocytů, izotypové přepnutí syntézy imunoglobulinů (Gandhi, Laroni et Weiner, 2009).

Cytotoxické T-lymfocyty přítomné v lézích mají regulační funkci ve vztahu k progresi onemocnění. Zprostředkovávají supresi T_H-lymfocytů prostřednictvím sekrece perforinu, který je pro T_H-lymfocyty cytotoxický. Rovněž způsobují transekcí axonů a zvyšují vaskulární permeabilitu (Kasper et Shoemaker, 2010).

Role T-lymfocytů v imunopatogenezi RS je komplexní, zahrnující prozánětlivé i protizánětlivé pochody.

Role B-lymfocytů v patogenezi RS

Přestože byly T-lymfocyty donedávna považovány za zcela klíčovou součást patogeneze RS, nelze opomíjet ani podíl humorálních složek imunity na poškozující zánětlivé reakci. B-lymfocyty jsou zodpovědné především za specifickou, protilátkami zprostředkovanou imunitní odpověď. Exprimují CD20. Vznikají v kostní dřeni, jejich další zrání probíhá po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Diferencují v plazmatické buňky, které produkují imunoglobuliny a paměťové buňky.

Autoreaktivní B-lymfocyty mají významnou roli ve zprostředkování poškození tkáně u nemocných s RS. Prostupují hematoencefalickou bariérou, procházejí po stimulaci autoantigenem procesem zrání a klonální expanze v CNS. Tato populace B-lymfocytů a plazmatických buněk může být detekována v lézích RS, v mozkomíšním moku, dokonce i periferní krvi (Hauser, 2015). Vyšetření mozkomíšního moku je velmi důležité vyšetření napomáhající k definitivní diagnóze RS (Polman et al., 2011). Izoelektrickou fokusací vzorku mozkomíšního moku lze u nemocných s RS nalézt tzv. oligoklonální pásy, které jsou považovány za důkaz oligoklonální expanze B-lymfocytů nacházejících se přímo v CNS. Přítomnost oligoklonálních imunoglobulinů je důkazem intratékální

syntézy specifických protilátek. Na zvýšené hladině imunoglobulinů v likvoru nemocných s RS se největší měrou podílejí protilátky v třídě IgG.

Role B-lymfocytů v patogenezi RS je velmi různorodá. Produkují protilátky, jsou vysoce efektivní antigen-prezentující buňky (APC), tvoří cytokiny (protizánětlivé IL-10 a prozánětlivé TNF α a IL-6). V neposlední řadě tvoří ektopické lymfoidní folikuly, které byly nalezeny na meningách nemocných se sekundárně progresivní RS.

LÉČBA RS A JEJÍ CÍLE

V České republice jsou aktuálně pro léčbu pacientů s RS dostupné interferon β -1a (INF β -1a (30 mcg v intramuskulární injekci 1x týdně), glatiramer acetát (GA) (20 mg v podkožní injekci denně nebo 40 mg 3x týdně), interferon β -1b (INF β -1b) (0.25 mg (1 ml) subkutánně obden), INF β -1a (22 mcg nebo 44 mcg subkutánně 3x týdně), peginterferon β -1a (125 mcg v podkožní injekci 1 x za 14 dní), teriflunomid (14 mg perorálně denně), DMF (240 mg perorálně 2x denně), fingolimod (0,5 mg perorálně denně), natalizumab (300 mg v intravenózní infuzi 1x za 4 týdny) a alemtuzumab (ve dvou cyklech intravenózně po 12 měsících, v prvním cyklu 5 dnů po sobě 12 mg, po 12 měsících 3 dny po sobě 12 mg). Předpokládá se, že kladribin a ocrelizumab rozšíří lékové portfolio na přelomu roku 2018/2019.

V současné době je snahou postihnout více parametrů, které mohou být ovlivněny RS. Tyto parametry jsou součástí konceptu léčby RS - NEDA (No Evidence of Disease Activity). Ten je obvykle definován absencí relapsů, progrese disability a aktivity na MR (Lu et al., 2018; Parks et al., 2017). Léčba dle moderního konceptu NEDA-4 znamená pro pacienta s RS dosažení stavu, kdy: 1. nemá žádný potvrzený relaps onemocnění, 2. je bez progrese v EDSS (Expanded disability status scale), 3. neobjevují se nové T2 hyperintenzní léze nebo gadolinium enhancující léze při provedené MR mozku, 4. atrofie mozku není větší než 0,4 % za rok (Cree et al., 2015). V klinické praxi je reálnější použití konceptu MEDA (Minimal Evidence of Disease Activity). Tento koncept toleruje určitý stupeň aktivity onemocnění (koncept lze použít pro nemocného, který se jeví jako stabilní ve srovnání s pacientem s vyšší aktivitou nemoci v krátkodobém či střednědobém intervalu) (Giovannoni et al., 2017).

Protože se neuronální ztráta objevuje již v časných stádiích nemoci a ztráta neuronů pod určitou hranici vede k nevratné ztrátě funkce, je nezbytné neodložit zahájení léčby po definitivním stanovení diagnózy RS. Zásadní terapeutické opatření je proto zasáhnout už v počáteční fázi onemocnění (pozn. CIS) tak, aby došlo k oddálení progresu choroby a zabránění invalidizace (Shirani et al., 2012). Pacienti, jejichž léčba je zahájena později, nemají stejný benefit léčby jako pacienti se zahájením léčby v časných stádiích nemoci (Miller, 2004).

PREDIKTORY LÉČBY A PRŮBĚH ONEMOCNĚNÍ

Relaps onemocnění

Snížení počtu relapsů je jeden ze základních léčebných cílů. Přesto vztah mezi relapsy onemocnění a disabilitou zůstává nadále nejasný. Scalfari et al. (2010) ve své práci, která zahrnovala 28 000 pacientoroků (pacientorok představuje součet všech časových období, ve kterém byli léčeni všichni pacienti) konstatoval, že vysoká klinická aktivita v průběhu prvních dvou let nemoci a krátký interval mezi první a druhou atakou jsou nepříznivé faktory ve vztahu k dosažení významné poruchy chůze při EDSS 6.0 (chůze do 100 m bez dopomoci, více než 50 m s dopomocí jedné hole nebo více než 120m s dopomocí 2 holí či druhé osoby). Tremlett et al. (2009) publikovali práci, ve které popsali skutečnost, že relaps v prvních pěti letech nemoci je prediktivní k rozvoji disability ve vztahu k následné sekundární progresi. Na základě těchto publikovaných studií by se dalo předpokládat, že význam pro rozvoj sekundární progresu mají pouze relapsy v časném stádiu onemocnění. Nicméně přibližně u poloviny relapsů nedojde k plné úpravě zdravotního stavu pacienta a rovněž tato skutečnost může hrát určitou roli v rozvoji disability (Hirst et al., 2008).

Magnetická rezonance

Magnetická rezonance (MR) je základní metodou k diagnostice RS a sledování účinnosti léčby. Nezbytné k monitoraci nemoci jsou T2-vážené snímky a T1-vážené snímky s podáním

kontrastní látky (Wattjes et al., 2015). Rio et al. (2008) publikovali práci, ve které zmínili vyšší riziko selhání léčby interferonem beta (INF β), pokud pacient vyvine více než 2 aktivní léze v průběhu prvního roku terapie (nově nebo zvětšené T2 léze a nové gadolinium enhancující léze). Při monitorování pacientů s DMD (Disease Modifying drugs) léčbou je potřeba znát skutečnost, že nález na vstupní MR před zahájením léčby uspokojivě nepredikuje odpověď na budoucí léčbu. Následné MR v průběhu několika měsíců již tuto vypovídající hodnotu mají. Proto by měla být další vyšetření prováděna na identickém přístroji a je vhodné provést kontrolní MR za 6 a 12 měsíců od zahájení léčby (Montalban et al., 2018). Přítomnost nových nebo zvětšujících se T2 lézí predikuje zhoršení EDSS v čase (Prosperini et al., 2009; Prosperini et al., 2014). Přes tento fakt samostatná přítomnost nových nebo zvětšujících se T2 lézí nevede v současné době k eskalaci léčby, ale je varovným signálem jejího možného selhání. Další faktor, který může pomoci predikovat dlouhodobý vývoj, je atrofie mozku. Di Filippo et al. (2011) konstatovali, že míra progresu mozkové atrofie v prvním roce u pacientů s CIS koreluje s konverzí do CDMS.

MR je nezbytná k monitoraci oportunních infekcí a komorbidit – pro pacienty léčené natalizumabem ve vysokém riziku PML (léčba déle než 18 měsíců a pozitivita protilátek proti JCV) je doporučeno provádět kontrolní MR v intervalu 3 – 6 měsíců, pro pacienty v nízkém riziku PML v intervalu 12 měsíců, pro pacienty s ukončenou léčbou natalizumabem (a zahájením léčby fingolimodem, alemtuzumabem nebo DMF) pak každých 3 – 6 měsíců po dobu 12 měsíců (Wattjes et al., 2015).

Neurodegenerativní procesy

Přestože je RS charakterizována fokální demyelinizací s postižením bílé hmoty, mozková atrofie se objevuje již v časných stádiích nemoci a může vést k ireverzibilní ztrátě neurologických funkcí včetně postižení kognitivních funkcí. Je známo, že míra mozková atrofie koreluje lépe s disabilitou a kognitivní dysfunkcí než počet a objem lézí bílé hmoty. Mozková atrofie kvantifikuje neurodegenerativní procesy u RS. Calabrese et al. (2012) publikovali práci, ve které konstatovali, že progresu kortikální atrofie byla signifikantně vyšší ve skupině pacientů s RS oproti zdravým kontrolám. Formulovali hypotézu, že patologie šedé hmoty mozku je časný fenomén u RS a zároveň ukázali, že progresu patologie v oblasti šedé hmoty mozku nekoreluje s objemem lézí v bílé hmotě a

tedy neurodegenerace probíhá nezávisle na postižení bílé hmoty. Podstatou neurodegenerace jsou mitochondriální defekty, které způsobí, že v důsledku zvýšené akumulace Na^+ dochází ke zvýšenému influxu iontů Ca^+ a v demyelinizačních lézích se zvyšuje množství degenerovaných axonů. Uvedený stav podporuje zvýšená hladina excitotoxických aminokyselin a glutamátu, což vede k apoptóze (Paling et al, 2011). Rovněž abnormality v metabolismu železa vedou ke ztrátě nervových buněk a hromadění depozit železa v mozku. Depozita železa se nacházejí v šedé hmotě od již časných fází RS, v progresivních fázích RS se množství železa zvyšuje. Nadále však není zřejmé, zda tato depozita jsou markerem nebo mediátorem destruktivní kaskády u RS. Je však známa korelace mezi průkazem depozit železa v mozku a klinickou dysfunkcí u RS (Zhang et al, 2010). K měření mozkové atrofie se využívá řada metod MR. Mezi tyto metody řadíme hodnocení šíře 3. komory, šíře postranní komory v oblasti nucleus caudatus nebo bifrontální vzdálenost. K sofistikovanějším metodám patří SIENA (strukturální vyhodnocení obrazu pomocí normalizace změny atrofie), nebo spektroskopické studie (koncentrace kyseliny N-acetylaspartové jako biomarkeru neuronální integrity klesá v šedé hmotě mozkové kůry, hladina cholinu se zvyšuje v oblasti zánětu a remyelinizace) (Grasior et al., 2009).

Biomarkery

Biomarker je objektivně měřitelný parametr, který je indikátorem biologických procesů, patologických procesů nebo farmakologické odpovědi.

V rozhodovacím procesu o léčbě pacienta se v běžné praxi opírá rozhodnutí o klinické nálezy a nálezy na MR. Pro predikci vývoje onemocnění (ev. rozvoj invalidity, léčebná odpověď) je nezbytné nalézt markery, které ukazují na aktivitu zánětu a intenzitu axonálního poškození. Markery je možné detekovat v periferní krvi či mozkomíšním moku. Nevýhodou biomarkerů z periferní krve je skutečnost, že jsou uvolňovány spíše extracerebrálně, než přímo z mozku (Zetterberg et Teunissen, 2017). Přítomnost oligoklonálních páسů zvyšuje riziko další ataky onemocnění. Pravděpodobnost další ataky je zvýšena dvojnásobně nezávisle na MR, nicméně přítomnost oligoklonálních páсů neovlivňuje disabilitu (Tintoré et al., 2008). Celkově je však jejich prognostický význam menší než nálezy na MR.

V současné době jsou předmětem zájmu markery neuroaxonálního poškození (NFL – neurofilament light), demyelinizace (MBP), imunitní aktivace (MMP-9 – matrixová metaloproteináza 9 a chemokinový ligand CXCL 13 a chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1). CXCL13 je prognostický marker, který se vyskytuje ve zvýšené míře u pacientů s CIS s časnou konverzí do RR RS (Brettschneider et al., 2010). U pacientů s CIS korelují hladiny NFL s morfologickými projevy zánětu a predikují konverzi do klinicky definitivní RS s horší prognózou (Salzer et al., 2010). Rovněž zvýšená hladina CHI3L1 v mozkomíšním moku predikuje u pacientů s CIS rychlejší konverzi do CDMS (Comabella et al., 2010). Byť není známo, zda aktivita nemoci souvisí u progresivní RS se změnami v mozkomíšním moku, jsou známy práce, které prokázaly změny biomarkerů v mozkomíšním moku u progresivní RS. Sellebjerg et al. (2017) prokázali u progresivní RS zvýšení koncentrace CXCL 13, NFL, MBP i MMP-9 v mozkomíšním moku.

Proteomická analýza mozkomíšního moku (CSF) zjistila řadu proteinů, jejichž koncentrace byla zvýšena u pacientů s RS (Stoop et al., 2010). Byly již publikovány proteomické studie představující kandidáty na biomarkery u RS kde byly různé podskupiny RS porovnány s různými kontrolními skupinami. Pacienti s RR RS měli oproti zdravým kontrolám v CSF vyšší hladinu alpha-1 antichymotrypsinu (A1AC), alpha-1 makroglobulinu (A2MG) a fibulin 1. Nemocní se sekundárně-progresivní RS vykazovali vyšší hladinu kontaktinu 1 (CNTN1), fetuinu A a angiotensinogenu (ANGT) (Ottervald et al., 2010).

KOMENTOVANÉ PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY

PROTEOMIC ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID FOR RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS AND CLINICALLY ISOLATED SYNDROME

PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich - TAMBOR, Vojtěch - PIMKOVÁ, Kristýna - VU, Dai Long - KUČA, Kamil - ŠTOURAC, Pavel - VALIŠ, Martin. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid for relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Biomedical Reports*, 2016, 5(1), 35-40. ISSN 2049-9434.

Úvod

RS je chronické, zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému, které se vyznačuje demyelinizací a axonální ztrátou. Je nejčastější příčinou invalidity u mladých lidí. Až 50 % postižených ztratí schopnost samostatné chůze nebo práce do 15 let od stanovení diagnózy. Nevratné axonální poškození může nastat dříve, než dojde k rozvoji prvních klinických příznaků. Proto se intenzivně hledají nové markery, které umožní včasnou diagnózu a léčbu, což by vedlo ke zpomalení procesů onemocnění, které vedou k nevratnému poškození nervového systému. Proteomická analýza CSF zjistila řadu proteinů, jejichž koncentrace byla zvýšena u pacientů s RS (Stoop et al., 2010). Byly již publikovány proteomické studie představující kandidáty na biomarkery u RS (Ottervald et al., 2010), kde byly různé podskupiny RS porovnány s různými kontrolními skupinami. Tyto studie prokázaly velkou škálu potencionálních biomarkerů, pravděpodobně v důsledku různých proteomických přístupů a velkou heterogenitou RS. Většina dosud publikovaných prací se zaměřuje na majoritní část proteomu CSF - na proteiny. Bylo však prokázáno, že kromě vlastních proteinů tvoří řadu diagnosticky zajímavých molekul polypeptidové povahy také endogenní či nativní peptidy, které se nalézají v nízkomolekulárním segmentu proteomu CSF. Tyto peptidy mohou být produkovány proteázami, které jsou specificky regulovány při probíhajícím patologickém procesu. Abnormální aktivace proteáz a endogenní proteolytické aktivity byla popsána i v míšní tkáni u modelu RS (Jain et al., 2009). Dá se předpokládat, že díky kontaktu s CSF se vznikající nativní peptidy mohou uvolňovat do této tekutiny, kde pak mohou být využity jako specifické indikátory RS či jejich jednotlivých subtypů.

Cílem této studie bylo nalézt změny v nízkomolekulárním segmentu proteomu CSF a zjistit, jaké nativní peptidy a v jakém množství se nacházejí v mozkomíšni moku mezi pacienty s CIS a

RR RS oproti zdravé populaci. Takovéto polypeptidy mohou být potenciální nové diagnostické markery a mohou přispět k novým poznatkům o patogenezi onemocnění.

Metodika

Analyzovali jsme celkem 26 vzorků mozkomíšního moku (11 pacientů s CIS a RR RS a 15 vzorků zdravých kontrol). Vlastní analýza byla založena na přístupu, při němž jsou nativní peptidy separovány na kapalinovém chromatografu (LC) a analyzovány tandemovým hmotnostním spektrometrem (MS). Ke kvantitativnímu porovnání hladin analytů mezi skupinami pacientů byla využita metoda isobarického značení pro relativní kvantifikaci. Ke zpracování dat byl použit Perseus software.

Výsledy

Identifikovali jsme celkem 26 proteinů, které byly změněny oproti zdravým kontrolám. Tyto proteiny jsou adenosine deaminase CECR1, Cadherin-6, Calsyntenin-3, Chitinase-3-like protein 2, Dermcidin, Fibrillin-1, Histone H2B, Histone H4, Ig γ -1 chain C region, Ig heavy chain V-II region NEWM, Ig heavy chain V-III region BRO, Ig heavy chain V-III region GAL, Ig heavy chain V-III region WEA, Ig κ chain C region, Ig κ chain V-I region Lay, Ig κ chain V-II region TEW a Ig κ chain V-II region GM607, Ig κ chain V-III region SIE a Ig κ chain V-III region WOL, Immunoglobulin J chain, Mannan-binding lectin serine protease 1, Metalloproteinase inhibitor 1, Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8, Protocadherin-10, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase δ , Receptor-type tyrosine-protein phosphatase γ , Reticulon-4 receptor, Zinc transporter ZIP10. Devět proteinů bylo zastoupeno v nižším množství, 17 proteinů bylo zastoupeno ve větším množství.

Diskuze a závěr

Celkem tři z námi identifikovaných proteinů prokázali Kroksveen *et al.* (2012) u nemocných s RR RS. Jednalo se o Ig γ -1 chain C region, Ig heavy chain V-III region BRO a Ig κ chain C region. Tyto proteiny mají významnou roli v počáteční aktivaci komplementu. Chitinase 3-like protein 2 je považován za rizikový faktor ve vztahu

k nevratné progresi RS (Hinsinger et al., 2015). V naší práci byl prokázán signifikantní vzestup tohoto proteinu oproti zdravé populaci. Význam dalších proteinů, jejichž změnu jsme pozorovali u pacientů s RS, není doposud uspokojivě vysvětlen a bude předmětem dalšího zkoumání.

LYMPHOCYTES IN THE TREATMENT WITH INTERFERON BETA-1 B

PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich - KLÍMOVÁ, Blanka - ANDRÝS, Ctírad - VOKURKOVÁ, Doris VALÍŠ, Martin. Lymphocytes in the treatment with interferon beta-1 b. Multiple Sclerosis and Related Disorders, 2017, 18(neuvedeno), 29-32. ISSN 2211-0348.

Úvod

Jedním ze základních léků pro CIS nebo RR RS je INF β -1b. Přesný mechanismus jeho účinku není znám, jedná se o lék s protizánětlivým a imunomodulačním efektem. Tlumí aktivitu subsetu Th1 T-lymfocytů pomocí indukce tvorby IL-10. Snižuje produkce prozánětlivého cytokinu IL-17. Vede k omezení prezentace antigenu a proliferace T-lymfocytů. Snižuje prostupnost hematoencefalické bariéry zablokováním adhezních interakcí, tlumením účinku matrixových metaloproteáz a migrace leukocytů (Markowitz, 2007; Anderton et Liblau, 2008; Chen et al., 2009; Chabot et al., 1997). V této práci byly vyšetřeny jednotlivé populace lymfocytů u nemocných s RS (CIS a RR RS). Cílem bylo najít znaky, které jsou ovlivněny u nemocných léčených INF β -1b.

Metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 97 pacientů (25 mužů a 72 žen), kteří byli léčeni pro CIS nebo RR RS INF β 1-b (ve formě podkožní injekce, v dávce 250 μ g obden). Nemocným byly odebrány vzorky krve před zahájením léčby a po pěti letech léčby s cílem zjistit změny lymfocytárních populací. Jednalo se o lymfocyty, CD4+ T-lymfocyty, CD8+ T-lymfocyty, CD 19 (B lymfocyty), natural killer – NK buňky (CD3-/CD16+56+), CD3+/CD69+ buňky, CD5 buňky, CD25 buňky, CD3+/CD25+ buňky, CD5+/CD19+ buňky, CD4+/CD45RO+ buňky, CD8+/CD38+ buňky, CD 38 buňky, CD4+/CD45RA+ buňky, CD69 protein, CD40 protein, CD 40L v absolutních i relativních hodnotách a absolutní hodnotu leukocytů. K analýze definovaných znaků byla použita

průtoková cytometrie. Ke statistickému zpracování byl použit program MATLAB[®] (MathWorks, Inc., USA).

Výsledky

Signifikantní pokles byl po pěti letech na hladině významnosti 1 % zjištěn u absolutních i relativních hodnot proteinu CD69, absolutních i relativních hodnot CD8⁺ T lymfocytů, celkového počtu leukocytů a absolutních hodnot NK buněk. Signifikantní pokles na hladině významnosti 5 % byl zjištěn u absolutní hodnoty lymfocytů, relativních hodnot CD4⁺ T lymfocytů, relativních hodnot CD3⁺/CD69⁺ buněk a absolutních hodnot CD8⁺/CD38⁺ buněk.

Diskuse

Bylo zjištěno signifikantní snížení parametru CD69. CD69 je specifický antigen ovlivňující proliferaci specifických genů a moduluje imunitní odpověď (Llera et al., 2001). Inhibuje zrání Th17 T-lymfocytů, které mají pravděpodobně rozhodující roli v imunopatogenezi RS (González-Amaro et al., 2013). Obdobně jako Zafranskaya et al. (2007) jsme prokázali signifikantní pokles CD8⁺ T-lymfocytů. CD8 T-lymfocyty přítomné v lézích mají regulační funkci ve vztahu k progresi onemocnění. Zprostředkovávají supresi Th-lymfocytů prostřednictvím sekrece perforinu, který je pro Th-lymfocyty cytotoxický. Rovněž způsobují transekcí axonů a zvyšují vaskulární permeabilitu (Kasper et Shoemaker, 2010). CD3⁺/CD69⁺ představuje časně aktivované T-lymfocyty, CD69 se exprimuje na buňkách (na všech leukocytech) už 4h od působení aktivátoru, tj. ještě před vznikem nové DNA blastů (tzn. před buněčnou proliferací), ale jejich exprese klesá už po 24h. CD8⁺/CD38⁺ představují aktivované cytotoxické/supresorové T-lymfocyty, jejich zvýšená hodnota je u infekčních onemocnění a typická je vyšší hodnota u HIV pacientů. Ve sledované práci byl zaznamenán pokles CD8⁺/CD38⁺. Pokles jsme zaznamenali rovněž u NK buněk.

Závěr

Byť přesný mechanismus účinku INF β není znám, léčba INF β snižuje aktivitu RS a oddaluje konverzi do sekundárně progresivní formy. Studie prezentovala některé parametry periferní krve, které byly ovlivněny dlouhodobou léčbou INF β -1b.

LYMPHOCYTE POPULATIONS AND THEIR CHANGE DURING FIVE-YEAR GLATIRAMER ACETATE TREATMENT

PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich – SOBÍŠEK, Lukáš - KLÍMOVÁ, Blanka - ANDRÝS, Ctirad - VOKURKOVÁ, Doris – MAZUROVÁ, Radka - ŠTOURAC, Pavel - VALIŠ, Martin. Lymphocyte populations and their change during five-year glatiramer acetate treatment. *Neurologia i neurochirurgia Polska*. 2018 (In press).

Úvod

Jedním z účinných preparátů v léčbě RS je GA. Působení GA je imunomodulační. GA tlumí zánět a současně má i vlastnosti neuroprotektivní. GA způsobuje přesmyk od aktivity subsetu Th1 T-lymfocytů k aktivitě subsetu Th2 T-lymfocytů. Subset Th1 T-lymfocytů je odpovědný za rozvoj cytotoxické reakce. Th1 T-lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny interferon γ (INF γ), Tumor Necrosis Factor β (TNF β) a interleukin 2 (IL-2). Naproti tomu Th2 subset T-lymfocytů působí v antagonistickém vztahu k Th1 subsetu T-lymfocytů a produkuje protizánětlivé cytokiny IL-4 a IL-13. Pomocí antigen prezentujících buněk jako jsou monocyty a dendritické buňky mění GA funkci CD4⁺ and CD8⁺ T-lymfocytů. Váže se s vysokou afinitou na molekuly MHC (hlavní histokompatibilní komplex) II. třídy na buňkách prezentující MBP (bazický protein myelinu) a takto znemožňuje předkládání antigenních fragmentů odvozených od MBP. Tedy kompetuje s imunogenními fragmenty MBP o receptory na autoreaktivních T-lymfocytech a ty pravděpodobně anergizuje nebo způsobuje jejich apoptózu (Ziemssen et Schrempf, 2007).

Metodika

Ve studii byly analyzovány výsledky 72 pacientů (12 mužů a 60 žen), kteří byli léčeni pro CIS nebo RR RS GA (ve formě podkožní injekce, v dávce 20 mg denně). Nemocným byly odebrány vzorky krve před zahájením léčby a po pěti letech léčby s cílem zjistit změny lymfocytárních populací. Jednalo se o lymfocyty, CD4⁺ T-lymfocyty, CD8⁺ T-lymfocyty, CD 19 (B lymfocyty), natural killer – NK buňky (CD3⁻/CD16⁺56⁺), CD3⁺/CD69⁺ buňky, CD5 buňky, CD25 buňky, CD38 buňky, CD3⁺/CD25⁺ buňky, CD5⁺/CD19⁺ buňky, CD4⁺/ CD45RO⁺ buňky, CD8⁺/CD38⁺ buňky, CD4⁺/CD45RA⁺ buňky, CD69 protein, CD40 protein, CD 40L v absolutních i relativních hodnotách a absolutní hodnotu leukocytů. K analýze definovaných znaků byla použita průtoková cytometrie. Ke statistickému zpracování byl použit system R (r-project.org).

Výsledky

Po pěti letech léčby byl zjištěn signifikantní pokles absolutních i relativních hodnot buněk CD3+/CD69+, absolutních i relativních hodnot proteinu CD69, relativních hodnot buněk CD8+/CD38+ a relativních hodnot buněk CD38. Signifikantní vzestup byl zaznamenán u absolutních i relativních hodnot buněk CD5+/CD45RA+ a absolutních hodnot buněk CD5+/CD45RO+.

Diskuse

Obdobně jako u léčby INF β -1b, rovněž u dlouhodobé léčby GA jsme prokázali statisticky významné ovlivnění proteinu CD69, buněk CD8+/CD38+ a CD3+/CD69+. Navíc byl zaznamenán pokles relativních hodnot buněk CD38. Jejich funkce ovlivňuje imunitní odpověď (Malavasi et al., 2008).

CD4+/CD45RO+ patří mezi paměťové pomocné T-lymfocyty, tzn. lymfocyty, které se dostaly do kontaktu s antigenem. Tato populace se mění během věku, nejvyšší je v pozdním věku. CD4+/CD45RA+ jsou naivní pomocné T-lymfocyty, tzn. lymfocyty, které se ještě nedostaly do kontaktu s antigenem, tato populace se mění během věku, nejvyšší je v periférii novorozenců. V naší analýze byl prokázán vzestup hodnot těchto buněk. CD4+/CD45RO+ lymfocyty potlačují aktivaci genu NLRP3, který má jednu z klíčových rolí v aktivaci zánětu (Beynon et al., 2012). Prokázaný vzestup CD4+/CD45RO+ lymfocytů tak může ukazovat na jeden z mechanismů působení GA.

Závěr

GA snižuje riziko exacerbace onemocnění pomocí několika známých imunomodulačních mechanismů, přesto není jeho přesný mechanismus účinku znám. Studie prezentovala některé parametry periferní krve, které byly ovlivněny dlouhodobou léčbou GA.

SROVNÁNÍ ÚČINNOSTI SUBKUTÁNNĚ PODÁVANÉHO INTERFERONU BETA-1A 44 MG, DIMETHYL FUMARÁTU A FINGOLIMODU V REÁLNÉ KLINICKÉ PRAXI, MULTICENTRICKÁ OBSERVAČNÍ STUDIE

PAVELEK, Zbyšek – SOBÍŠEK, Lukáš – HORÁKOVÁ, Dana - VALIŠ, Martin. A comparison of efficacy of subcutaneous interferon β -1a 44 μ g, dimethyl fumarate and fingolimod in the real-life clinical practise – a multicenter observational study. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2018; 81/ 114(4): 457– 465.

Úvod

Mezi etablované léky pro RR RS patří INF β -1a 44ug, DMF a fingolimod. Cílem projektu, resp. výstupem z analýzy z registru ReMuS, bylo srovnat účinnost subkutánně podávaného INF β -1a 44 μ g, DMF a fingolimodu u pacientů s RR RS u nemocných, kterým byla zahájena tato léčba do 90 dní od počátku relapsu v reálné klinické praxi v České republice.

Metodika

Do projektu bylo zahrnuto celkem 279 pacientů s RR RS, kteří prodělali při léčbě první linie (INF β -1a 22 μ g 3 x týdně, INF β -1a 30 μ g 1x týdně, INF β -1b 250 ug obden, teriflunomid 14 mg denně, GA 20 mg denně nebo GA 40 mg 3 x týdně) jeden relaps a kterým byla léčba změněna buď na INF β -1a 44 μ g nebo na DMF či fingolimod. Sledovanými parametry byly roční počet relapsů (ARR), doba do dalšího relapsu, zastoupení pacientů bez relapsu a změna EDSS po roce léčby u jednotlivých preparátů během 1 letého období od změny léčby.

Výsledky

Po změně terapie došlo u všech tří sledovaných preparátů během roční observace k signifikantnímu zlepšení analyzovaných parametrů. Při porovnání skupiny pacientů s léčbou INF β -1a 44ug (83 pacientů) versus fingolimod nebo DMF (196 pacientů) bylo ve druhé skupině významnější zlepšení v parametru ARR a změna EDSS. Po spárování pacientů na terapii INF β -1a 44ug se skupinou léčenou DMF nebo fingolimodem v poměru 1:1 metodou propensity score

matching (83 vs 83 pacientů) zůstal signifikantní vliv na zlepšení sledovaných parametrů před a po změně terapie v obou skupinách, neprokázali jsme ale již signifikantní rozdíl efektu mezi skupinami.

Diskuze a závěr

INF β -1a 44 ug, DMF i fingolimod prokázaly svou účinnost v řadě studií, pokud došlo k jejich nasazení z důvodu nedostatečně účinné předcházející léčby (Schwid et al., 2005; Cohen et al., 2010; Fox et al., 2012). Výstupy z analýzy z registru ReMuS ukazují, že eskalace léčby na INF β -1a 44ug, DMF i fingolimod příznivě ovlivňuje parametry změnu EDSS a čas do dalšího relapsu.

SOUHRN POZNATKŮ DISERTAČNÍ PRÁCE

V disertační práci byly představeny celkem 4 originální publikace týkající se proteomiky, lymfocytární populace u RS a disability. Ve studii 1 jsme zjistili řadu proteinů, které se vyskytují v mozkomíšním moku u nemocných s RS oproti zdravé populaci. Ve studii 2 a studii 3 jsme prokázali četné parametry z periferní krve, které byly ovlivněny dlouhodobou léčbou INF β nebo GA. Ve studii 4 jsme potvrdili účinnost eskalační léčby RS (INF β -1a 44 μ g, DMF a fingolimodu) v reálné klinické praxi v ČR.

PUBLIKACE

Hlavní publikační výstupy

1. PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich - TAMBOR, Vojtěch - PIMKOVÁ, Kristýna - VU, Dai Long - KUČA, Kamil - ŠTOURAC, Pavel - VALIŠ, Martin. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid for relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. *Biomedical Reports*, 2016, 5(1), 35-40. ISSN 2049-9434.
2. PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich - KLÍMOVÁ, Blanka - ANDRÝS, Ctirad - VOKURKOVÁ, Doris VALIŠ, Martin. Lymphocytes in the treatment with interferon beta-1 b. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2017, 18(neuvedeno), 29-32. ISSN 2211-0348. (IF 3.199)
3. PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich – SOBÍŠEK, Lukáš - KLÍMOVÁ, Blanka - ANDRÝS, Ctirad - VOKURKOVÁ, Doris – MAZUROVÁ, Radka - ŠTOURAC, Pavel - VALIŠ, Martin. Lymphocyte populations and their change during five-year glatiramer acetate treatment. *Neurologia i neurochirurgia Polska*, 2018 (In press). (IF 0.817)
4. PAVELEK, Zbyšek – SOBÍŠEK, Lukáš – HORÁKOVÁ, Dana - VALIŠ, Martin. Srovnání účinnosti subkutánně podávaného interferonu beta-1a 44 µg, dimethyl fumarátu a fingolimodu v reálné klinické praxi, multicentrická observační studie. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* 2018; 81/ 114(4): 457– 465. (IF 0.508)

Publikace vztahující se k disertační práci

5. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek a kol. *Roztroušená skleróza pro praxi*. Praha: Maxdorf, 2018. 188s. ISBN 978-80-7345-573-6
6. MAREŠOVÁ, PETRA - VALIŠ, Martin - NOVOTNÝ, Michal - PAVELEK, Zbyšek – KUČA, Kamil. The Direct Costs of Multiple Sclerosis - Study in the Czech Republic. *Neurological sciences*, 2018 (In press). (IF 2.285)

Další publikace

7. PAVELEK, Zbyšek - VALIŠ, Martin. Postupná eskalační terapie u pacienta s roztroušenou sklerózou mozkomíšni - kazuistika. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2013, 76(Suppl. 1), 18-21. ISSN 1210-7859.
8. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek. Ukazatele klinické aktivity roztroušené sklerózy a jejich ovlivnění léčbou. *Neurologie pro praxi*, 2014, 15(suppl. E), 4-7. ISSN 1803-5280.
9. VALIŠ, Martin - ŠIMŮNEK, Libor - CHROBOK, Viktor - PAVELEK, Zbyšek - ČERNÝ, Michal - EHLER, Edvard - KUNC, Pavel. Poruchy polykání u neurologických onemocnění.

- Praktický lékař, 2014, 94(6), 254-258. ISSN 0032-6739.
10. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek. Základní diagnostika a léčba roztroušené sklerózy. *Medicína pro praxi*, 2015, 12(2), 77-82. ISSN 1214-8687.
 11. PAVELEK, Zbyšek - VALIŠ, Martin. Kognitivní deficit u roztroušené sklerózy mozkomíšni. *Neurologie pro praxi*, 2015, 16(6), 347-351. ISSN 1213-1814.
 12. PAVELEK, Zbyšek - VALIŠ, Martin - HOFMANN KLZO, Ludovít. Spontánní intrakraniální hypotenze - kazuistika, diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*, 2015, 16(5), 303-306. ISSN 1213-1814.
 13. PROCHÁZKA, Aleš - VYŠATA, Oldřich - VAVRYČUKOVÁ, Julie - CEJNAR, Pavel - PAVELEK, Zbyšek - LHOTSKÁ, Lenka. Registration and Analysis of Retinal Images for Diagnosis and Treatment Monitoring. In: *Proceedings of the International Workshop on Computational Intelligence for Multimedia Understanding*. Piscataway, New Jersey: IEEE Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2014. s. 1-4. ISBN 978-1-4799-7971-4.
 14. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek - MASOPUST, Jiří. Únava u roztroušené sklerózy a možnosti jejího ovlivnění. *Medicína pro praxi*, 2016, 13(2), 75-78. ISSN 1214-8687.
 15. PAVELEK, Zbyšek - KREJSEK, Jan - VALIŠ, Martin. Role T a B lymfocytů v patogenezi roztroušené sklerózy. *Neurologie pro praxi*, 2016, 17(2), 100-103. ISSN 1213-1814.
 16. PAVELEK, Zbyšek - RYŠKA, Pavel - ŽIŽKA, Jan - PLÍŠEK, Stanislav - VALIŠ, Martin. Idiopatická hypertrofická kraniální pachymeningitida - dvě kazuistiky. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2016, 79(5), 604-607. ISSN 1210-7859.
 17. PAVELEK, Zbyšek - RYŠKA, Pavel - VALIŠ, Martin. Eskalace léčby u roztroušené sklerózy. *Neurologie pro praxi*, 2016, 17(6), 407-411. ISSN 1213-1814.
 18. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek. Dimethyl fumarát - perorální lék v terapii roztroušené sklerózy mozkomíšni. *Farmakoterapie*, 2016, 12(4), 530-538. ISSN 1801-1209.
 19. PAVELEK, Zbyšek - RYŠKA, Pavel - VALIŠ, Martin. Glatiramer acetát a tři kazuistiky. *Medicína pro praxi*, 2016, 17(4), 250-253. ISSN 1214-8687.
 20. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek. Pacient s roztroušenou sklerózou v současném systému. *Medicína pro praxi*, 2017, 14(5), 253-257. ISSN 1214-8687.
 21. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek. Roztroušená skleróza - eskalace léčby a medicína založená na důkazech. In: *Neurologie pro praxi: Aktuální pohled na rozhodování o léčbě roztroušené sklerózy*. 1. vyd. Olomouc: Solen, 2017. s. 13-17. ISBN 978-80-7471-210-4. ISSN 1213-1814.
 22. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek. Alemtuzumab v léčbě roztroušené sklerózy. *Farmakoterapie*, 2017, 13(3), 398-404. ISSN 1801-1209.
 23. PAVELEK, Zbyšek - VALIŠ, Martin. Léčba pacientky s relabující-reminentní roztroušenou sklerózou natalizumabem. *Farmakoterapie*, 2017, 13(3), 386-391. ISSN 1801-1209.
 24. PAVELEK, Zbyšek - RYŠKA, Pavel - VALIŠ, Martin. Dimethyl fumarát a eskalace léčby. *Multiple Sclerosis News*, 2017, 3(2), 27-30. ISSN 2464-5389.
 25. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek. Roztroušená skleróza: dimethyl fumarát a fingolimod - od klinických studií ke klinické praxi. *Neurologie pro praxi*, 2017, 18(6), 399-402. ISSN 1213-

1814.

26. VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek. Biologická léčba v neurologii. *Acta Medicinae*, 2018, 6(1), 83-86. ISSN 1805-398X.
27. MASOPUST, Jiří - PROTOPOPOVÁ, Dita - VALIŠ, Martin - PAVELEK, Zbyšek - KLÍMOVÁ, Blanka. Treatment of behavioral and psychological symptoms of dementias with psychopharmaceuticals: a review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2018, 14(12), 1211-1220. ISSN 1178-2021.
28. MUSIL, František - POKLADNÍKOVÁ, Jitka - PAVELEK, Zbyšek - WANG, Bo - GUAN, Xin - VALIŠ, Martin. Acupuncture in migraine prophylaxis in Czech patients: an open-label randomized controlled trial. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2018, 14(12), 1221-1228. ISSN 1178-2021.
29. PAVELEK, Zbyšek. Triple rounds - specialists for treatment of multiple sclerosis met in Brno. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2018, 81(3), 365-367. ISSN 1210-7859.
30. PAVELEK, Zbyšek - BĚLOBRÁDEK, Zdeněk - VALIŠ, Martin. Dimethyl fumarát a nežádoucí polékové gastrointestinální symptomy. *Multiple Sclerosis News*, 2018, 28-32.

LITERATURA

1. Anderton, SM, Liblau RS. Regulatory T cells in the control of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 2008;21:248-54.
2. Bacon KB, Harrison JK. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J. Neuroimmunol.*, 2000; 104: 92–97.
3. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Adèr HJ, Losseff N, Valk J: Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis, *Brain*. 1997 Nov;120 (Pt 11):2059-69.
4. Beynon V, Quintana FJ, Weiner HL, Activated human CD4+CD45RO+ memory T-cells indirectly inhibit NLRP3 inflammasome activation through downregulation of P2X7R signaling. *PLoS One*. 2012;7(6):e39576. doi: 10.1371/journal.pone.0039576.
5. Brettschneider J, Czerwoniak A, Senel M, Fang L, Kassubek J, Pinkhardt E, Lauda F, Kapfer T, Jesse S, Lehmsiek V, Ludolph AC, Otto M, Tumani H. The chemokine CXCL13 is a prognostic marker in clinically isolated syndrome (CIS). *PLoS One* 2010; 5(8): e11986.
6. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 2014; 83(11): 1022–1024.
7. Calabrese M, Seppi D, Romualdi C, Rinaldi F, Alesio S, Perini P, Gallo P. Gray matter pathology in MS: a 3-year longitudinal study in a pediatric population. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012;33:1507–11, 10.3174/ajnr.A3011.
8. Chabot S, Williams G, Yong VW. Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferon-beta-1b. *J Clin Invest*. 1997 Aug 1;100(3):604-12.
9. Chen M, Chen G, Nie H, Zhang X, Niu X, Zang YC, Skinner SM, Zhang JZ, Killian JM, Hong J. Regulatory effects of IFN-beta on production of osteopontin and IL-17 by CD4+ T Cells in MS. *Eur J Immunol*. 2009 Sep;39(9):2525-36.
10. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G, Tiel-Wilck K, de Vera A, Jin J, Stites T, Wu S, Aradhye S, Kappos L; TRANSFORMS Study Group. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 402–415.
11. Comabella M, Fernandez M, Martin R, Rivera-Vallve S, Borrás E, Chiva C, Borrás E, Chiva C, Julià E, Rovira A, Cantó E, Alvarez-Cermeño JC, Villar LM, Tintoré M, Montalban X. Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133(4): 1082–1093.
12. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011 Oct; 164(4): 1079–1106.

13. Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA. Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J Clin Immunol*. 2008 Nov;28(6):697-706.
14. Cree BAC, Kappos L, Freedman MS, Cohen JA, Sprenger T, Ritter S, Tomic D, Piani Weber D. Long-term effects of fingolimod on NEDA by year of treatment. Poster presented at: 31stECTRIMS Annual Congress; October 7 - 0, 2015; Barcelona, Spain. Poster Session 1; P627.
15. de Rosbo NK, Kaye JF, Eisenstein M, Mendel I, Hoefftberger R, Lassmann H, Milo R, Ben-Nun A. The myelin-associated oligodendrocytic basic protein region MOBP15-36 encompasses the immunodominant major encephalitogenic epitope(s) for SJL/J mice and predicted epitope(s) for multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501. *J Immunol*. 2004;173:1426.
16. Di Filippo M, Anderson VM, Altmann DR, Swanton JK, Plant GT, Thompson AJ Miller DH. Brain atrophy and lesion load measures over 1 year relate to clinical status after 6 years in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;81(2):204-8. doi: 10.1136/jnnp.2009.171769.
17. Faure E. Multiple sclerosis and hepatitis B vaccination: could minute contamination of the vaccine by partial hepatitis B virus polymerase play a role through molecular mimicry? *Med Hypotheses*. 2005;65(3):509-20.
18. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT, Vigiotta V, Dawson KT; CONFIRM Study Investigators. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;367:1087–1097.
19. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*. 2009;221:7–14.
20. Giovannoni G, Tomic D, Bright JR, Havrdová E. "No evident disease activity": The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017 Aug;23(9):1179-1187. doi: 10.1177/1352458517703193.
21. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med*. 2013 Oct; 19(10): 625–632.
22. Goodin DS, Bates D: Treatment of early multiple sclerosis: the value of treatment initiation after a first clinical episode. *Mult Scler*. 2009 Oct; 15(10):1175-82.
23. Grassiot B, Desgranges B, Eustace F, Defer G. Quantification and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis: a review. *J Neurol* 2009;256:1397-1412.
24. Gudmundsdottir S, Svennerholm B, Kristensson K, Lycke E. Herpes simplex virus-enhanced production of autoantibodies against myelin basic protein in mice. *Arch Virol*. 1986;88(1-2):37-47.
25. Hauser SL. The Charcot Lecture | beating MS: a story of B cells, with twists and turns. *Mult Scler*. 2015 Jan;21(1):8-21.

26. He A, Spelman T, Jokubaitis V, Havrdova E, Horakova D, Trojano M, Lugaresi A, Izquierdo G, Grammond P, Duquette P, Girard M, Pucci E, Iuliano G, Alroughani R, Oreja-Guevara C, Fernandez-Bolaños R, Grand'Maison F, Sola P, Spitaleri D, Granella F, Terzi M, Lechner-Scott J, Van Pesch V, Hupperts R, Sánchez-Menoyo JL, Hodgkinson S, Rozsa C, Verheul F, Butzkueven H, Kalincik T; MSBase Study Group. Comparison of switch to fingolimod or interferon beta/glatiramer acetate in active multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 2015 Apr;72(4):405-13. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.4147.
27. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 9;106(23):9362-7.
28. Hirst C, Ingram G, Pearson O, Pickersgill T, Scolding N, Robertson N. Contribution of relapses to disability in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008 255: 280–287.
29. Holick FM. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1678S–1688S.
30. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A High-Density Screen for Linkage in Multiple Sclerosis. *Am J Hum Genet.* 2005 Sep; 77(3): 454–467.
31. Jain MR, Bian S, Liu T, Hu J, Elkabes S, Li H. Altered proteolytic events in experimental autoimmune encephalomyelitis discovered by iTRAQ shotgun proteomics analysis of spinal cord. *Proteome Sci.* 2009 Jul 16;7:25.
32. Kasper L, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs. the MS immune system. *Neurology.* 2010;74:S2–S8.
33. Komiyama KJ, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2006;177:566–573.
34. Krejsek J. Novinky v patogenezi roztroušené sklerózy. Co je skryto za disabilitou pacientů s RS, *Remedia*, 2014, S2-4.
35. Liebert UG, Linington C, ter Meulen V. Induction of autoimmune reactions to myelin basic protein in measles virus encephalitis in Lewis rats. *J Neuroimmunol.* 1988 Jan;17(2):103-18.
36. Llera AS, Viedma F, Sánchez-Madrid F, Tormo J. Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem.* 2001 Mar 9;276(10):7312-9.
37. Lu G, Beadnall HN, Barton J, Hardy TA, Wang C, Barnett MH. The evolution of "No Evidence of Disease Activity" in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2018 Feb;20:231-238. doi: 10.1016/j.msard.2017.12.016.
38. Lünemann JD, Kamradt T, Martin R and Münz C. Epstein-Barr Virus: Environmental Trigger of Multiple Sclerosis? *J. Virol.* July 2007 vol. 81 no. 13 6777-6784.
39. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T, Aydin S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008; 88: 841-886.

40. Markowitz CE. Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. *Neurology*. 2007 Jun 12;68(24 Suppl 4):S8-11.
41. Matesanz F, González-Pérez A, Lucas M, Sanna S, Gayán J, Urcelay E, Zara I, Pitzalis M, Cavanillas ML, Arroyo R, Zoledziewska M, Marrosu M, Fernández O, Leyva L, Alcina A, Fedetz M, Moreno-Rey C, Velasco J, Real LM, Ruiz-Peña JL, Cucca F, Ruiz A, Izquierdo G. Genome-wide association study of multiple sclerosis confirms a novel locus at 5p13.1. *PLoS One*. 2012;7(5):e36140.
42. Miller JR. The importance of early diagnosis of multiple sclerosis. *J Manag Care Pharm*. 2004 Jun;10(3 Suppl B):S4-11.
43. Ottervald J, Franzén B, Nilsson K, Andersson LI, Khademi M, Eriksson B, Kjellström S, Marko-Varga G, Végvári A, Harris RA, et al: Multiple sclerosis: identification and clinical evaluation of novel CSF biomarkers. *J Proteomics* 73: 1117-1132, 2010.
44. Paling D, Golay X, Wheeler-Kingshott C, Kapoor R, Miller D. Energy failure in multiple sclerosis and its investigation using MR techniques. *J Neurol* 2011; 258: 2113–2127.
45. Parks NE, Flanagan EP, Lucchinetti CF, Wingerchuk, DM. NEDA treatment target? No evident disease activity as an actionable outcome in practice. *J Neurol Sci*. 2017 Dec 15;383:31-34. doi: 10.1016/j.jns.2017.10.015.
46. Pohl D, Krone K, Rostasy K, Kahler E, Brunner E, Lehnert M, Wagner HJ, Gärtner J, Hanefeld F High Seroprevalence of Epstein-Barr Virus in Children with Multiple Sclerosis. *Neurology* 2006;67:2063-2065.
47. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292–302.
48. Prosperini L, Gallo V, Petsas N, Borriello G, Pozzilli C. One-year MRI scan predicts clinical response to interferon beta in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2009 Nov;16(11):1202-9.
49. Prosperini L, Mancinelli CR, De Giglio L, De Angelis F, Barletta V, Pozzilli C. Interferon beta failure predicted by EMA criteria or isolated MRI activity in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014 Apr;20(5):566-76.
50. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:119-45.
51. Río J, Rovira A, Tintoré M, Huerga E, Nos C, Tellez N, Tur C, Comabella M, Montalban X. Relationship between MRI lesion activity and response to IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2008 May;14(4):479-84.
52. Sallusto F, Impellizzieri D, Basso C, Laroni A, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B. T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev*. 2012 Jul;248(1):216-27.
53. Salzer J, Svenningsson A, Sundström P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16(3): 287–292.
54. Salzer J, Hallmans G, Nyström M, Stenlund H, Wadell G, Sundström P. Vitamin D as a protective factor in multiple sclerosis. *Neurology*. 2012 Nov 20;79(21):2140-5.

55. Scafari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice G, Muraro P, Daumer M, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*. 2010 133: 1914–1929.
56. Schwid SR, Thorpe J, Sharief M, Sandberg-Wollheim M, Rammohan K, Wendt J, Panitch H, Goodin D, Li D, Chang P, Francis G. EVIDENCE (Evidence of Interferon Dose-Response: European North American Comparative Efficacy) Study Group; University of British Columbia MS/MRI Research Group. Enhanced benefit of increasing interferon beta-1a dose and frequency in relapsing multiple sclerosis: the EVIDENCE Study. *Arch Neurol* 2005 May; 62(5): 785-92.
57. Sellebjerg F, Börnsen L, Ammitzbøll C, Nielsen JE, Vinther-Jensen T, Hjermand LE, von Essen M, Ratzner RL, Soelberg Sørensen P, Romme Christensen J. Defining active progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017 Nov;23(13):1727-1735.
58. Shirani A, Zhao Y, Karim ME, Evans C, Kingwell E, van der Kop ML, Oger J, Gustafson P, Petkau J, Tremlett H. Association between use of interferon beta and progression of disability in patients with relapsing – remitting multiple sclerosis. *JAMA* 2012; 308(3): 247–256.
59. Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC, Patnaik M, Jacobson S. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med*. 1997 Dec;3(12):1394-7.
60. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nature Immunol.*, 2001; 2(9): 762–764.
61. Stoop MP, Singh V, Dekker LJ, Titulaer MK, Stingl C, Burgers PC, Sillevs Smitt PA, Hintzen RQ and Luiders TM: Proteomics comparison of cerebrospinal fluid of relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 5: e12442, 2010.
62. Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, Téllez N, Perkal H, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008 Mar 25;70(13 Pt 2):1079-83.
63. Tremlett H, Yousefi M, Devonshire V, Rieckmann P, Zhao Y. Impact of multiple sclerosis relapses on progression diminishes with time. *Neurology*. 2009 73: 1616–1623.
64. Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol*. 1996 Jul;6(3):275-88.
65. Wucherpfennig KW and Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705.
66. Zafranskaya M, Oschmann P, Engel R, Weishaupt A, van Noort JM, Jomaa H, Eberl M. Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis. *Immunology*. 2007 121(1), 29–39.
67. Zetterberg H, Teunissen C. Fluid biomarkers for disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017 Nov;23(13):1660-1661.

68. Ziemssen T, Schrempf W. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:537-70.