

**Zakład Neuroimmunologii Klinicznej
Katedry Neurologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Alicja Kalinowska-Łyszczarz

**Wybrane czynniki neurotroficzne
w odniesieniu do sprawności funkcji poznawczych
oraz parametrów morfometrycznych mózgowia
u pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią
stwardnienia rozsianego**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Jacek Losy

Poznań 2011

Składam serdeczne podziękowania promotorowi, Panu Profesorowi Jackowi Losemu,
za pomoc i życzliwość okazywane w trakcie powstawania tej pracy
oraz kierownikowi Kliniki Neurologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu,
Panu Profesorowi Wojciechowi Kozubskiemu,
za wszelkie twórcze uwagi i rady, dzięki którym niniejsza praca uzyskała obecny kształt

SPIS TREŚCI

1.	Wykaz stosowanych skrótów	5
2.	Wstęp.....	8
2.1.	Stwardnienie rozsiane – współczesne koncepcje i kontrowersje	8
2.2.	Neurotrofiny – nomenklatura, biologia i rola w stwardnieniu rozsianym	15
2.3.	Zaburzenia funkcji poznawczych w przebiegu stwardnienia rozsianego	19
2.4.	Neuroobrazowanie w stwardnieniu rozsianym: rola badania tomografii rezonansu magnetycznego	22
3.	Cele pracy.....	25
4.	Materiał badawczy i metody	26
4.1.	Charakterystyka grupy badanej.....	26
4.2.	Protokół badania	27
4.2.1.	Badanie podmiotowe	27
4.2.2.	Ocena stanu neurologicznego.....	27
4.2.3.	Procedura laboratoryjna.....	27
4.2.4.	Ocena funkcji poznawczych przy użyciu wybranych testów neuropsychologicznych ...	31
4.2.5.	Badanie tomografii rezonansu magnetycznego mózgowia.....	36
4.2.6.	Analiza statystyczna danych.....	44
5.	Wyniki.....	45
5.1.	Statystyka opisowa grupy badanej dla zmiennych demograficznych i klinicznych	45
5.2.	Detekcja neurotrofin przy użyciu metody immunoenzymatycznej ELISA	47
5.3.	Badania neuroobrazowe.....	51
5.4.	Badania neuropsychologiczne.....	55
5.5.	Zależność między parametrami uszkodzenia OUN mierzonymi za pomocą ilościowych badań rezonansu magnetycznego a ekspresją beta-NGF i NT-3 w komórkach układu immunologicznego	64
5.5.1.	Neurotrofina 3.....	64
5.5.2.	beta-NGF	70

5.6.	Zależność między nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych u pacjentów z RRMS a ekspresją beta-NGF i NT-3 w komórkach układu immunologicznego	71
5.6.1.	Neurotrofina 3.....	71
5.6.2.	beta-NGF	71
5.7.	Zależność między nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych a parametrami uszkodzenia OUN w badaniach obrazowych.....	78
5.8.	Podsumowanie wyników	80
6.	Dyskusja	81
7.	Wnioski	92
8.	Streszczenie.....	93
9.	Summary	96
10.	Piśmiennictwo	98

1. Wykaz stosowanych skrótów

BBB (ang. blood-brain barrier) – bariera krew-mózg

BCR (ang. bicaudate ratio) – stosunek odległości między wewnętrznymi brzegami jądra ogoniastego do odległości między brzegami mózgowia mierzonymi na tym samym poziomie

BDNF (ang. brain-derived neurotrophic factor) – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego

BPF (ang. brain-parenchymal fraction) – wskaźnik objętości miąższu do objętości mózgu

BSS (ang. balanced salt solution) – zubożony roztwór soli

cc (łac. corpus callosum) – ciało modzelowate

CD (ang. cluster of differentiation) – antygen różnicowania

CIS (ang. clinically isolated syndrome) – pierwszy izolowany zespół objawów neurologicznych

DMDs (ang. disease-modifying drugs) – leki modyfikujące przebieg choroby

DTI (ang. diffusion tensor imaging) – obrazowanie metodą tensora dyfuzji

EAE (ang. experimental autoimmune encephalomyelitis) – eksperymentalne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego

EDSS (ang. expanded disability status scale) – rozszerzona skala niewydolności ruchowej

ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – test immunoenzymatyczny

ERK (ang. extracellular signal-regulated kinase) – kinaza regulowana przez sygnały pozakomórkowe

FLAIR (ang. Fluid Attenuation Inversion Recovery) – sekwencja powrotu inwersji z tłumieniem sygnału płynowego

Gd - gadolina

HLA (ang. human leukocyte antigen) – główny układ zgodności tkankowej człowieka

IFN – interferon

IQR (ang. interquartile range) – rozstęp międzykwartyłowy

JNK (ang. Jun N-terminal kinase) - kinaza N-końca białka c-jun

LIF (ang. leukaemia inhibitory factor) – czynnik hamujący białaczkę

MAG (ang. myelin associated glycoprotein) – glikoproteina związana z mieliną

MBP (ang. myelin basic protein) – białko zasadowe mieliny

MOG (ang. myelin and oligodendrocyte glycoprotein) – glikoproteina mieliny i oligodendrocytów

MPRAGE (ang. Magnetisation Prepared Rapid Acquisition Gradient Echo) – ultraszybkie echo gradientowe z przygotowaniem magnetyzacji

MRI (ang. magnetic resonance imaging) – tomografia rezonansu magnetycznego

MTR (ang. magnetization transfer ratio) – współczynnik transferu magnetyzacji

MRS (ang. magnetic resonance spectroscopy) – spektroskopia rezonansu magnetycznego

NGF (ang. nerve growth factor) – czynnik wzrostu nerwów

NMDA – N-metylo-D-asparaginian

NT - neurotrofina

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PASAT (ang. Paced Auditory Serial Addition Test) – czas rytmicznego dodawania bodźców słuchowych

PBMCs (ang. peripheral blood mononuclear cells) – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej

PI3K (ang. phosphatidylinositol 3-kinase) – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu

PLP (ang. proteolipid protein) – białko proteolipidowe mieliny

PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy

PML (ang. progressive multifocal leukoencephalopathy) – postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia

PPMS (ang. primary progressive multiple sclerosis) – postać pierwotnie postępująca stwardnienia rozsianego

PRMS (ang. progressive relapsing multiple sclerosis) – postać rzutowo-postępująca stwardnienia rozsianego

Q (ang. quartile) - kwartył

RRMS (ang. relapsing-remitting multiple sclerosis) – postać rzutowo-remisyjna stwardnienia rozsianego

RT (ang. reaction time) – czas reakcji

SD (ang. standard deviation) – odchylenie standardowe

SLE (ang. systemic lupus erythematosus) - toczeń rumieniowaty układowy

SM (łac. sclerosis multiplex) – stwardnienie rozsiane

SPMS (ang. secondary progressive multiple sclerosis) – postać wtórnie postępująca stwardnienia rozsianego

TMT (ang. trail making test) – test łączenia punktów

TNF (ang. tumor necrosis factor, TNF) – czynnik martwicy guza

TSST-1 – (ang. toxic shock syndrome toxin - 1) – toksyna wstrząsu toksycznego

Trk (ang. tropomyosin related kinase) – kinaza związana z tropomiozyną

VLA (ang. very late antigen) – antygen późnej aktywacji

VCAM-1 (ang. vascular cell adhesion protein 1) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń

WPW – wzrokowe potencjały wywołane

2. Wstęp

2.1. Stwardnienie rozsiane – współczesne koncepcje i kontrowersje

Stwardnienie rozsiane (łac. sclerosis multiplex, SM) to przewlekła, zapalna choroba ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu demielinizacyjno-zwyrodnieniowym i wciąż niejasnej etiologii (Peterson i Fujinami, 2007). Istotą choroby jest rozsianie procesu destrukcyjnego w czasie (wieloczasowość) i w przestrzeni (wielogniskowość), co klinicznie objawia się zróżnicowanymi objawami neurologicznymi. Stwardnienie rozsiane ujawnia się zwykle w trzeciej dekadzie życia, częściej u kobiet, stanowiąc jedną z podstawowych przyczyn neurologicznego inwalidztwa u osób młodych. Aktualnie wyróżnia się cztery typy przebiegu SM: rzutowo-remisyjny (ang. relapsing-remitting MS, RRMS), pierwotnie postępujący (ang. primary progressive MS, PPMS), wtórnie postępujący (ang. secondary progressive MS, SPMS) oraz rzutowo-postępujący (ang. progressive relapsing MS, PRMS). Postać RRMS jest najczęstsza (u 80% pacjentów choroba zaczyna się tym przebiegiem) i rokuje najkorzystniej (Noseworthy i wsp., 2000). Cechuje się okresowym występowaniem nowych objawów neurologicznych lub zaostrzeniem objawów już istniejących (rzuty), które zwykle ustępują w ciągu kilku tygodni samoistnie lub pod wpływem leczenia kortykosteroidami. Deficyt neurologiczny może utrzymywać się, a choroba nierzadko postępuje pomiędzy poszczególnymi rzutami. Objawy neurologiczne odzwierciedlają lokalizację zmian patologicznych w OUN, przy czym najczęściej występują: niedowład piramidowy (90%), zaburzenia czucia (85%), zaburzenia koordynacji (70%), kontroli zwieraczy (65%), ostrości widzenia (zapalenie pozagąłkowe nerwu wzrokowego, 60%), zawroty głowy (60%), a także oczopląs, diplopia, dyzartria, i tzw. zespół zmęczenia (Mc Donald i Compston, 2005). Ostatnio coraz częściej zwraca się również uwagę na deficyt poznawczy, który występuje u 45-65% pacjentów chorujących na SM (Rao i wsp., 1991). Zaburzenia poznawcze mogą pojawić się na różnych, nawet wczesnych etapach choroby, często nie korelując ze stopniem deficytu neurologicznego ani z całkowitą objętością zmian w badaniach neuroobrazowych.

Rozpoznanie choroby opiera się przede wszystkim na obserwacjach klinicznych, które pozwalają stwierdzić wielogniskowość oraz wieloczasowość procesu patologicznego. Zarówno obowiązujące do niedawna kryteria diagnostyczne według McDonalda po nowelizacji z 2005 roku (Polman i wsp., 2005), jak i zrewidowane w 2010,

a opublikowane w 2011 roku nowe rekomendacje (Polman i wsp., 2011) uwzględniają rolę badań pracownianych w rozpoznaniu SM, przede wszystkim tomografii rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI), badania płynu mózgowo-rdzeniowego, z oceną obecności prążków oligoklonalnych oraz wskaźnika IgG, a także wzrokowych potencjałów wywołanych, WPW. Jeśli u pacjenta wystąpiły dwa lub więcej rzuty o podobnej manifestacji klinicznej, do potwierdzenia diagnozy niezbędne będzie udokumentowanie rozsiania zmian w przestrzeni, co można uczynić poprzez oczekiwanie na kolejny rzut o innym obrazie klinicznym lub też przez wykazanie w badaniu MRI zmian, które spełniają kryteria rozsiania według Barkhofa i Tintore (Barkhof i wsp., 2003; Tintore i wsp., 2003) dla nowelizacji z 2005 roku lub Swantona i współpracowników dla nowelizacji z 2010 roku (Swanton i wsp., 2006; Swanton i wsp., 2007). Wystąpienie jednego rzutu z objawami z dwóch lub więcej ognisk zobowiązuje do udokumentowania rozsiania choroby w czasie: albo poprzez oczekiwanie na kolejny rzut, albo też – w przypadku kryteriów z 2005 roku – przez zobrazowanie nowych zmian w MRI w okresie powyżej 30 dni (nowe ognisko lub ogniska w sekwencji T-2 zależnej) lub 3 miesiące (ognisko wzmacniające się po podaniu kontrastu gadolinowego, Gd+, w sekwencji T1-zależnej). Według rekomendacji z 2010 roku rozsianie w czasie można udokumentować poprzez zobrazowanie co najmniej jednego nowego ogniska w sekwencji T2-zależnej i/lub ogniska wzmacniającego się po podaniu kontrastu w dowolnym czasie względem wyjściowego badania obrazowego, lub też przez wykazanie współistnienia niemych klinicznie zmian wzmacniających się i niewzmacniających się po podaniu kontrastu gadolinowego. Szczególne znaczenie ma identyfikacja pierwszego izolowanego zespołu objawów neurologicznych (ang. clinically isolated syndrome, CIS), który często stanowi pierwszy rzut choroby. Adekwatnie przeprowadzona diagnostyka umożliwia wczesne rozpoznanie, a tym samym wczesne leczenie SM.

Stopień nasilenia objawów, dynamika rozwoju oraz odpowiedź na leczenie mogą różnić się istotnie u poszczególnych pacjentów, także w obrębie tego samego typu przebiegu choroby. SM wykazuje heterogenność zarówno pod względem klinicznym, jak i genetycznym, radiologicznym oraz immunopatologicznym, co sprawia, że coraz częściej sugeruje się, iż stwardnienie rozsiane jest *de facto* zespołem, a nie jednostką nozologiczną (Cook, 2006), na co wciąż jednak brak wystarczających dowodów. Istnieje wiele koncepcji próbujących wyjaśnić przyczynę owego zróżnicowania. Jedna z nich, często ostatnio dyskutowana na forum międzynarodowym, zakłada możliwość, że SM

to schorzenie pierwotnie zwyrodnieniowe. Degeneracja w obrębie oligodendrogleju i/lub mieliny miałyby prowadzić do uwolnienia autoantygenów, wywołujących wtórną w istocie reakcję immunologiczną, której przebieg zależy w dużej mierze od indywidualnych właściwości układu immunologicznego dotkniętego organizmu (Barnett i Prineas, 2004; Stys, 2010), w tym od zdolności wdrożenia adekwatnego procesu regeneracji.

Histopatologicznie choroba charakteryzuje się występowaniem mnogich ognisk zapalnych (plak), rozsianych w OUN, w obrębie których stwierdza się cechy demielinizacji, astroglizy i okołonaczyniowego nacieku komórek zapalnych układu immunologicznego, a także uszkodzenie aksonalne oraz utratę neuronów (Compston i wsp., 2006). Początkowo SM postrzegano jako chorobę pierwotnie zapalno-demielinizacyjną, niemniej doniesienia naukowe ostatnich lat skierowały uwagę na niezwykle istotną rolę aksonopatii oraz procesów zwyrodnieniowych już od początkowych stadiów rozwoju choroby (Bjartmar i wsp., 2003). Podczas gdy całkowita objętość zmian demielinizacyjnych w obrębie OUN, mierzona za pomocą MRI, słabo koreluje z obrazem klinicznym choroby, pomiar atrofii mózgowia i rdzenia kręgowego, który odzwierciedla stopień utraty aksonów, stanowi istotny wskaźnik rokowniczy w zakresie postępu niesprawności pacjentów (Bjartmar i wsp., 2000; Fisher i wsp., 2002). Pacjenci chorujący na SM tracą od 0.6 do 1% objętości mózgu rocznie, co stanowi o istotnie szybszym tempie atrofii (zaniku) w porównaniu z normalnym procesem starzenia u zdrowej populacji, wahającym się w granicach od 0.1 do 0.3% rocznego spadku całkowitej objętości mózgowia (Ge i wsp., 2000; Comi i wsp., 2001; Rovaris i wsp., 2001; Hardmeier i wsp., 2003). Progresa atrofii nie zależy od typu przebiegu choroby, ani też od całkowitej objętości zmian demielinizacyjnych (Kalkers i wsp., 2002).

Według aktualnie przyjętej hipotezy aktywowane na obwodzie, autoreaktywne limfocyty T przechodzą przez barierę krew-mózg do OUN, gdzie ulegają ponownej aktywacji przez komórki prezentujące antygen i dają początek kaskadowej reakcji zapalnej, z udziałem między innymi makrofagów, limfocytów B i immunoglobulin, cytokin prozapalnych oraz cząsteczek adhezyjnych, prowadzącej do uszkodzenia układu nerwowego (Wekerle i Lassman, 2006). Istotną wadą tej hipotezy jest brak identyfikacji czynnika sprawczego, odpowiedzialnego za pierwotną aktywację limfocytów T na obwodzie. Spekuluje się, że zjawisko mimikry molekularnej, oparte na podobieństwie antygenowym czynnika infekcyjnego i własnych tkanek (antygenów mieliny), może być

przyczyną autoimmunizacji w stwardnieniu rozsianym. U pacjentów chorych na SM stwierdza się zwiększoną liczbę limfocytów autoreaktywnych względem antygenów mieliny (Sospedra i Martin, 2005), takich jak MBP (ang. myelin basic protein, białko zasadowe mieliny), PLP (ang. proteolipid protein, białko proteolipidowe mieliny), oraz MOG (ang. myelin and oligodendrocyte glycoprotein, glikoproteina mieliny i oligodendrocytów) i MAG (ang. myelin associated glycoprotein, glikoproteina związana z mielina). Do czynników zakaźnych, które mogą wywoływać reakcję krzyżową z limfocytami rozpoznającymi antygeny mielinowe, należą wirusy (m.in. EBV, HHV-6, SFV E2, HTLV-1, TMEV, wirus grypy, Papilloma; Tejada-Simon i wsp., 2003) oraz bakterie (*Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*). Ponadto czynniki infekcyjne mogą stymulować nieadekwatną reakcję immunologiczną poprzez superantygeny bakteryjne, m.in. takie jak enterotoksyna gronkowcowa i toksyna wstrząsu toksycznego, TSST-1 (Zhang i wsp., 1995).

Kluczowym argumentem przemawiającym za ogólnie przyjętą koncepcją pierwotnego autoimmunologicznego zapalenia jest immunopatologiczny obraz zmian demielinizacyjnych w OUN. Makroskopowo plaka ma nieregularny, owalny kształt, jest twarda, odpowiada obszarom odbarwienia mieliny, a jej wielkość waha się w granicach od kilku milimetrów do kilku centymetrów. Już na początku XIX wieku obserwacje te poczynili niezależnie Robert Carswell i Leon Jean Baptiste Cruveilhier, którzy jako pierwsi wykonali badanie patologiczne w chorobie nazwanej później (1868) przez Jean Martina Charcota „sclerose en plaques”, odpowiadającej dzisiejszemu stwardnieniu rozsianemu. Plaki zlokalizowane są zwykle wokół drobnych naczyń żylnych, gdzie stwierdza się obszerny naciek komórek zapalnych. Aktywne zmiany zapalne w SM odpowiadają naciekom limfocytów T i makrofagów obserwowanym w modelu zwierzęcym stwardnienia rozsianego, w eksperymentalnym zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego (ang. experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), którego autoimmunologiczna patogenezą jest udowodniona i pewna (Wekerle i Lassman, 2006). EAE stanowi niewątpliwie użyteczny, choć nie w pełni adekwatny, model ludzkiego SM, wykorzystywany w celu wyjaśnienia immunopatogenetycznych mechanizmów prowadzących do rozwoju choroby, oraz służący projektowaniu i testowaniu nowych sposobów terapii. Przykładem skutecznego przełożenia efektywności leku w EAE na warunki kliniczne ludzkiego SM jest terapia z użyciem octanu glatirameru, mitoksantronu oraz fingolimodu (Steinman i Zamvil, 2006). Modele zwierzęce są

przydatne, ale niedoskonałe, chociażby z uwagi na fakt, iż wykorzystywane w nich zwierzęta są organizmami niedojrzałymi immunologicznie i homogenymi genetycznie ('t Hart i wsp., 2011). Układ odpornościowy szczepów doświadczalnych (myszy i szczury) nie ulega ekspozycji na czynniki środowiskowe, w tym mikroby, z którymi kontakt wpływa na ludzki układ immunologiczny. Ponadto, w EAE zasadniczym mechanizmem autoimmunologicznym jest odpowiedź zależna od limfocytów T CD4+, natomiast w plakach w ludzkim SM licznie występują także limfocyty T CD8+. Wreszcie, EAE jest indukowane konkretnym czynnikiem spustowym, poprzez iniekcję autoantygenu związanego z adiuwantem bakteryjnym, podczas gdy u ludzi SM pojawia się spontanicznie – choć dotychczas nie udało się jednoznacznie wykluczyć możliwości istnienia czynnika spustowego. To wszystko sprawia, że modele doświadczalne, choć użyteczne, dają ograniczony wgląd w immunopatologię SM.

Na podstawie szeregu badań populacyjnych stwierdzono, że czynniki genetyczne odgrywają rolę w rozwoju stwardnienia rozsianego. U blisko 20% pacjentów z SM stwierdza się występowanie choroby u członka rodziny. U krewnych pierwszego stopnia ryzyko zachorowania jest 10- do 20-krotnie większe w stosunku do ryzyka populacyjnego, a u krewnych drugiego stopnia wzrasta ono trzykrotnie względem populacji ogólnej (Sadovnick i wsp., 2001). Zidentyfikowano szereg genów związanych z podatnością na SM, z czego większość koduje białka pełniące funkcję w układzie immunologicznym. Fakt ów podkreślany jest przez zwolenników koncepcji pierwotnego zapalenia w patogenezie SM. Należy jednak podkreślić, iż dotychczas opisane asocjacje odpowiadają za jedynie 2-3% podatności genetycznej na SM, a dziedziczenie jest najprawdopodobniej wielogenowe. Do najważniejszych należy związek pomiędzy występowaniem SM a genami układu HLA klasy II, w szczególności obecnością allelu HLADRB1*15:01 (Sospedra i Martin, 2005). Obok czynników genetycznych coraz częściej wymienia się czynniki środowiskowe, których udział miałby warunkować rozwój choroby, takie jak nikotynizm (Hedström i wsp., 2009), czy niedobór witaminy D (Sundquist i wsp., 2010).

Mimo że dotychczasowe badania nad patogenezą stwardnienia rozsianego nie dostarczają bezpośrednich dowodów na autoimmunologiczne tło SM, rola układu immunologicznego w rozwoju choroby nie ulega wątpliwości. Przez wiele lat uważano, że układ nerwowy jest obszarem immunologicznie uprzywilejowanym (ang. immunoprivileged) z uwagi na, między innymi, obecność bariery krew-mózg (ang. blood-brain barrier, BBB), niską

liczbę limfocytów T oraz ograniczoną ekspresję antygenów zgodności tkankowej klasy II w obrębie OUN. Dziś jednak wiadomo, że system nerwowy i immunologiczny łączą złożone i dynamiczne interakcje. W warunkach fizjologicznych potencjalnie autoreaktywne limfocyty T pełnią funkcję integracyjno-ochronną. Ziv i wsp. (2006) wykazali, że interakcje autoreaktywnych komórek T w OUN i lokalnego mikrogleju przyczyniają się do procesów neuroplastyczności w dorosłym mózgu szczura, poprzez stymulację neurogenezy w zakręcie zębatym hipokampa. Z drugiej strony, wykazano również, że komórki dendrytyczne migrują z OUN do obwodowych narządów limfatycznych, gdzie mogą prezentować antygen limfocytom T (Karman i wsp., 2004). Aktywowane limfocyty T mają zdolność przechodzenia przez barierę krew-mózg, infiltracji OUN, proliferacji w odpowiedzi na powtórny stymulację określonym antygenem, a następnie aktywacji mikrogleju i innych komórek immunologicznych za pośrednictwem uwalnianych cytokin prozapalnych, co prowadzi do uszkodzenia demielinizacyjno-aksonalnego (Yong i Marks, 2010). Nie wszystkie limfocyty T pełnią rolę destrukcyjną. Komórki typu CD4⁺ Th2 wydzielają cytokiny o profilu przeciwwzapalnym, a komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wytwarzają czynniki neurotroficzne, które biorą udział w procesach regeneracji i przetrwania neuronów podczas rozwoju oraz w dojrzałym układzie nerwowym. Janusowe oblicze odpowiedzi autoimmunologicznej objawia się w patologii związanej z omawianą chorobą szczególnie wyraźnie, kiedy to reakcja zapalna w obrębie OUN może odgrywać zarówno rolę destrukcyjną, poprzez kaskadę uwalnianych cytokin, wolnych rodników tlenowych, białek układu dopełniacza, proteaz i przeciwciał; jak i protekcyjno-regeneracyjną. Ta ostatnia, która obejmuje między innymi produkcję czynników neurotroficznych przez komórki układu immunologicznego, jest niewątpliwie mniej poznana. Dokładne określenie sposobu i warunków, w których potencjalnie destrukcyjne komórki zapalne sprzyjają naprawie w obrębie OUN, wydaje się kluczem do kolejnego etapu badań nad nowymi możliwościami terapeutycznymi w SM.

Terapia stwardnienia rozsianego opiera się obecnie na mechanizmie immunomodulacji, co odzwierciedla panującą koncepcję choroby pierwotnie zapalnej. W 1993 roku zarejestrowano w leczeniu postaci rzutowo-remisyjnej choroby interferon beta 1B (IFN- β 1B), następnie wprowadzono interferon beta 1A (IFN- β 1A) i octan glatirameru (kopolimer-1), a także cytostatyk mitoksantron dla RRMS o agresywnym przebiegu oraz

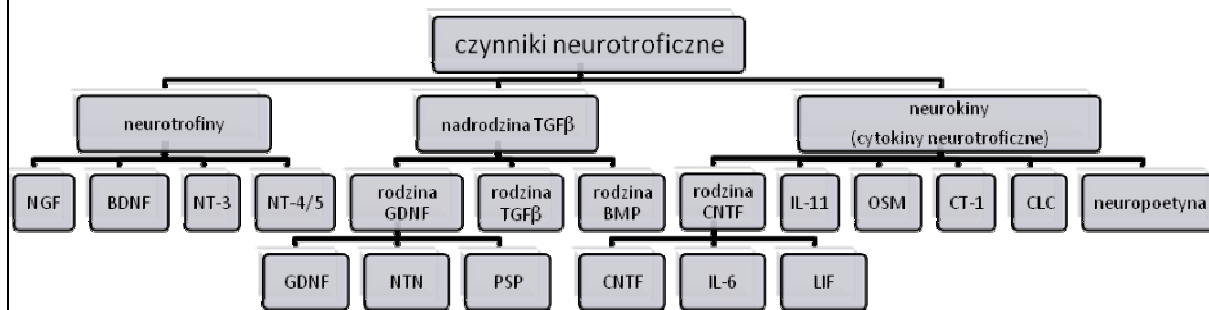
postaci postępujących. Mechanizm działania terapeutycznego tych leków w SM jest zróżnicowany i nie do końca sprecyzowany, niemniej opiera się na niespecyficznym hamowaniu odpowiedzi zapalnej. Kolejną generację leków modyfikujących przebieg choroby (ang. disease-modifying drugs, DMDs) stanowią przeciwciała monoklonalne, spośród których preparatem zarejestrowanym na rynku jest natalizumab. Blokuje on receptor limfocytarnej $\alpha 4\beta 1$ -integryny (VLA-4), zapobiegając jej związaniu z cząsteczką adhezji komórkowej naczyń (ang. vascular cell adhesion protein 1, VCAM-1), zlokalizowaną na śródbłonku naczyń mózgowych, a tym samym uniemożliwiając przechodzenie limfocytów przez barierę krew-mózg (Noseworthy i wsp., 2006). Natalizumab wykazuje większą skuteczność w redukcji częstości rzutów niż pozostałe zarejestrowane leki immunomodulujące (redukcja rzędu 60% wobec 30% dla interferonów i octanu glatirameru, Polman i wsp., 2006), jednakże wzbudza kontrowersje z uwagi na groźne powikłanie, które opisywano w związku z jego zastosowaniem. Wystąpienie przypadków postępującej wieloogniskowej leukoencefalopatii (PML), związanej z infekcją oportunistyczną wirusem JC, stało się przyczyną czasowego wycofania preparatu z rynku. Wszystkie wyżej wymienione leki wymagają podawania pozajelitowego. Niezwykle obiecujące są doustne leki modyfikujące przebieg choroby, takie jak niedawno zarejestrowany w leczeniu RRMS fingolimod oraz testowane w III fazie badań klinicznych: kladrybina, teriflunomid, doustne pochodne kwasu fumarowego i laquinimod. Preparaty te są wygodne w użyciu, a ich skuteczność w dotychczasowych badaniach niejednokrotnie przewyższa tradycyjne terapie immunomodulujące (Losy i Kalinowska-Łyszczarz, 2011). W leczeniu rzutów postaci RRMS stosuje się zazwyczaj dożylnie steroidy. W wybranych przypadkach wdraża się terapię z użyciem dożylnych immunoglobulin ludzkich lub zabiegów plazmaferezy, których skuteczność w leczeniu rzutów nie została jednak udowodniona (Sørensen i wsp., 2004). Niestety, mimo postępu w zakresie terapii choroby, w wielu przypadkach nadal konieczne jest leczenie objawowe utrzymujących się dysfunkcji klinicznych. Leczenie immunomodulujące pozwala istotnie zmniejszyć częstość rzutów oraz zredukować radiologiczne wykładniki aktywności procesu zapalnego, ale w praktyce jego długofalowy wpływ na postęp niesprawności pacjentów, która zależy od postępującej aksonopatii, jest ograniczony i niewystarczający. Podstawowym wyzwaniem pozostaje więc wprowadzenie strategii regeneracyjnych, sprzyjających szybkiej i skutecznej remielinizacji, co pozwoli zapobiec degeneracji aksonalnej (Warrington i Rodriguez, 2006).

2.2. Neurotrofiny – nomenklatura, biologia i rola w stwardnieniu rozsianym

Neurotrofiny to polipeptydy wydzielniczne, zbudowane ze 100-200 aminokwasów, które należą do rodziny czynników neurotroficznycch (jej tradycyjną klasyfikację przedstawia rycina nr 1). Deprywacja czynników neurotroficznycch stanowi fizjologiczny mechanizm eliminacji neuronów podczas rozwoju układu nerwowego (Connor i Dragunow, 2009). W dorosłym OUN czynniki neurotroficzne pełnią funkcje protekcyjne wobec określonych populacji neuronalnych, a także odgrywają rolę w procesach plastyczności i transmisji synaptycznej (Altman, 1992; Johnson i wsp., 1989; Thoenen, 2000; Raff i wsp., 2002).

Rycina 1

Ogólna klasyfikacja czynników neurotroficznycch



NGF – czynnik wzrostu nerwów, BDNF – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego, NT-3 – neurotrofina 3, NT-4/5 – neurotrofina 4/5, TGFβ – transformujący czynnik wzrostu β, GDNF (ang. glial-derived neurotrophic factor) – czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego, BMP (ang. bone morphogenic proteins) – białka morfogenetyczne kości, NTN – neururyna, PSP – persefina, CNTF (ang. ciliary neurotrophic factor) – rzęskowy czynnik neurotroficzny, IL-6 – interleukina 6, LIF (ang. leukemia inhibitory factor) – czynnik hamujący białaczkę, IL-11 – interleukina 11, OSM – onkostatyna M, CT-1 – kardiotrofina-1, CLC (ang. cardiotrophin-like cytokine) – cytokina podobna do kardiotrofiny

Jako pierwszy z rodziny neurotrofin został zidentyfikowany czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor, NGF, Levimontalcini, 1952). Do grupy tej zalicza się również czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF), neurotrofinę 3 (ang. neurotrophin-3, NT-3) oraz neurotrofinę 4/5 (ang. neurotrophin-4/5, NT-4/5), znaną również jako neurotrofina 4 lub neurotrofina 5 (ang. neurotrophin-4, NT-4; neurotrophin-5, NT-5), a także neurotrofinę 6 i neurotrofinę 7 (ang. neurotrophin-6, NT-6; neurotrophin-7, NT-7), z czego dwie ostatnie nie zostały dotąd opisane u ssaków (Huang i Reichardt, 2001). Wszystkie neurotrofiny są syntetyzowane jako białka prekursorowe, które pod wpływem działania metaloproteinaz uzyskują aktywność biologiczną (Lee i wsp., 2001). Funkcjonują one jako niekowalentnie związane homodimery, niemniej podjednostki różnych neurotrofin mogą również tworzyć heterodimery. Na podstawie badań sekwencji genowych oraz obserwacji, że zamiana siedmiu aminokwasów w strategicznych pozycjach NT-3 skutkuje powstaniem białka o pełnej aktywności biologicznej NT-3, BDNF oraz NGF (Urfer i wsp., 1994), wysnuto wniosek, że *NT-3* stanowi pierwotny gen-przodek (ang. ancestor gene), od którego wywodzą się pozostałe neurotrofiny. Aktualnie przyjmuje się jednak, że NGF i NT-3 powstały poprzez duplikację jednego, wspólnego genu, natomiast BDNF i NT-4/5 pochodzą od innego wspólnego przodka (Halböök, 1999).

Neurotrofiny wiążą się z wysokim powinowactwem z receptorami z rodziny kinazy związanej z tropomiozyną (ang. tropomyosin related kinase, Trk), a z niskim powinowactwem – z receptorami typu $p75^{\text{NTR}}$ (Kaplan i Miller, 2000), które należą do rodziny czynnika martwicy guza (ang. tumor necrosis factor, TNF, Chao, 1997). NGF wiąże się preferencyjnie z receptorem TrkA; BDNF i NT-4 mają najwyższe powinowactwo względem TrkB, a NT-3 – względem TrkC, choć wiąże się także z TrkA i TrkB (Chao, 2003). Wszystkie neurotrofiny wykazują powinowactwo wobec receptora $p75^{\text{NTR}}$, który może pełnić funkcję ko-receptora dla receptorów Trk, albo też indukować niezależną ścieżkę sygnałową. Związanie neurotrofin z odpowiednim receptorem Trk prowadzi do jego dimeryzacji, trans-autofosforylacji, a następnie aktywacji wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, m.in. Ras/ERK (ang. extracellular signal-regulated kinase) i Akt/PI3K (ang. phosphatidylinositol 3-kinase), których indukcja promuje przetrwanie (Huang i Reichardt, 2001; Kaplan i Miller, 2000). Z kolei pobudzenie receptora $p75^{\text{NTR}}$ może prowadzić zarówno do przetrwania (NF- κ B), jak i do śmierci komórki (Rac1/Jun N-terminal kinase, JNK), (Harrington i wsp., 2002;

Khursigara i wsp., 2001). Biologiczne efekty działania neurotrofin zależą od ich stężeń, powinowactwa do receptorów, a także od tego, czy wiążą się one z receptorami jako cząsteczki już poddane obróbce enzymatycznej, czy też w formie prekursorowej (proneurotrofiny, które wykazują silniejsze powinowactwo do receptorów p75^{NTR} i są bardziej skuteczne w indukowaniu p75-zależnej apoptozy, Beattie, 2002; Lee i wsp., 2001). Ponadto, neurotrofiny mogą odgrywać zróżnicowane role poprzez współdziałanie z innymi receptorami oraz kanałami jonowymi. Opisano interakcje między receptorami Trk i kanałami potasowymi bramkowanymi napięciem, a także receptorami NMDA (N-metylo-D-asparaginian) (Lin i wsp., 1998, Tucker i Fadool, 2002). P75^{NTR} może natomiast pełnić funkcję ko-receptora dla receptora Nogo, który poprzez związanie z białkiem MAG hamuje wzrost aksonów (Wong i wsp., 2002; Wang i wsp., 2002).

Mimo że pierwotną funkcją czynników neurotroficznych jest nadzór nad procesami różnicowania i przetrwania komórek w układzie nerwowym, ulegają one ekspresji także w układzie immunologicznym, we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. NT-3 wytwarzana jest przez limfocyty T i B, a nie stwierdzono jej w makrofagach (Linker i wsp., 2009). Beta-NGF i NT-4/5 produkowane są przez praktycznie wszystkie komórki układu immunologicznego. Ponadto, na komórkach tych znajdują się receptory dla neurotrofin: p75^{NTR} oraz TrkA (limfocyty T, makrofagi), TrkB (limfocyty B, makrofagi), i TrkC (makrofagi), (Reichard, 2006; Vega i wsp., 2003; Linker i wsp., 2009). W zdrowym mózgu to neurony stanowią główne źródło i punkt uchwytu dla czynników neurotroficznych, natomiast w warunkach patologicznych dodatkowa ich synteza przez mononukleary może kompensować względny niedobór w OUN (Hohlfeld, 2008; Kerschensteiner i wsp., 2003).

W przebiegu SM neurotrofiny wytwarzane przez PBMCs mogą odgrywać rolę neuroprotekcijną bezpośrednio, wiążąc się z receptorami Trk na neuronach w OUN i promując ich przetrwanie, jak i pośrednio – poprzez interakcje z receptorami dla neurotrofin na poszczególnych subpopulacjach komórek układu immunologicznego (Tabakman i wsp., 2004; Chao, 2003; Linker i wsp., 2007). Funkcje neuroprotekcyjne komórek immunologicznych mogą być więc regulowane przez lokalną sekrecję czynników neurotroficznych.

W SM najwyższe stężenia neurotrofin obserwuje się w obrębie aktywnego brzegu plaki,

gdzie uwalniane są one w bezpośrednim sąsiedztwie aksonów narażonych na uszkodzenie wtórne. Aksony te nie znajdują się w obrębie samej plaki, ale z uwagi na bliskość toczącej się reakcji zapalnej mogą ulec destrukcji w tzw. mechanizmie świadka (ang. bystander damage). Obszar ten, podobnie jak w przypadku strefy penumbry w udarze mózgu, może odnieść największe korzyści dzięki zjawisku neuroprotekcji (Hohlfeld, 2008, Kerschensteiner i wsp., 2003). Niewydolność układu immunologicznego w dostarczaniu adekwatnej puli neurotrofin może skutkować ograniczeniem potencjału neuroprotekcijnego w ratowanym obszarze. To z kolei prowadzi do bardziej rozległego uszkodzenia, a więc i większej atrofii, która jest głównym czynnikiem wpływającym na sprawność pacjenta w kontekście długofalowym.

Przełomowym odkryciem, które skierowało uwagę na potencjalne możliwości związane z zastosowaniem czynników neurotroficznycy w terapii SM, była obserwacja, że należący do tej rodziny czynnik hamujący białaczkę (ang. leukaemia inhibitory factor, LIF) redukuje nasilenie objawów klinicznych EAE u myszy i sprzyja przetrwaniu oligodendrocytów (Butzkueven i wsp., 2002). Efekt ów pojawiał się niezależnie od tego, czy LIF podano systemowo w momencie immunizacji, czy też w klinicznie jawnym okresie choroby, co potwierdza hipotezę, że czynniki neurotroficzne działają poprzez sprzyjanie regeneracji, a nie – hamując reakcję zapalną. W kontekście powyższych obserwacji rozpoczęły się badania nad rolą neurotrofin w stwardnieniu rozsianym i w eksperymentalnie wywołanym modelu choroby u zwierząt.

W dotychczasowych badaniach wykazano związek sekrecji BDNF przez PBMCs i potencjału aksonoprotekcijnego u pacjentów chorujących na SM (Azoulay i wsp., 2008; Weinstock-Guttman i wsp., 2007; Linker i wsp., 2010). Udowodniono również, że aż trzy z dostępnych leków immunomodulujących (IFN- β , octan glatirameru oraz alemtuzumab) zwiększają poziom BDNF (surowica, frakcja mononuklearów) u pacjentów poddanych terapii, co może stanowić jeden z mechanizmów działania tych preparatów w SM (Lalive i wsp., 2008; Azoulay i wsp., 2005; Jones i wsp., 2010). Rola pozostałych neurotrofin w stwardnieniu rozsianym nadal pozostaje niejasna, a w literaturze obecnych jest zaledwie kilka doniesień na ten temat (Caggiula i wsp., 2005; Urshansky i wsp., 2010).

Zagadnienie neurotrofin w SM można również rozpatrywać w kontekście zaburzeń funkcji poznawczych pojawiających się w przebiegu choroby (patrz: rozdział 2.3). Także w tym aspekcie znaczenie neurotrofin może okazać się istotne. Wiadomo, że neurotrofiny

odgrywają rolę w plastyczności synaptycznej, która w dorosłym mózgu oznacza funkcjonalne modyfikacje istniejących już połączeń synaptycznych. Proces ów leży u podstawy zjawiska kodowania, magazynowania, odtwarzania i przetwarzania informacji, co warunkuje pamięć i inne funkcje poznawcze. BDNF, NGF, NT-3, a także ich receptory TrkB i TrkC ulegają ekspresji na relatywnie wysokim poziomie w dorosłym hipokampie (Lewin i Barde, 1996). Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że nawet niewielka redukcja poziomu BDNF może prowadzić do redukcji plastyczności synaptycznej w obrębie hipokampa (Korte i wsp., 1995). Mysie heterozygoty o fenotypie $NGF^{+/-}$ prezentują ograniczone unerwienie cholinergiczne hipokampa, co skutkuje deficytami w zakresie zapamiętywania informacji i ich przechowywania (Chen i wsp., 1997). W dorosłym mózgu NGF sprzyja przetrwaniu neuronów kompleksu cholinergicznego przodomózgowia podstawnego (Lewin i Barde, 1996). U mysiej homozygoty $NT-4/5^{-/-}$ obserwuje się deficyty w zakresie pamięci długoterminowej, ale nie – operacyjnej (Xie i wsp., 2000). Z kolei u szczurów z eksperymentalnie uszkodzonym rejonem CA1 hipokampa egzogenne podanie NT-3 na nośniku chitozanowym skutkuje poprawą w zakresie sprawności funkcji poznawczych ocenianych w teście labiryntu wodnego Morrisa (Mo i wsp., 2010). Dotychczas przeprowadzono zaledwie kilka badań na temat potencjalnego związku czynników neurotroficznycch z funkcjami poznawczymi u pacjentów chorujących na SM. W 2010 roku Patanella i wsp. opisali zależność między niższymi poziomami BDNF wytwarzanego przez PBMCs a gorszymi wynikami testów neuropsychologicznych u pacjentów z SM, w szczególności oceniających podzielność uwagi i umiejętności przeszukiwania wzrokowo-przestrzennego. Na początku 2011 roku opublikowano artykuł, którego autorzy wykazali ochronną funkcję allelu C rs2030324 BDNF w kontekście umiejętności przetwarzania informacji wzrokowych, co wiąże się prawdopodobnie z wpływem na objętość wzgórza (Weinstock-Guttman i wsp., 2011). Dotychczas nie ustalono związku pozostałych neurotrofin ze sprawnością funkcji poznawczych u pacjentów z SM.

2.3. Zaburzenia funkcji poznawczych w przebiegu stwardnienia rozsianego

Zaburzenia poznawcze pojawiają się w przebiegu SM u 45 do 65% pacjentów (Rao i wsp., 1991; Ron i wsp., 1991), niezależnie od rodzaju przebiegu, czasu trwania choroby, stopnia niesprawności neurologicznej oraz całkowitej objętości zmian demielinizacyjnych w badaniach neuroobrazowych. Już Charcot (1872) stwierdził, że pamięć i afekt u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym mogą być istotnie zaburzone. Późniejsi badacze

próbowali nawet określić swoisty dla SM typ zespołu otępiennego, z euforią i labilnością emocjonalną, przy stosunkowo niewielkim deficycie poznawczym, który Seiffer (1905) nazwał „dementia polysclerotica” (w oryginale niemieckim „polysklerotische Demenz”). Z kolei w 1929 Ombredane trafnie zaobserwował, że deficyt poznawczy u chorych na SM istnieje, ale jest na tyle dyskretny i wybiórczy, iż może pozostać niezauważony przy pobieżnym badaniu i/lub w codziennej rozmowie. Pomimo to przez wiele lat nie wiązano zaburzeń psychopatologicznych w SM ze zmianami patologicznymi w układzie nerwowym wynikającymi z choroby podstawowej. W połowie XX wieku Pratt przedstawił pierwszy usystematyzowany przegląd zaburzeń psychiatryczno-poznawczych u pacjentów z SM (Pratt, 1951).

Do funkcji, które najczęściej ulegają uszkodzeniu w przebiegu stwardnienia rozsianego, należą: uwaga, szczególnie przedłużona i selektywna, umiejętność analizy wzrokowo-przestrzennej, myślenie abstrakcyjne, zdolność wykonywania złożonych zadań (ang. multi-tasking), pamięć operacyjna i semantyczna oraz szybkość przetwarzania informacji (Rao i wsp., 1991; Kujala i wsp., 1996). Funkcje językowe oraz tzw. inteligencja ogólna, rozumiana jako czynnik ogólny Spearmana (ang. g factor, Howard, 1993), pozostają zwykle nienaruszone. Obraz ów odpowiada otępieniu typu podkorowego, powstałemu na skutek swego rodzaju „rozłączenia” (ang. disconnection) struktur korowych i podkorowych w wyniku uszkodzenia istoty białej (Piras i wsp., 2007). Mimo iż klinicznie jawny zespół dementywny jest u pacjentów z SM rzadki, deficyt poznawczy może występować już podczas pierwszego rzutu choroby, zazwyczaj bardzo powoli postępując. U niektórych pacjentów zaburzenia poznawcze i/lub zaburzenia zachowania mogą natomiast stanowić pierwsze objawy choroby; jest to tzw. wariant korowy SM (Zarei i wsp., 2003).

W ciągu ostatnich lat próbowano uzyskać wgląd w mechanizm zaburzeń poznawczych u chorych z SM poprzez badania neuroobrazowe z zastosowaniem metod rezonansu magnetycznego. Niestety, korelacje między nasileniem deficytu a rutynowymi parametrami radiologicznymi określanymi za pomocą MRI (całkowita liczba i objętość zmian hiperintensywnych w sekwencji T2-zależnej, całkowita objętość widocznych w sekwencji T1-zależnej ognisk nieodwracalnego uszkodzenia aksonalnego, tzw. „czarnych dziur”, objętość istoty szarej) są słabe i bardzo zmienne. Wynikać to może zarówno z braku swoistości metody, jak i z faktu, że rutynowe metody MRI nie uwidaczniają zmian korowych, których liczba koreluje ze stopniem zaburzeń

poznawczych u pacjentów z RRMS (Roosendaal i wsp., 2009; Calabrese i wsp., 2009). W badaniach na modelach zwierzęcych EAE wykazano istotną rolę patologii hipokampa w rozwoju zaburzeń poznawczych (Ziehn i wsp., 2010), co potwierdzono także na niewielkiej liczbie pacjentów z SM (Roosendaal i wsp., 2009), u których zaobserwowano związek między liczbą zmian korowych w hipokampie a sprawnością pamięci wzrokowo-przestrzennej. Wykryto również zależność między objętością hipokampa a wynikiem testu zapamiętywania listy słów u chorych na SM (Sicotte i wsp., 2008). Z kolei Roca i wsp. (2008) wykazali, że nasilenie deficytu poznawczego mierzonego baterią testów neuropsychologicznych u 12 pacjentów z wczesnym SM (czas trwania choroby poniżej 3 lat) koreluje ze stopniem uszkodzenia szlaków czołowo-podkorowych, wyrażonym za pomocą pomiarów anizotropii frakcyjnej oraz współczynnika dyfuzji w badaniu MRI metodą tensora dyfuzji (ang. diffusion tensor imaging, DTI). Pojawia się też coraz więcej doniesień o istotnej roli atrofii w rozwoju zaburzeń poznawczych. Dotyczy to zarówno atrofii globalnej, jak i regionalnej, między innymi atrofii wzgórza (Houtchens i wsp., 2007; Ramasamy i wsp., 2009).

Wczesna identyfikacja zaburzeń poznawczych u pacjentów z SM ma istotne znaczenie w kontekście jakości życia chorych, którym można zapewnić odpowiednie wsparcie psychoterapeutyczne oraz potencjalną farmakoterapię. Ponadto, obecność deficytu poznawczego w momencie rozpoznania CIS stanowi czynnik niekorzystny rokowniczo, związany z częstszą konwersją do klinicznie pewnej postaci choroby (Zipoli i wsp., 2010). Czasochłonne badanie neuropsychologiczne nie należy do rutynowej oceny pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane. Dotychczas nie zidentyfikowano testu, który mógłby służyć jako marker globalnego deficytu poznawczego u pacjentów z SM. Stosowany w wielu badaniach klinicznych test PASAT (ang. Paced Auditory Serial Addition Test, czas rytmicznego dodawania bodźców słuchowych) jest badaniem czasochłonnym, skomplikowanym i wymagającym, zarówno dla badanego, jak i dla badacza, a u pacjentów wykazano efekt uczenia się (Rosti-Otajärvi i wsp., 2007). W praktyce codziennej nadal brakuje przesiewowego testu neuropsychologicznego, który byłby prosty, szybki w wykonaniu i efektywny w identyfikacji pacjentów z zaburzeniami poznawczymi.

2.4. Neuroobrazowanie w stwardnieniu rozsianym: rola badania tomografii rezonansu magnetycznego

Obrazowanie MRI umożliwiło po raz pierwszy przyżyciową wizualizację zmian demielinizacyjnych w SM, które przedtem opisywano jedynie w badaniu neuropatologicznym (za: Selmaj, 2006). Cechując się wysoką czułością w wykrywaniu ogniskowych zmian zapalnych istoty białej, technika rezonansu magnetycznego istotnie przyczyniła się zarówno do postępu w rozumieniu patologii choroby, jak i do trafnej identyfikacji chorych. Wprowadzone do procesu diagnostycznego w latach osiemdziesiątych XX wieku, MRI stało się podstawowym – obok obserwacji klinicznej – narzędziem w rozpoznawaniu SM.

W technice tej wykorzystuje się właściwości magnetyczne protonów, które w wyniku zjawiska jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. nuclear magnetic resonance) w silnym polu magnetycznym wytwarzanym przez skaner emitują energię odbieraną jako sygnał i przetwarzaną za pomocą metod matematycznych, m.in. z zastosowaniem dwuwymiarowej transformacji Fouriera, w obraz (za: Siedlecki i Kowalski, 2002). Odróżnienie tkanek prawidłowych od patologicznych możliwe jest dzięki odmiennej zawartości wody, co warunkuje najistotniejsze zalety i wady metody. Zaletą jest stosunkowo wysoka czułość w wykrywaniu patologii istoty białej mózgowia, a wadą – ograniczona swoistość (Miller i wsp., 2006). W konwencjonalnych sekwencjach MRI podobnie wyglądać może obrzęk, demielinizacja, stan zapalny, remielinizacja, gliozą i ubytek aksonów (Mc Donald i wsp., 1992). Różnicowanie plak z innymi uszkodzeniami istoty białej opiera się więc przede wszystkim na stwierdzeniu charakterystycznej dla danego procesu chorobowego lokalizacji. Zmiany demielinizacyjne typowe dla SM pojawiają się zazwyczaj okołokomorowo (u 95% pacjentów), na pograniczu istoty białej i szarej (ang. juxtacortical lesions, u 2/3 pacjentów), w obrębie ciała modzelowatego, gdzie zmiany niedokrwienne są rzadkością, a także podnamiotowo, w obrębie pnia mózgu i mózdzku – u 50% pacjentów z SM. Zmiany korowe, choć obserwowane w badaniach autopsyjnych (5-10% wszystkich zmian, Ormerod i wsp., 1987), są rzadko widoczne w rutynowym badaniu MRI (patrz: rozdział 2.3), z uwagi na podobną wartość gęstości protonowej istoty szarej oraz plak.

Nowe, niekonwencjonalne techniki akwizycji MRI, takie jak obrazowanie z zastosowaniem transferu magnetyzacji (ang. magnetization transfer imaging, MTR),

tensora dyfuzji (DTI) oraz spektroskopii rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance spectroscopy, MRS), dostarczają pomiarów o większej swoistości dla patologii mieliny i aksonów (Giacomini i Arnold, 2008). Wymagają one stosowania zaawansowanych technik analizy obrazu, co stanowi o trudności we wprowadzeniu tych metod do codziennej praktyki klinicznej.

Podstawowe i rutynowe sekwencje stosowane w diagnostyce choroby to sekwencja długiego czasu relaksacji T2 (ang. weighted spin echo – T2), w której zmiany demielinizacyjne ukazują się jako hiperintensywne, oraz sekwencja krótkiego czasu relaksacji (ang. weighted spin echo – T1), gdzie plaki prezentują się jako ubytek sygnału. Zmiany hipointensywne, których obecność utrzymuje się przez co najmniej 6 miesięcy, nazywane są potocznie „czarnymi dziurami” (ang. black holes, Simon i wsp., 2006). Odpowiadają one ogniskom nieodwracalnego uszkodzenia aksonów. Sekwencja T1-zależna wykorzystywana jest przede wszystkim w celu zobrazowania zmian aktywnych, które z powodu uszkodzenia bariery krew-mózg wzmacniają się po dożylnym podaniu kontrastu gadolinowego (Gd+). Aktywne plaki mogą wyprzedzać pojawienie się nowych zmian w sekwencji T2-zależnej o godziny lub dni (Miller i wsp., 1988). Większość nowych zmian ulega wzmocnieniu przez 2-6 tygodni. Całkowitą liczbę plak ocenia się natomiast zwykle w sekwencji T2-zależnej lub też w sekwencji FLAIR (ang. fluid attenuation inversion recovery), która stanowi połączenie sekwencji T2 oraz sekwencji tłumiącej sygnał płynu mózgowo-rdzeniowego, co ułatwia obrazowanie zmian przykomorowych.

W 1838 roku, w swoim atlasie zmian patologicznych, Robert Carswell opisywał zmiany zanikowe w stwardnieniu rozsianym. Rozwój techniki tomografii rezonansu magnetycznego umożliwił przyżyciowe monitorowanie postępującej atrofii mózgowia, która warunkuje postęp choroby. Mechanizm, w którym dochodzi do zaniku mózgowia, jest zróżnicowany i złożony, a składają się nań demielinizacja i utrata aksonów, m.in. w procesie degeneracji wallerowskiej. Atrofia świadczy o nieodwracalnej utracie neuronów (Bermel i Bakshi, 2006). Istnieje kilka sposobów pomiaru atrofii przy użyciu metod MRI. Metody jakościowe, które opierają się na obserwacji zwiększenia przestrzeni płynowych kosztem parenchymy w porównaniu z normą dla danego wieku, są ogólnie dostępne i przydatne w codziennej praktyce lekarskiej, ale mało powtarzalne i niewiarygodne w kontekście badań klinicznych. Dwuwymiarowe metody ilościowe opierają się na pomiarach liniowych, takich jak szerokość trzeciej komory, maksymalna szerokość

komory bocznej, czy też wskaźnik BCR (ang. bicaudate ratio), który polega na pomiarze odległości między wewnętrznymi brzegami jądra ogoniastego w stosunku do odległości między brzegami mózgowia mierzonymi na tym samym poziomie. Metody te są preferowane względem metod jakościowych, niemniej w precyzji i powtarzalności ustępują metodom trójwymiarowym. Te ostatnie opierają się na technikach segmentacji mózgowia, pozwalającej na rozdzielenie struktur wewnątrzczaszkowych na miąższowe (parenchymalne) i nie-miąższowe (nie-parenchymalne) oraz określenie odsetkowego ich udziału w zajmowanej przestrzeni (Bermel i Bakshi, 2006), którego przykładem jest wskaźnik objętości miąższu do objętości mózgu (ang. brain-parenchymal fraction, BPF). Wskaźnik BPF stanowi uznany marker atrofii u pacjentów z SM (Rudick i wsp., 1999) i wykorzystywany jest w badaniach farmakoklinicznych.

Wprowadzenie technik wolumetrycznych MRI oraz metod pozwalających ocenić uszkodzenie w pozornie niezmienionej istocie białej (ang. normal appearing white matter, NAWM) pozwoliło, przynajmniej w pewnym stopniu, na rozwiązanie tzw. kliniczno-radiologicznego paradoksu SM, a więc zjawiska dyskorelacji pomiędzy całkowitą liczbą uszkodzeń a stanem klinicznym pacjentów (Barkhof i van Walderveen, 1999). Atrofia mózgowia okazała się bowiem silną zmienną objaśniającą postęp klinicznej niesprawności chorych na SM (Dartidar i wsp., 1999). Fisher i wsp. (2002) wykazali, że postęp globalnej atrofii mózgowia w ciągu 2 lat stanowi najlepszy oparty na MRI czynnik prognostyczny 8-letniego wyniku w skali EDSS. Ponadto, stopień atrofii mózgowia pozwala przewidzieć późniejszy deficyt poznawczy u pacjentów z SM (Benedict i wsp., 2004; Zivadinov i wsp., 2001).

3. Cele pracy

Nadrzędnym celem niniejszej dysertacji było określenie, czy zróżnicowanie grupy pacjentów ze stwardnieniem rozsianym pod względem ekspresji wybranych neurotrofin we frakcji mononuklearów krwi obwodowej wiąże się z różnym potencjałem regeneracji OUN, wyrażonym poprzez mniejszą atrofię mózgowia oraz lepszą sprawność funkcji poznawczych.

Sformułowano następujące cele szczegółowe pracy doktorskiej:

1. Ocena zróżnicowania ekspresji wybranych neurotrofin (beta-NGF, NT-3 i NT-4/5) w obrębie frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej u pacjentów z postacią kliniczną RRMS i jej związku z wybranymi parametrami klinicznymi.
2. Ocena zależności między parametrami uszkodzenia OUN mierzonymi za pomocą ilościowych badań MRI a produkcją beta-NGF, NT-3 i NT-4/5 przez komórki układu immunologicznego.
3. Ocena związku między nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych u pacjentów z RRMS a ekspresją wybranych neurotrofin w komórkach układu immunologicznego oraz parametrami uszkodzenia OUN w badaniach obrazowych.

Na podstawie analizy aktualnej literatury naukowej w zakresie biologii neurotrofin, koncepcji patogenezы stwardnienia rozsianego oraz badań na modelach zwierzęcych SM wysunięto następujące hipotezy:

1. Istnieje negatywna korelacja między stężeniem neurotrofin w komórkach układu immunologicznego a liczbą uszkodzeń oraz miarami atrofii OUN mierzonych za pomocą ilościowych badań MRI.
2. Istnieje negatywna korelacja między stężeniem neurotrofin w komórkach układu immunologicznego a nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych ocenianych za pomocą wybranych testów neuropsychologicznych.
3. Istnieje dodatnia korelacja między nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych ocenianych za pomocą wybranych testów neuropsychologicznych a liczbą uszkodzeń oraz miarami atrofii OUN mierzonych za pomocą ilościowych badań MRI.

4. Materiał badawczy i metody

4.1. Charakterystyka grupy badanej

Do badania włączeni zostali pacjenci z rozpoznaniem rzutowo-remisyjnej postaci stwardnienia rozsianego, postawionym na podstawie kryteriów diagnostycznych według McDonalda (Polman i wsp., 2005), hospitalizowani w Oddziale Klinicznym Neurologii Szpitala Klinicznego im. Heliodora Świącickiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, którzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Protokół projektu został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 1023/2008).

Przyjęto następujące kryteria wykluczenia:

- wiek poniżej 18 i powyżej 65 lat,
- kliniczne cechy rzutu SM podczas badania,
- udokumentowany rzut w czasie do 8 tygodni przed badaniem,
- leczenie immunomodulujące w czasie ostatnich 12 miesięcy,
- leczenie steroidami w czasie ostatnich 3 miesięcy,
- obecność choroby psychiatrycznej, w szczególności ciężkiej depresji i schizofrenii, pobieranie neuroleptyków, leków przeciwdepresyjnych lub przeciwpadaczkowych, a także uzależnienie od alkoholu i/lub leków,
- obecność innej choroby o etiologii autoimmunologicznej,
- obecność postępującej choroby narządów mięsnych i/lub choroby nowotworowej,
- niesprawność kończyny dominującej, deficyt w zakresie narządu wzroku oraz inne objawy neurologiczne uniemożliwiające wykonanie testów neuropsychologicznych,
- obecność przeciwwskazań do badania tomografii rezonansu magnetycznego.

4.2. Protokół badania

4.2.1. Badanie podmiotowe

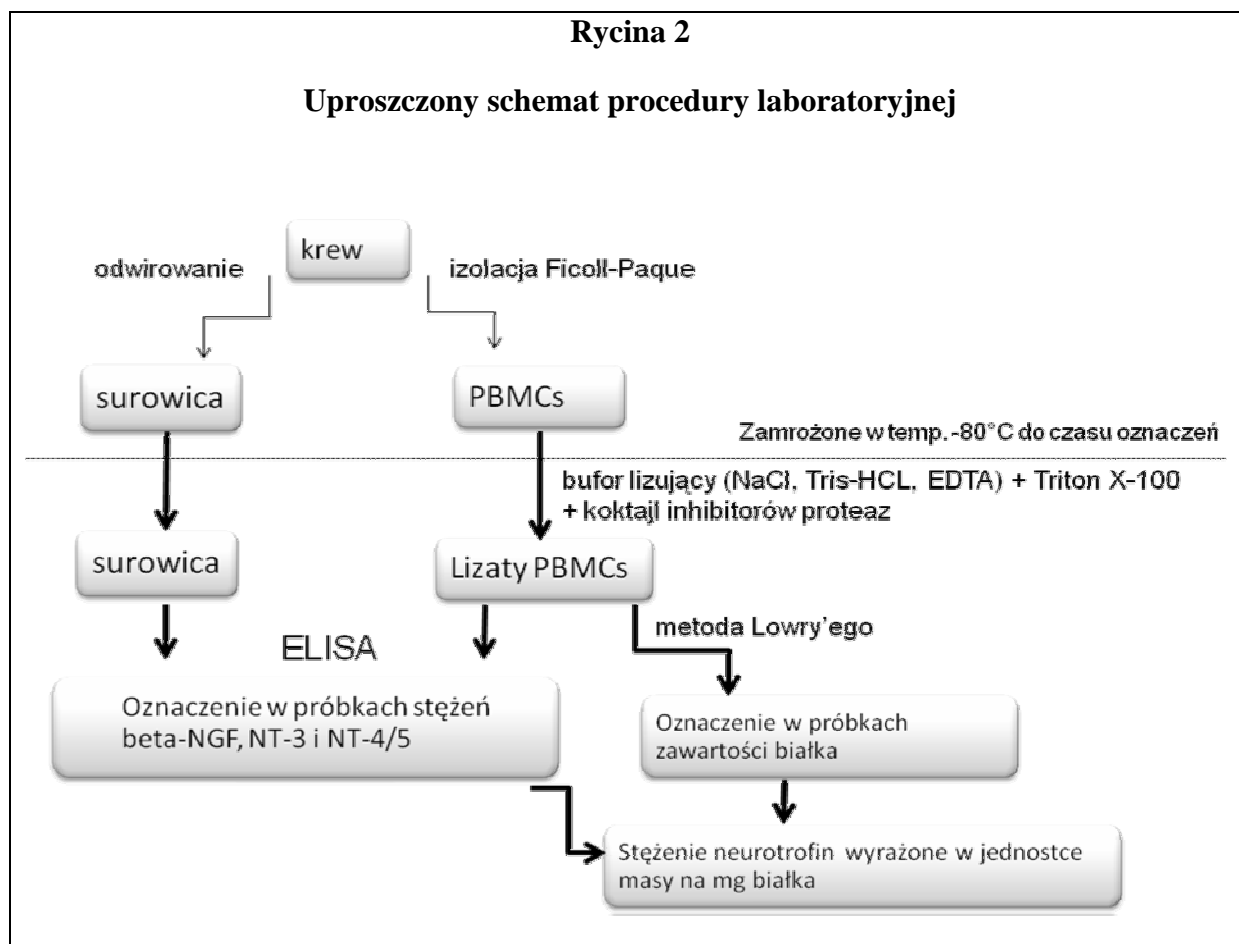
Przeprowadzone wywiady uwzględniały szczegółowe pytania o aktualne skargi, przebieg choroby, a także objawy mogące sugerować jakiegokolwiek choroby współistniejące. Ukierunkowane pytania, analiza dotychczasowej dokumentacji medycznej pacjentów oraz aktualnych, podstawowych, rutynowo wykonywanych badań laboratoryjnych krwi (morfologia, OB, CRP, glikemia, lipidogram) pozwoliły określić ewentualne kryteria wyłączenia pacjentów z badania (jak wyżej).

4.2.2. Ocena stanu neurologicznego

Badanie przedmiotowe wszystkich pacjentów zostało przeprowadzone przez autora niniejszej pracy. Pełne badanie neurologiczne uwzględniało ocenę niesprawności ruchowej pacjenta w skali EDSS (ang. expanded disability status scale), przedstawioną jako wynik sumaryczny oraz wyniki cząstkowe w ośmiu podskalach oceniających funkcje: narządu wzroku, pnia mózgu, układu piramidowego, mózdkowego, czuciowego, zwieraczy, a także tzw. funkcje mózgowe (nastrój, funkcje poznawcze, męczliwość) oraz funkcjonowanie w życiu codziennym (ang. ambulation). Dla każdego pacjenta obliczono również sumę podskal, w których wystąpił deficyt.

4.2.3. Procedura laboratoryjna

Uproszczony schemat procedury laboratoryjnej przedstawiono na rycinie nr 2 i omówiono w kolejnych podpunktach.



A. Pobranie krwi celem izolacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs) oraz uzyskania surowicy, a także zabezpieczenie krwi pełnej celem izolacji DNA oraz analizy wybranych polimorfizmów

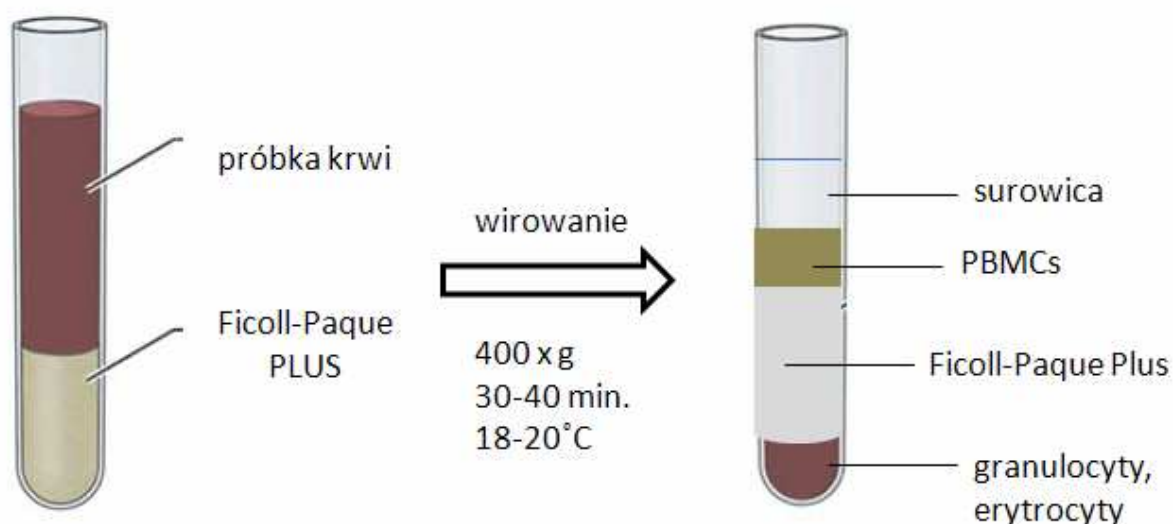
B. Izolacja PBMCs

Świeżo pobrane próbki heparynizowanej krwi pacjentów poddano metodzie rozdziału na frakcje komórkowe w gradiencie gęstości Ficollu, zgodnie z instrukcjami producenta (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare). Zasadę rozdziału w gradiencie gęstości Ficollu przedstawiono schematycznie na rycinie nr 3. Każdorazowo na 3 ml roztworu Ficoll-Paque PLUS delikatnie nawarstwiono 4 ml próbki krwi rozcieńczonej w zubożonym roztworze soli (BSS, ang. balanced salt solution). Uzyskane próbki wirowano przez 30-40 minut (400 x g) w temperaturze 18-20 °C. Po odwirowaniu zebrano interfazę bogatą w komórki jednojądrzaste. Wyizolowane komórki poddano trzykrotnej procedurze płukania, celem usunięcia płytek krwi. Płukanie polegało na zawieszeniu komórek w 6 ml BSS, następnie wirowaniu przez 10 minut (60-100 x g) w temperaturze 18-20 °C,

i usunięciu supernatantu. Wyizolowane mononukleary zawieszono w roztworze PBS (8.006 g 137 mM NaCl + 2.90 g 8.1 mM Na₂HPO₄ + 0.204 g 1.5 mM KH₂PO₄ + 1.342 ml 15% KCl + 1000 ml wody redestylowanej) i rozdzielono do probówek polipropylenowych typu Eppendorf. Każdorazowo 10 µl zawiesiny umieszczono na szkiełku podstawowym, aby zweryfikować zawartość mononuklearów w powiększeniu pod mikroskopem świetlnym. Próbki wyizolowanych PBMCs zamrożono w temperaturze -80°C do czasu oznaczenia stężeń wybranych neurotrofin przy pomocy metody immunoenzymatycznej ELISA.

Rycina 3

Schemat metody rozdziału frakcji komórek surowicy w gradiencie gęstości Ficollu



C. Liza PBMCs

Po rozmrożeniu próbki mononuklearów poddano homogenizacji poprzez umieszczenie w buforze lizującym (150mM NaCl + 50mM Tris-HCl, pH 8.0 + 5mM EDTA) z dodatkiem 1%-roztworu Triton X-100 (Sigma-Aldrich; 0.1 ml na 10 ml buforu lizującego) i inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Coctail, Sigma-Aldrich, 20µl na 10 ml buforu lizującego). Lizaty poddano wirowaniu (1600 x g, 10 minut), po czym zebrano supernatant. Poziom białka w lizatach określono za pomocą metody Lowry'ego (Lowry i wsp., 1957).

D. Oznaczenie stężeń wybranych neurotrofin przy pomocy metody immunoenzymatycznej ELISA

ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) to ilościowy test immunoenzymatyczny oparty o fazę stałą, który służy do oznaczenia stężenia antygeny w badanej próbce, z wykorzystaniem odczynników znakowanych enzymami. Stężenia beta-NGF, NT-3 i NT-4/5 w surowicy oraz w lizatach PBMCs określono przy użyciu następujących testów immunoenzymatycznych:

- RayBio Human Beta-NGF ELISA Kit, RayBiotech,
- RayBio Human NT-4 ELISA Kit, RayBiotech,
- ChemiKine NT-3 Sandwich ELISA kit, Millipore.

Oznaczenia stężeń wybranych neurotrofin wykonano zgodnie z instrukcjami producenta. Do zagłębień płytki polistyrenowej opłaszczonej przeciwciałami skierowanymi przeciwko poszukiwanym neurotrofinom dodano po 100 μ l prób badanych i poddano 12-godzinnej inkubacji w temperaturze 4 °C (na wytrząsarce). Po czterokrotnym płukaniu w przypadku beta-NGF i NT-4/5 oraz pięciokrotnym dla NT-3 do zagłębień dodano po 100 μ l biotynylowanego przeciwciała przeciwko odpowiednim neurotrofinom, a następnie inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po kolejnej serii płukań do każdego zagłębienia płytki dodano po 100 μ l koniugatu streptawidyny i polimeru peroksydazy chrzanowej (poly-HRP) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 45 minut dla beta-NGF i NT-4/5 oraz przez godzinę dla NT-3. Po następnej serii płukań do poszczególnych zagłębień dodano po 100 μ l substratu reakcji barwnej, tetrametylobenzydyny (TMB). Po 30 minutach inkubacji w ciemności dla beta-NGF i NT-4/5 oraz 15 minutach dla NT-3 zahamowano reakcję barwną poprzez dodanie 50 μ l roztworu kwasu siarkowego (beta-NGF i NT-4/5) lub solnego (NT-3), aby natychmiast dokonać odczytu gęstości optycznej przy użyciu czytnika spektrofotometrycznego (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc), dla długości fali 450 nm. Stężenia badanych neurotrofin wyznaczono na podstawie odpowiednio wykreślonych krzywych standardowych. W lizatach mononuklearów stężenia wybranych cząsteczek wyrażono w pikogramach na miligram białka (pg/mg białka), z wykorzystaniem uzyskanych pomiarów poziomu białka w badanych próbkach (podpunkt C).

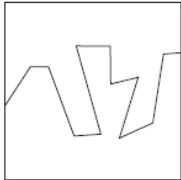
Wszystkie oznaczenia wykonano dwukrotnie. Do oceny statystycznej wykorzystano średnią z obydwu pomiarów. Założono, że w przypadku różnicy pomiędzy pomiarami gęstości optycznej większej niż 10% dla pojedynczej próbki, wynik ów nie będzie uwzględniany w analizie statystycznej. Minimalna wykrywana dawka (ang. minimal detectable dose), będąca miarą czułości metody, wynosiła 14.0 pg/ml dla RayBio Human Beta-NGF ELISA Kit, 2.0 pg/ml dla RayBio Human NT-4 ELISA Kit, RayBiotech oraz 7.8 pg/ml w przypadku ChemiKine NT-3 Sandwich ELISA Kit, Millipore.

4.2.4. Ocena funkcji poznawczych przy użyciu wybranych testów neuropsychologicznych

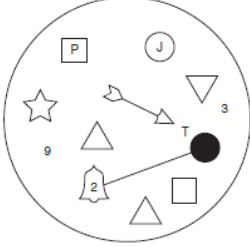
Badanie neuropsychologiczne przeprowadzone zostało przez autora niniejszej pracy, w tych samych warunkach (pora dnia, oświetlenie) i w identycznej kolejności, oraz po wykluczeniu potencjalnych czynników mogących wpływać na uzyskane przez pacjentów wyniki, tj. zmęczenie, popunkcyjny ból głowy i inne subiektywne dolegliwości. Wybór zastosowanych testów psychologicznych wraz z ich charakterystyką przedstawiono w tabeli nr 1.

Tabela 1

	nazwa polska	nazwa angielska	sposób przeprowadzenia badania	funkcje poznawcze oceniane w teście
1	test spontanicznego tworzenia grup słów (test fluencji słownej)	spontaneous word list generation test	pacjent ma 90 sekund na podanie jak największej liczby słów z danej kategorii (warzywa i owoce w wersji A, zwierzęta w wersji B); pacjent wykonuje test w obydwu wersjach; jako wynik przyjmuje się liczbę prawidłowo podanych słów w wersji, którą pacjent wykonał lepiej	semantyczna fluencja słowna, myślenie asocjacyjne (clustering), liczba przełączeń (switching), procesy wyobrazeniowe (rozumowanie abstrakcyjne) test jest zmodyfikowaną wersją testu fluencji fonemicznej (ang. phonemic naming task) z baterii BRB-N (Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests), Huijbregts i wsp., 2004

	nazwa polska	nazwa angielska	sposób przeprowadzenia badania	funkcje poznawcze oceniane w teście
2	test zapamiętywania listy słów	15-Word List Recall Test	po prezentacji 15 słów (1 słowo jest na ekranie widoczne jest przez 1 sekundę) pacjent proszony jest o zapisanie wszystkich słów, które zapamiętał; wynik to liczba prawidłowo zapamiętanych słów	pamięć deklaratywna (werbalna)
3	test rozpoznawania obrazu	pattern recognition	pacjent ma 5 sekund na zapamiętanie obrazka:  po 5 minutach ma za zadanie wskazać zapamiętany obrazek spośród 6 podobnych (Carter, 2005) jako wynik przyjmuje się 1, jeśli odpowiedź jest prawidłowa lub 0, jeśli jest nieprawidłowa	pamięć wzrokowa
4	komputerowa wersja testu oceniającego czas reakcji prostej	computerized Simple Reaction Time test, RT test	pacjent wykonuje zadanie siedząc w wygodnej pozycji w odległości 60 cm od ekranu komputera; podczas zadania na ekranie pojawiają się ze zmienną częstotliwością (100, 150, 200, 250 i 300 ms) losowo wybrane litery, pacjent jest poinstruowany,	wzrokowo-przestrzenna pamięć operacyjna, szybkość spostrzegania, szybkość psychomotoryczna, poziom koncentracji uwagi

	nazwa polska	nazwa angielska	sposób przeprowadzenia badania	funkcje poznawcze oceniane w teście
			<p>aby nacisnąć określony klawisz palcem wskazującym tak szybko jak to możliwe po zobaczeniu litery na ekranie, zadanie składa się z 35 prób, wykonywane jest jednokrotnie,</p> <p>wynik przedstawiono jako pierwszy i trzeci kwartyl, medianę oraz rozstęp międzykwartylowy; test skonstruowano przy użyciu oprogramowania PEBL (http://pebl.sf.net)</p>	
5	test łączenia punktów – część A	version A of Trail Making Test (TMT-A)	<p>pacjent rysuje linię łączącą kolejne liczby (od 1 do 25) w porządku wzrastającym;</p> <p>wynik to czas (w sekundach), w którym pacjent poprawnie wykona zadanie</p>	<p>szybkość psychomotoryczna, poziom koncentracji uwagi, przeszukiwanie wzrokowo-przestrzenne</p> <p>test jest elementem baterii Halsteda- Reitana, Broshek i Barth, 2000</p>
6	test łączenia punktów – część B	version B of Trail Making Test (TMT-B)	<p>pacjent rysuje linię łączącą na przemian kolejne liczby i litery w porządku wzrastającym; wynik to czas (w sekundach), w którym pacjent poprawnie wykona zadanie</p>	<p>wzrokowo-przestrzenna pamięć operacyjna, zdolność przełączania się na nowe kryterium po wyuczeniu jednej zasady reagowania;</p> <p>test jest elementem baterii Halsteda- Reitana, Broshek i Barth, 2000</p>

	nazwa polska	nazwa angielska	sposób przeprowadzenia badania	funkcje poznawcze oceniane w teście
7	test powtarzania cyfr wprost – wersja wzrokowa	visual digit span	test wykonano w oparciu o stronę internetową: www.realage.com ; wynik to maksymalna liczba zapamiętanych cyfr	pojemność operacyjnej pamięci wzrokowej
8	test powtarzania cyfr – wersja słuchowa	auditory digit span	pacjent powtarza usłyszane szeregi losowo wybranych liczb; wynik to maksymalna liczba zapamiętanych cyfr	pojemność operacyjnej pamięci słuchowej
9	test zapamiętywania szczegółów	attention to detail	pacjent ma 5 minut na zapamiętanie obrazka:  następnie odpowiada na 8 pytań dotyczących obrazka; wynik to liczba prawidłowych odpowiedzi; Carter 2005	pamięć wzrokowa, uwaga

10	Test Matryc Ravena w Wersji Kolorowej	Raven's Coloured Progressive Matrices	pacjent wykonuje 36 zadań w postaci niepełnych wzorców, ujętych w trzy serie (A, AB, B), po 12 zadań każda; pacjent dobiera brakujący fragment spośród podanych; wynik to liczba prawidłowych odpowiedzi (po 12 w każdej serii, max 36 punktów); Spring i Strauss, 1998	rozumowanie logiczne (inteligencja ogólna, g)
----	---------------------------------------	---------------------------------------	---	---

Ponadto dokonano następującej oceny:

- rękę dominującą oceniono na podstawie Edynburskiego Kwestionariusza Ręczności (Edinburgh Handedness Inventory, Oldfield, 1971),
- występowanie depresji oceniono na podstawie wypełnianego przez pacjenta kwestionariusza skali depresji Becka (21 pytań, w każdym wynik od 0 do 3, Beck i wsp., 1961),
- indeks jakości życia oceniono na podstawie polskiej adaptacji Indeksu Jakości Życia Ferrans i Powers (Jaracz i wsp., 2001),
- poziom wykształcenia oceniono w skali 1-4 (1-podstawowe, 2-zawodowe, 3-średnie, 4-wyższe) oraz jako łączną liczbę lat edukacji.

Deficyt w zakresie poszczególnych testów neuropsychologicznych zdefiniowano jako wynik gorszy niż mediana grupy dla danego testu. Łączny wynik wyrażono jako sumę wyników uzyskanych w poszczególnych testach (deficyt – 1, bez deficytu – 0). Wynik minimalny (0) oznacza brak deficytu. Wynik maksymalny (10) oznacza obecność deficytu w każdej z badanych domen. Liczba domen uszkodzonych (z deficytem) stanowi miarę globalnego deficytu poznawczego.

4.2.5. Badanie tomografii rezonansu magnetycznego mózgowia

Badania wykonano przy użyciu aparatu 1.5 Tesla Siemens Magnetom Avanto (Erlangen, Niemcy), w Zakładzie Neuroradiologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Czas pomiędzy badaniem a pobraniem krwi oraz badaniem neuropsychologicznym wynosił nie więcej niż 5 dni.

Obrazowanie obejmowało następujące sekwencje:

- wolumetryczna sekwencja T1-zależna (ang. Magnetisation Prepared Rapid Acquisition Gradient Echo, MPRAGE, TR=2400ms, TE=3.61ms, IR=1000ms, grubość warstwy 1.2mm, szerokość pasma piksela 180 Hz, obszar obrazowania, ang. field of view, FOV 240x240mm, rozmiar woksela 1.25x1.25x1.20mm);
- wolumetryczna sekwencja FLAIR-space (TR=6000ms, TE=359ms, IR=2200ms, grubość warstwy 1.5mm, szerokość pasma piksela 930Hz, obszar obrazowania, FOV 227x260mm, rozmiar woksela 1.01x1.01x1.50mm);
- obrazowanie tensora dyfuzji (DTI, TR=5800ms, TE=97ms, grubość warstwy 3.5mm, szerokość pasma piksela 1345 Hz, liczba kierunków 20, rozmiar woksela 1.79x1.79x3.50mm).

Na podstawie uzyskanych obrazów obliczono następujące parametry strukturalne mózgowia:

- wskaźnik objętości miąższu do objętości mózgu (BPF);
- objętość istoty białej i szarej;
- objętość oraz lokalizacja przestrzenna zmian demielinizacyjnych identyfikowanych na podstawie sekwencji FLAIR (ang. total lesion volume);
- pole przekroju ciała modzelowatego w płaszczyźnie strzałkowej (cc).

Obliczenia parametrów strukturalnych mózgowia wykonano za pomocą następującego oprogramowania:

- MedINRIA (Medical Image Navigation and Research Tool by INRIA, Nicolas Toussaint, Jean-Christophe Souplet, Pierre Fillard, Asclepios Research Team, INRIA Sophia Antipolis, France);

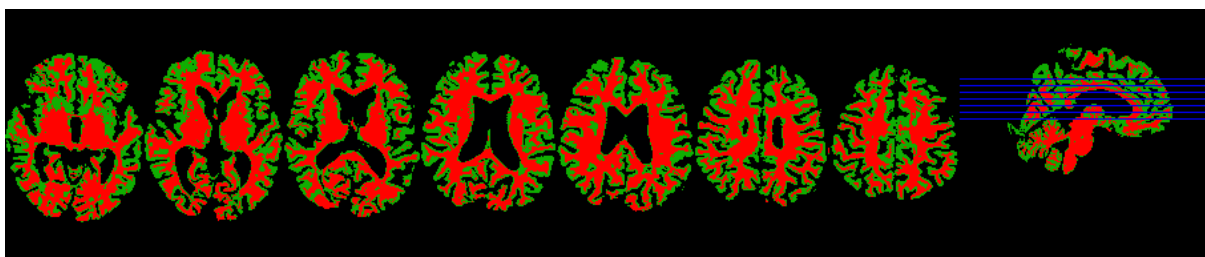
- MRICron (Rorden i wsp., 2007);
- FSL (TBSS, FLIRT, BET, FAST), Woolrich i wsp., 2009, Smith i wsp., 2004.

Na podstawie wolumetrycznej sekwencji T1-zależnej, za pomocą automatycznej metody FAST z pakietu FSL, dokonano segmentacji mózgowia, a następnie korekty niejednorodności sygnału. Przeprowadzono segmentację mózgowia na trzy klasy: płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR), istota szara (ang. grey matter, GM) i istota biała (ang. white matter, WM), z zastosowaniem metody ukrytych modeli Markova oraz algorytmu EM (ang. expectation-maximization algorithm, Zhang i wsp., 2001). Wskaźnik BPF obliczono na podstawie formuły: $(GM+WM)/(GM+WM+PMR)$.

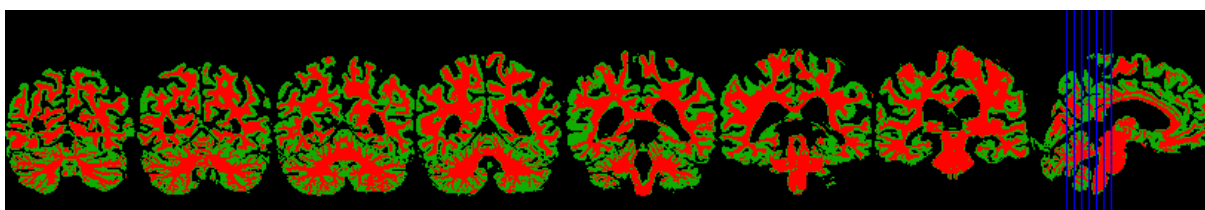
Na rycinach nr 4 i 5 przedstawiono przykładowe przekroje obrazów w wolumetrycznej sekwencji T1-zależnej, posegmentowanych za pomocą algorytmu FAST z pakietu FSL, dla pacjenta z minimalną i maksymalną wartością wskaźnika BPF w grupie badanej.

Rycina 4: Przekroje obrazów w wolumetrycznej sekwencji T1-zależnej, posegmentowanych za pomocą algorytmu FAST z pakietu FSL, dla pacjenta z minimalną wartością wskaźnika BPF w grupie badanej

A. Przekroje osiowe



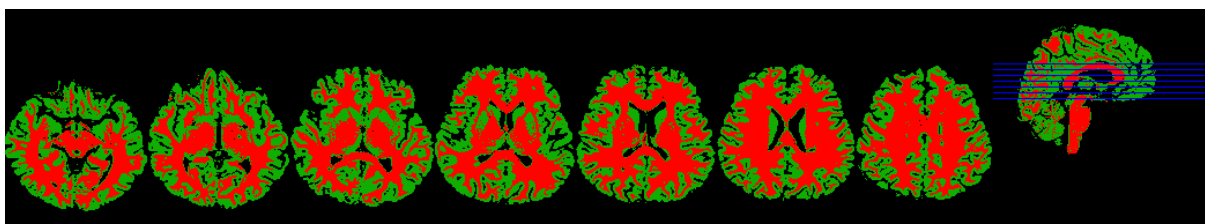
B. Przekroje czołowe



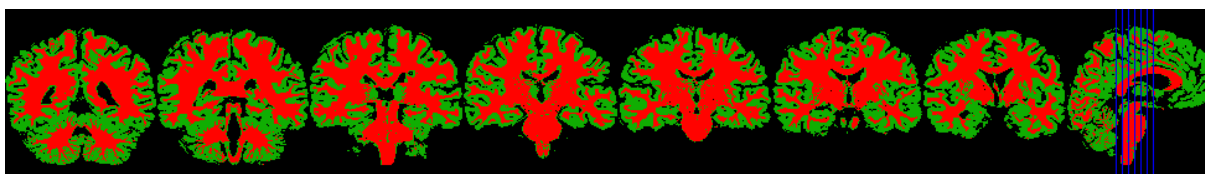
Istotę białą zaznaczono kolorem czerwonym, a istotę szarą – kolorem zielonym.

Rycina 5: Przekroje obrazów w wolumetrycznej sekwencji T1-zależnej, posegmentowanych za pomocą algorytmu FAST z pakietu FSL, dla pacjenta z maksymalną wartością wskaźnika BPF w grupie badanej

A. Przekroje osiowe



B. Przekroje czołowe



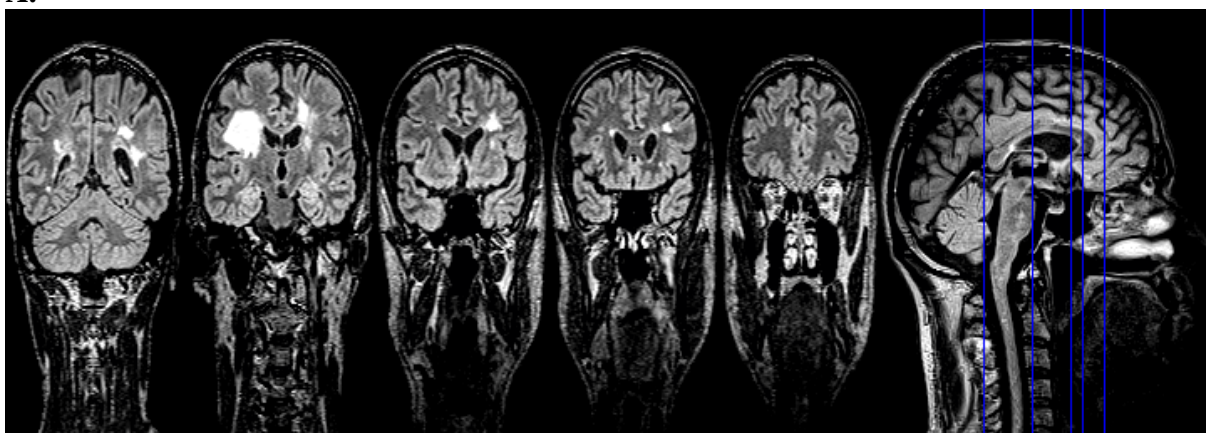
Istotę białą zaznaczono kolorem czerwonym, a istotę szarą – kolorem zielonym.

Całkowitą objętość zmian demielinizacyjnych obliczono na podstawie ręcznej segmentacji obrazów w wolumetrycznej sekwencji FLAIR-space, z zastosowaniem oprogramowania Mricron (www.nitrc.org/projects/mricron, Rorden i wsp., 2007). Segmentacja ręczna przeprowadzona została dwukrotnie, w trybie zaślepionym tak, by osoba obrysowująca nie była świadoma statusu klinicznego pacjenta oraz objętości uprzednio obrysowanych zmian. Zmienność badacza obliczono za pomocą wewnętrznego współczynnika korelacji (ang. inter-class correlation coefficient) oraz testu zgodności Blanda-Altmana. Na rycinie nr 6 przedstawiono przekroje osiowe obrazów w sekwencji FLAIR-space wybranych pacjentów z grupy badanej, wraz z korespondującymi obrazami z zaznaczoną segmentacją uszkodzeń demielinizacyjnych.

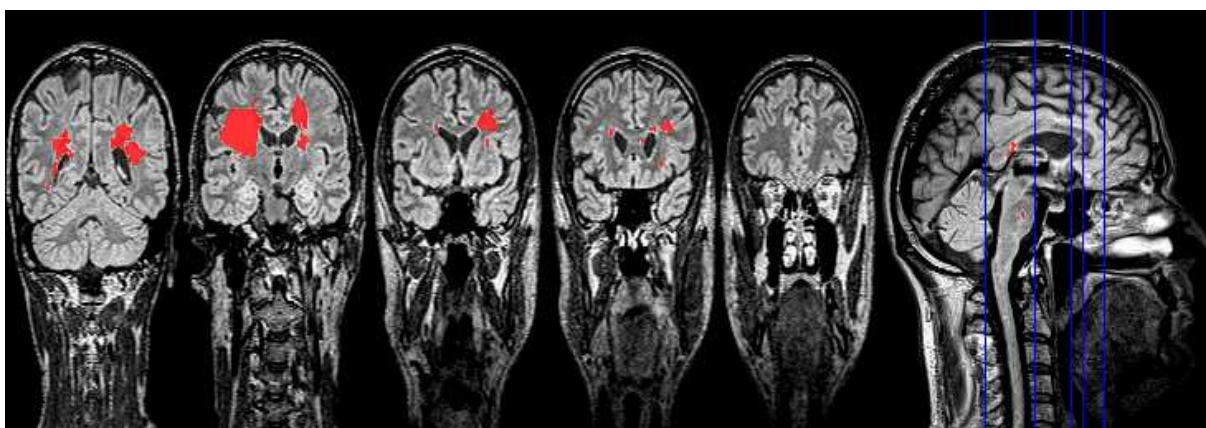
Rycina 6: Przykładowe przekroje obrazów w sekwencji FLAIR-space bez (A) i z (B) zaznaczoną na czerwono segmentacją uszkodzeń demielinizacyjnych, dla wybranych pacjentów z grupy badanej

Pacjent nr 1 (przekroje czołowe)

A.

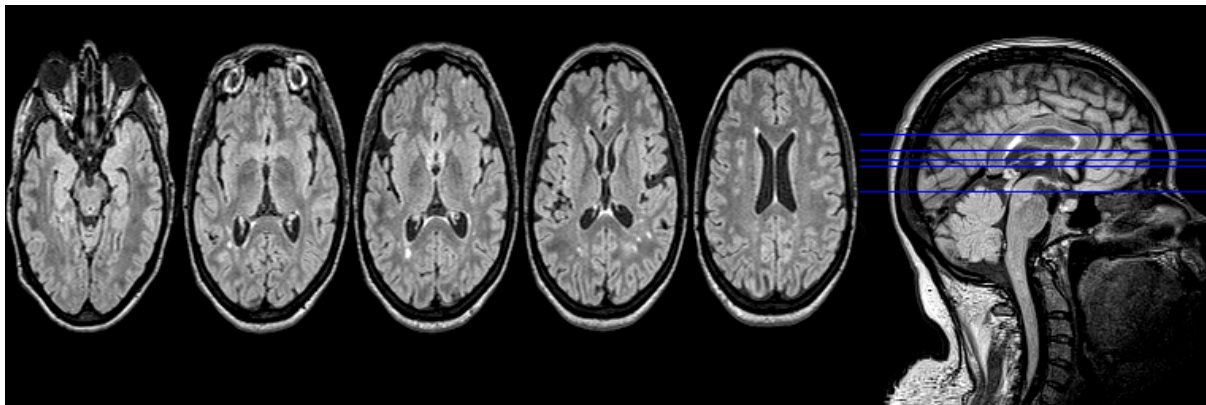


B.

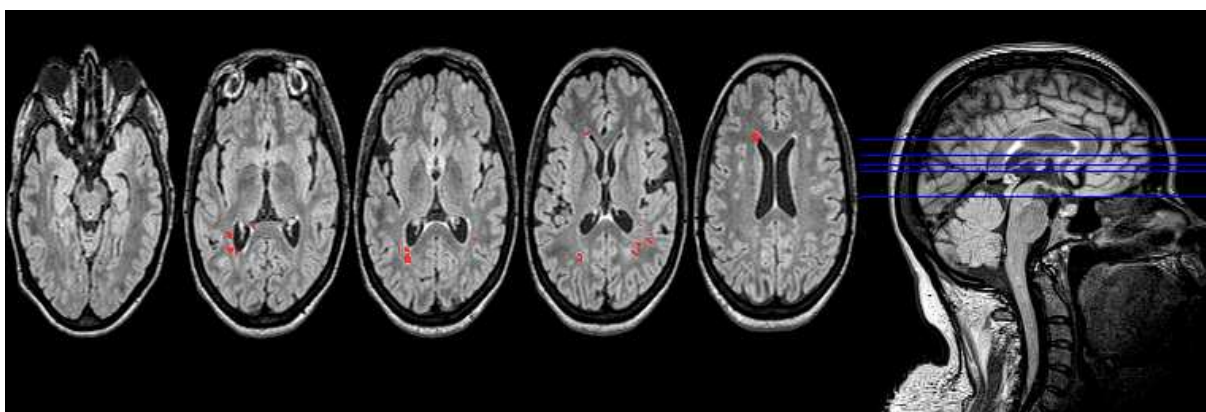


Pacjent nr 2 (przekroje osiowe)

A.

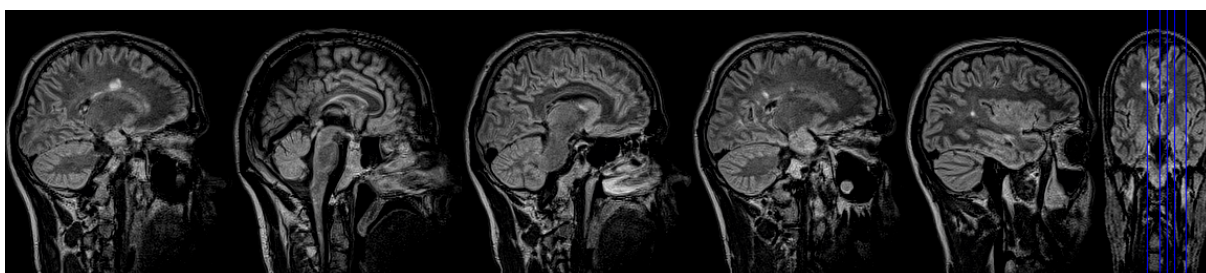


B.

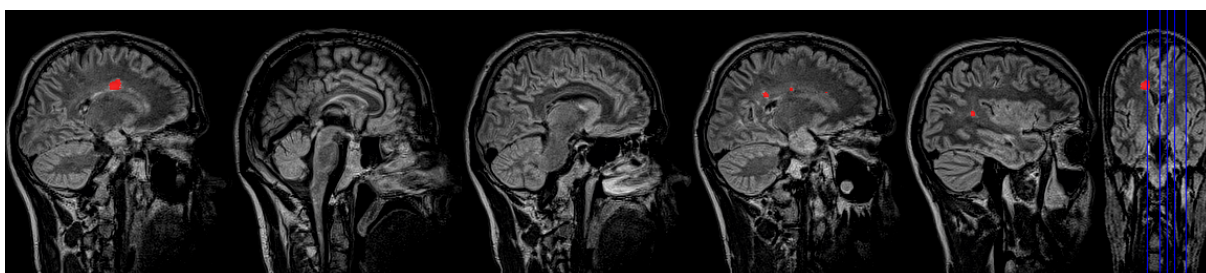


Pacjent nr 3 (przekroje strzałkowe)

A.

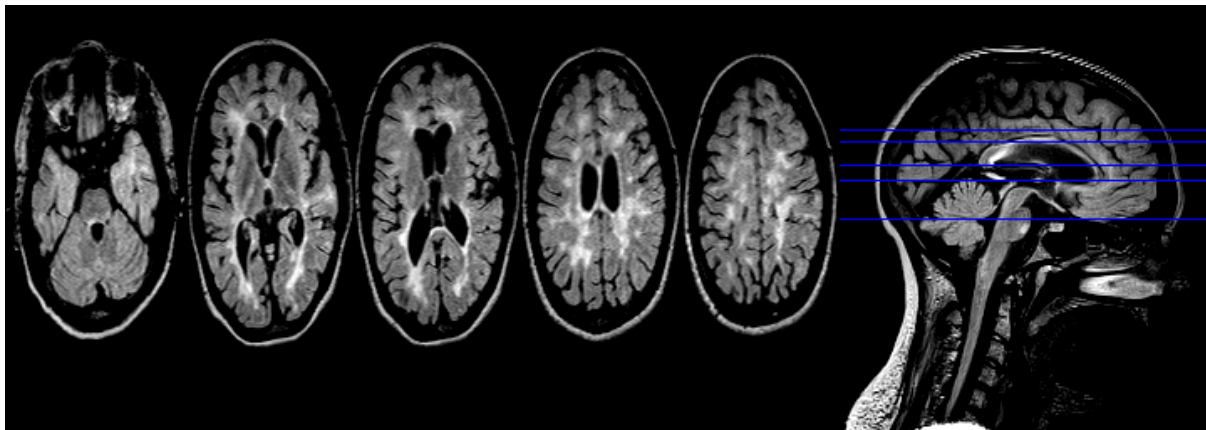


B.

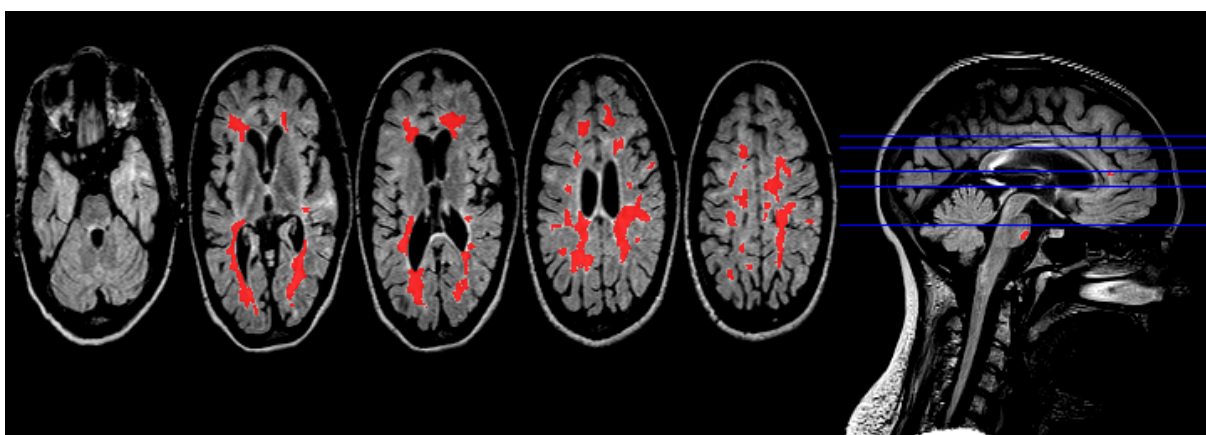


Pacjent nr 4 (przekroje osiowe)

A.



B.



Pacjent nr 5 (przekroje strzałkowe)

A.

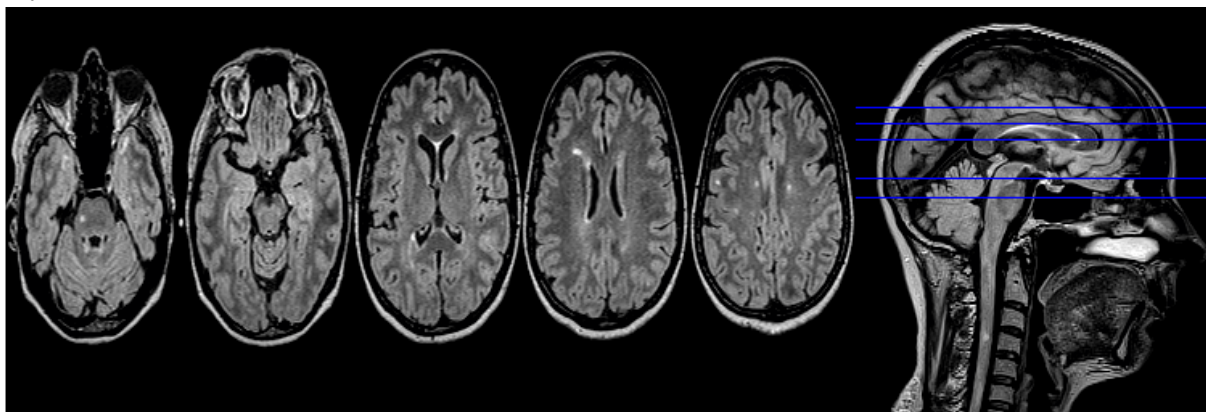


B.

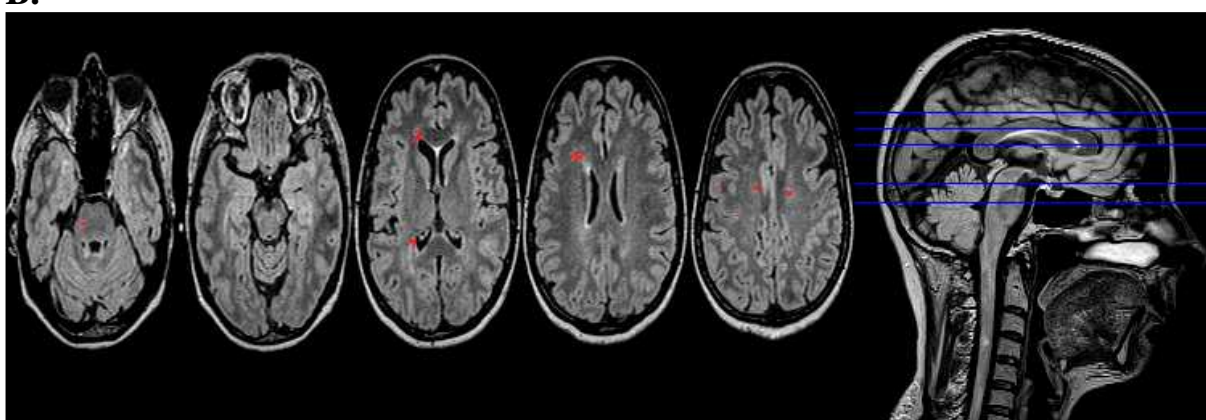


Pacjent nr 6 (przekroje osiowe)

A.

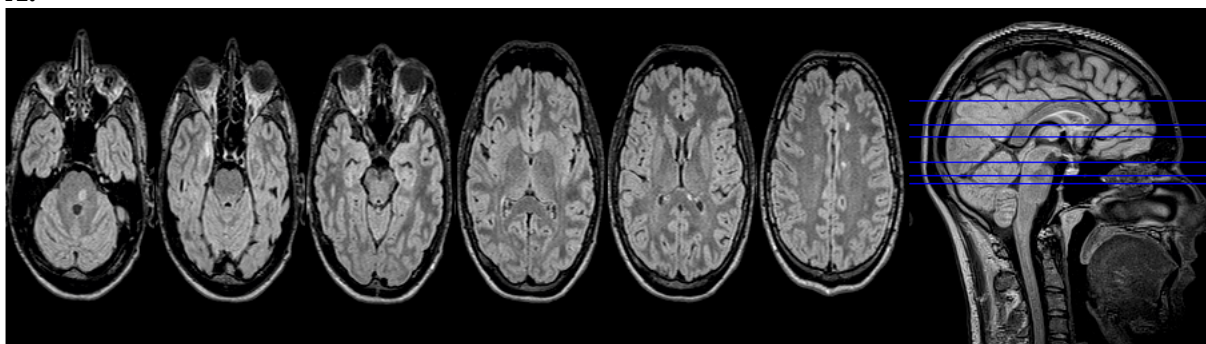


B.

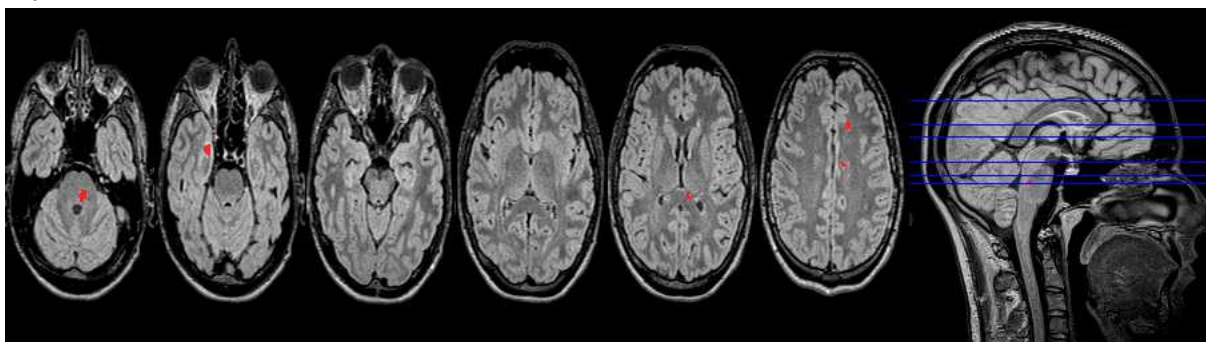


Pacjent nr 7 (przekroje osiowe)

A.



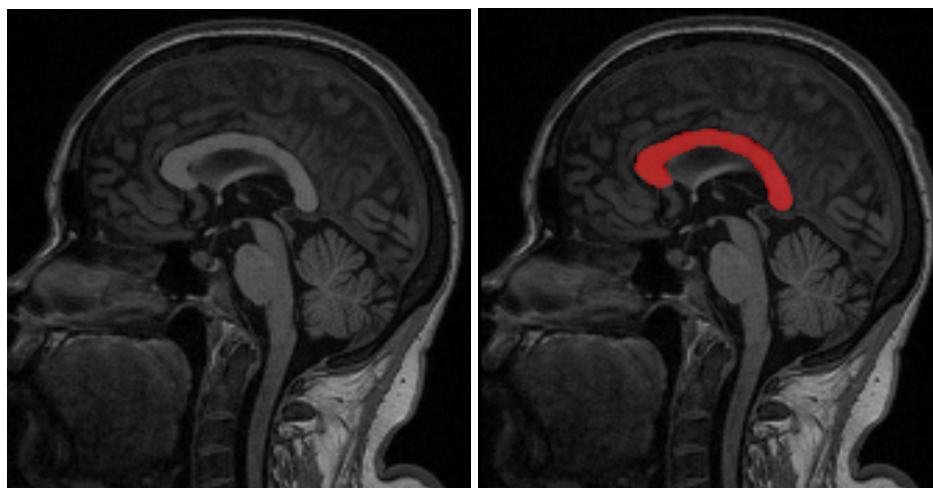
B.



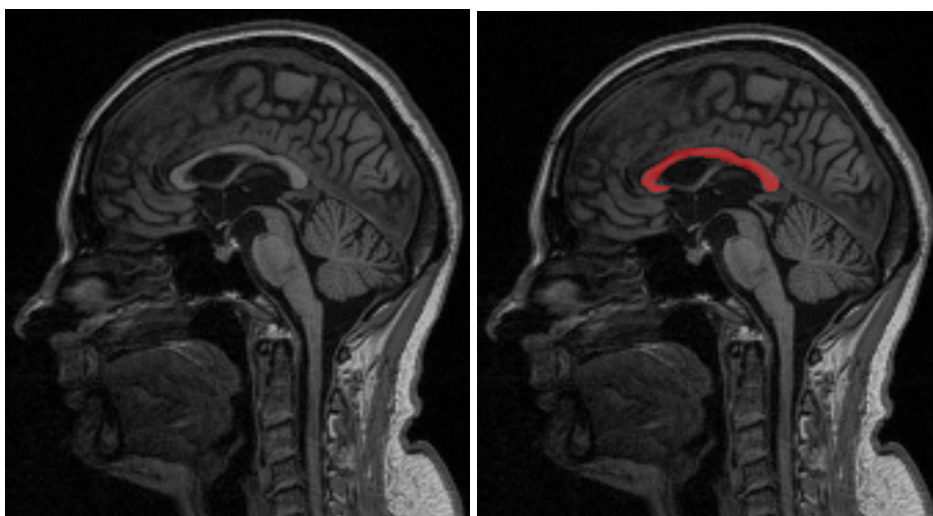
Pole przekroju ciała modzelowatego segmentowane było ręcznie w płaszczyźnie strzałkowej środkowej na obrazach T1-zależnych. Na rycinie nr 7 przedstawiono przekroje strzałkowe środkowe obrazów T1-zależnych, wraz z zaznaczoną segmentacją ciała modzelowatego, dla pacjentów z największym i najmniejszym polem przekroju ciała modzelowatego w grupie badanej.

Rycina 7: Przekroje strzałkowe środkowe obrazów w wolumetrycznej sekwencji T1-zależnej, z zaznaczoną segmentacją ciała modzelowatego, dla pacjenta z maksymalnym (A) i minimalnym (B) polem przekroju ciała modzelowatego w grupie badanej

A.



B.



4.2.6. Analiza statystyczna danych

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu R CRAN (www.r-project.org, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, 2010) oraz programu MedCalc w wersji 11.5.1. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Normalność rozkładu weryfikowano testem Kolomogorova-Smirnova. Dla zmiennych w skali interwałowej, spełniających warunki rozkładu normalnego, wyniki przedstawiono jako średnią, odchylenie standardowe (SD) oraz rozstęp (zakres, min-max). Dla zmiennych w skali porządkowej oraz zmiennych w skali interwałowej, które nie spełniają warunków rozkładu normalnego, obliczono medianę (Q2), pierwszy i trzeci kwartył (Q1 i Q3) oraz rozstęp międzykwartyłowy (ang. interquartile range, IQR). Korelację dwóch zmiennych o rozkładzie normalnym określono przy pomocy współczynnika korelacji liniowej Pearsona oraz współczynnika korelacji rangowej Spearmana, a dla zmiennych niespełniających kryterium normalności rozkładu obliczono wyłącznie współczynnik korelacji rangowej Spearmana. Wykorzystano również metodę analizy regresji wieloczynnikowej. Wartości zmiennych pomiędzy grupami porównano stosując test t-Studenta dla zmiennych spełniających warunki rozkładu normalnego oraz test U-Manna-Whitneya dla zmiennych niespełniających kryterium normalności rozkładu. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p \leq 0,05$.

5. Wyniki

5.1. Statystyka opisowa grupy badanej dla zmiennych demograficznych i klinicznych

Do grupy badanej włączono 41 chorych z RRMS, w tym 25 kobiet i 16 mężczyzn, w wieku od 18 do 63 lat (średnia wieku $39,2 \pm 11,4$ lat). Charakterystyka grupy pod względem zmiennych demograficznych i klinicznych przedstawiona została w tabeli nr 2.

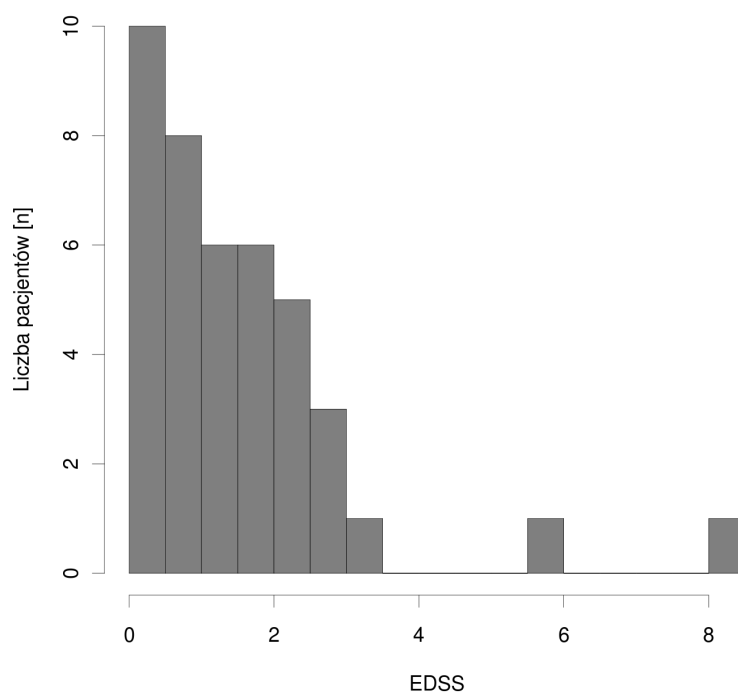
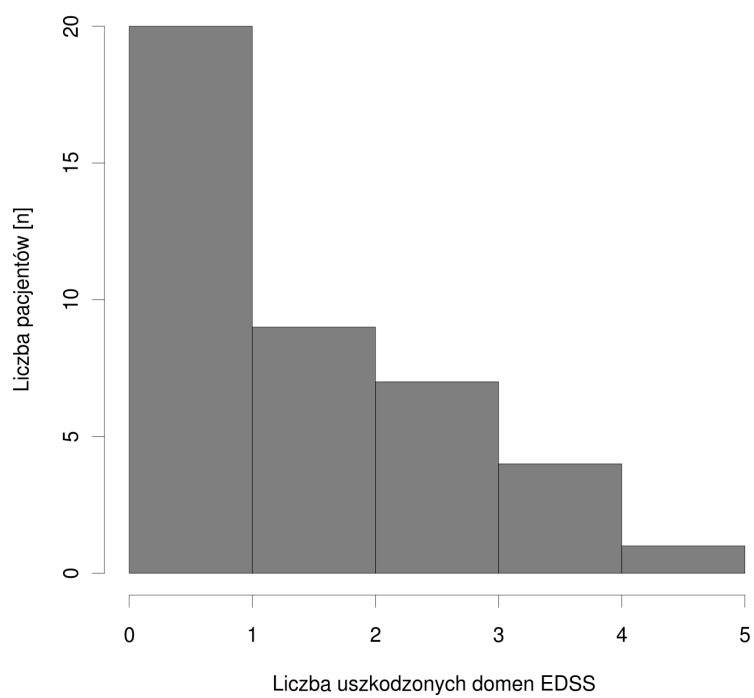
Tabela 2

Charakterystyka zmiennych demograficznych i klinicznych grupy badanej

	mediana	średnia \pm SD	Q1-Q3 (IQR)	min-max	zgodność z rozkładem normalnym
wiek (lata)	40	$39,2 \pm 11,4$	29 – 48	18 – 63	tak (p = 0,70)
EDSS	1,5	n/d	0,25 – 2,375	0 – 8,5	n/d
suma podskal EDSS z deficytem	2	$1,7 \pm 1,4$	0,75 – 3	0 – 5	tak (p = 0,12)
czas trwania choroby (lata)	3	$(6,27 \pm 6,87)$	0,65 – 10	0,08 – 24	tak (p = 0,08)
płeć	K = 25 (61%) M = 16 (39%)		n = K + M = 41		

Wykaz zastosowanych skrótów: n/d – nie dotyczy, K – kobiety, M – mężczyźni

Na rycinie nr 8 przedstawiono histogram z uzyskanej przez badanych pacjentów punktacji w skali EDSS, a na rycinie nr 9 – histogram z sumy podskal (domen) EDSS, w których stwierdzono występowanie deficytu.

Rycina 8: Histogram punktacji w skali EDSS w grupie badanej**Rycina 9: Histogram liczby uszkodzonych domen EDSS w grupie badanej**

5.2. Detekcja neurotrofin przy użyciu metody immunoenzymatycznej ELISA

Obecność beta-NGF, NT-3 i NT-4/5 potwierdzono odpowiednio w 25 (61%), 15 (36,6%) i 32 (78,1%) spośród zbadanych 41 próbek surowicy krwi pacjentów z SM. We frakcji mononuklearów krwi obwodowej stężenie beta-NGF było wykrywalne we wszystkich próbkach, a jego średnia wyniosła $1,26 \pm 0,8$ pg/mg białka, przy medianie 1,07 pg/mg białka. Detekcja NT-3 we frakcji mononuklearów wyniosła 93%, ze średnią $589,71 \pm 323,19$ pg/mg białka i medianą 557,8 pg/mg białka. We frakcji mononuklearów stężenie NT-4/5 było wykrywalne jedynie w 10 spośród 41 badanych próbek (detekcja 24,4%). Wyniki oznaczeń stężeń beta-NGF, NT-3 i NT-4/5 w surowicy oraz we frakcji mononuklearów krwi obwodowej w grupie badanej przedstawiono w tabeli nr 3.

Dalszą analizę, uwzględniającą ocenę korelacji oraz modele regresji, przeprowadzono w przypadkach, gdy detekcja neurotrofiny w danej frakcji wynosiła co najmniej 80%, a więc dla NT-3 i beta-NGF we frakcji PBMCs. Wartości odstające (ang. outliers) skorygowano za pomocą testu Grubbsa.

Tabela 3

Detekcja neurotrofin przy użyciu metody ELISA w grupie badanej

neurotrofina	mediana	średnia \pm SD	Q1-Q3 (IQR)	min-max	zgodność z rozkładem normalnym	detekcja n (%)
NT-3 zawartość w PBMCs (pg/mg białka)	557,8	590,1 \pm 327,52	339,16- 724,9	55,72-1710,39	tak (p=0,79)	38 (93%)
NT-3 detekcja w surowicy	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	15 (36,6%)
beta-NGF zawartość w PBMCs (pg/mg białka)	1,07	1,26 \pm 0,8	0,65-1,65	0,33-3,74	tak (p=0,34)	41 (100%)

neurotrofina	mediana	średnia±SD	Q1-Q3 (IQR)	min-max	zgodność z rozkładem normalnym	detekcja n (%)
beta-NGF detekcja w surowicy	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	25 (61%)
NT-4/5 detekcja w PBMCs	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	10 (24,4%)
NT-4/5 detekcja w surowicy	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	32 (78,1%)

Wykaz zastosowanych skrótów: n/d – nie dotyczy.

Stwierdzono, że stężenie beta-NGF i NT-3 w lizatach nie zależy od wieku i płci, co przedstawiono w tabelach nr 4 i 5.

Tabela 4

Zależność stężeń neurotrofin w mononuklearach krwi obwodowej od płci w grupie badanej

	Kobiety			mężczyźni			Test t- Studenta
	n	średnia±SD	zgodność z rozkładem normalnym	n	średnia±SD	zgodność z rozkładem normalnym	
NT-3 PBMCs (pg/mg białka)	24	556,72±245,02	tak (p=0,95)	14	647,34±439,89	tak (p=0,78)	p=0,42
betaNGF PBMCs (pg/mg białka)	25	1,38±0,86	tak (p=0,71)	16	1,08±0,67	tak (p=0,70)	p=0,25

Tabela 5

Zależność stężeń neurotrofin w mononuklearach krwi obwodowej od wieku oraz czasu trwania choroby w grupie badanej

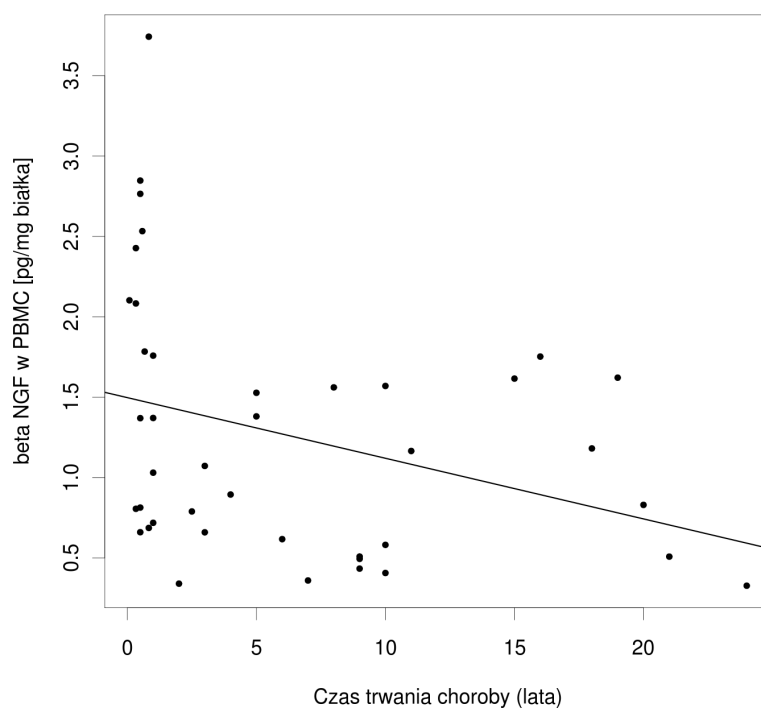
	Wiek				czas trwania choroby			
	Pearson r	p	Spearman r	p	Pearson r	p	Spearman r	p
NT-3 w PBMCs (pg/mg białka)	0,24	0,14	0,25	0,12	0,13	0,43	- 0,10	0,54
beta-NGF w PBMCs (pg/mg białka)	- 0,04	0,82	0,04	0,82	- 0,32	0,04*	- 0,42	0,00*

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem* oraz wytłuszczonym drukiem.

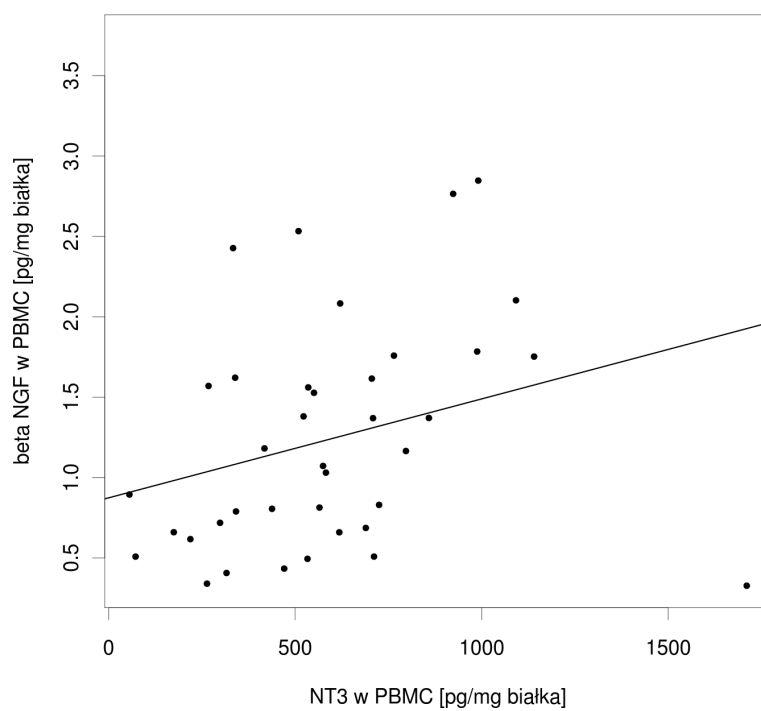
Stężenie NT-3 w mononuklearach nie zależy od czasu trwania choroby, natomiast dla stężenia beta-NGF zaobserwowano istotną statystycznie zależność od czasu trwania choroby (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = - 0,32$, $p = 0,04$; współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = - 0,42$, $p = 0,00$), a więc im dłużej trwa choroba tym niższe stwierdza się stężenie beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej, co przedstawiono w tabeli nr 5. Zależność beta-NGF i czasu trwania choroby zidentyfikowano również w ogólnym modelu regresji liniowej ($R^2 = 0,1$, $p = 0,04$). Na rycinie nr 10 przedstawiono wykres punktowy dla stężenia beta-NGF w mononuklearach oraz czasu trwania choroby, wraz z linią regresji.

Ponadto stwierdzono, że stężenia beta-NGF i NT-3 w lizatach mononuklearów są ze sobą istotnie związane (współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,38$ przy $p = 0,02$). Wykres punktowy stężeń beta-NGF i NT-3 w lizatach PBMCs, wraz z linią regresji, przedstawiono na rycinie nr 11.

Rycina 10: Wykres punktowy dla stężenia beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej oraz czasu trwania choroby, wraz z linią regresji



Rycina 11: Wykres punktowy stężenia beta-NGF i NT-3 w lizatach mononuklearów krwi obwodowej, wraz z linią regresji



5.3. Badania neuroobrazowe

Charakterystyka wyliczonych dla grupy badanej parametrów neuroradiologicznych przedstawiona została w tabeli nr 6.

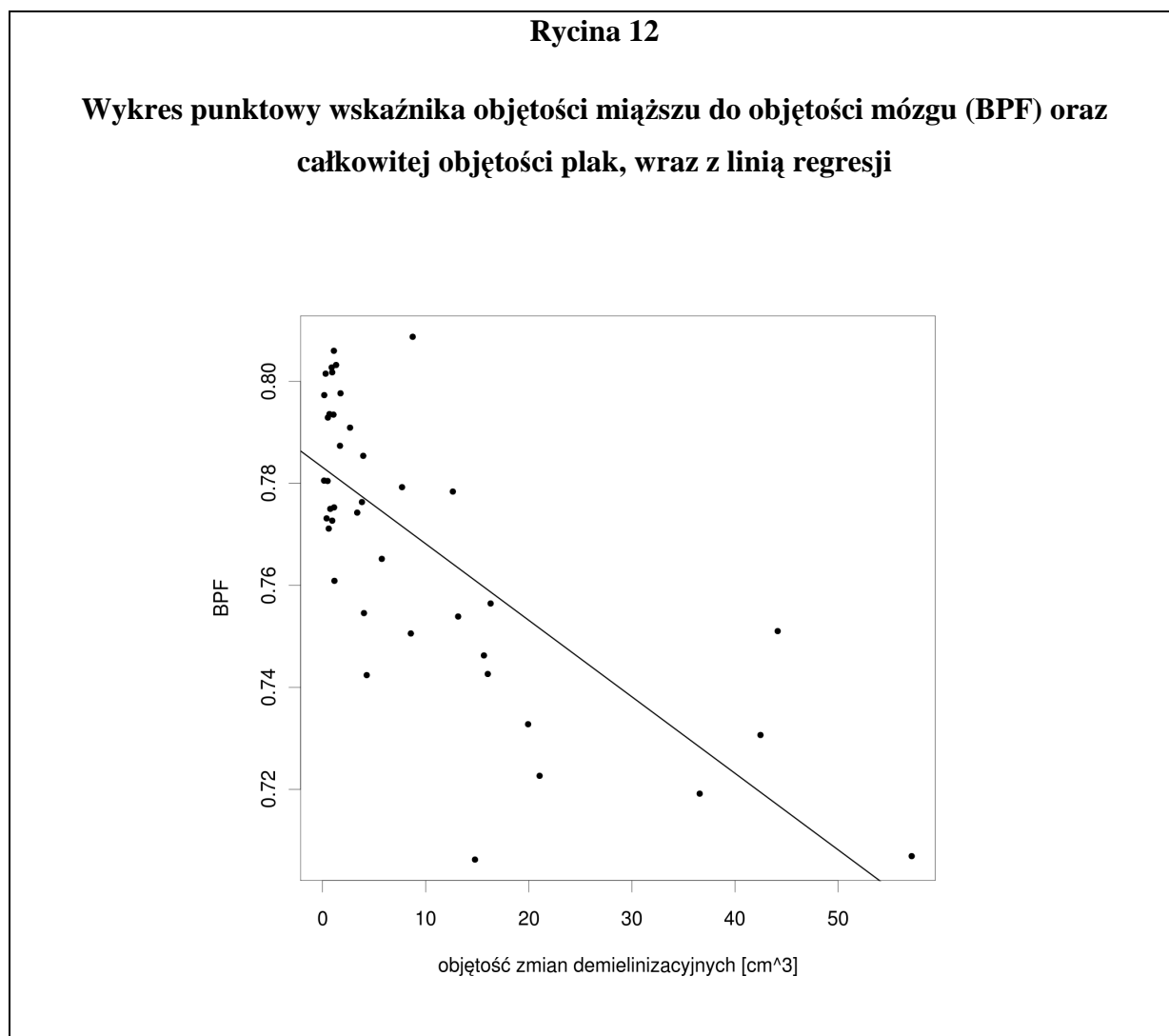
Tabela 6

Parametry strukturalne mózgowia wyliczone na podstawie badania tomografii rezonansu magnetycznego w grupie badanej

parametr	mediana	średnia \pm SD	Q1-Q3 (IQR)	min-max	normal- ność rozkładu
Objętość istoty szarej [cm ³]	588,36	581,32 \pm 77,50	537,03 – 628,90	405,62 – 752,58	tak, p = 0,92
Objętość istoty białej [cm ³]	486,43	486,05 \pm 60,93	432,53 – 520,02	387,34 – 611,69	tak, p = 0,78
Objętość PMR [cm ³]	310,66	318,07 \pm 38,97	291,60 – 343,83	258,26 – 416,57	tak, p = 0,37
Całkowita objętość mózgu [cm ³]	1398,69	1385,44 \pm 139,67	1267,03 – 1480,90	1130,15 – 1692,62	tak, p = 0,86
BPF	0,775	0,77 \pm 0,03	0,751 – 0,793	0,706 – 0,809	tak, p = 0,39
Całkowita objętość płak [cm ³]	3,36	n/d	0,92 – 13,56	0,15 – 57,14	nie, p = 0,01
Pole przekroju ciała modelowanego [mm ²]	617,19	606,63 \pm 134,16	530,08 – 706,64	318,75 – 862,5	tak, p = 0,92

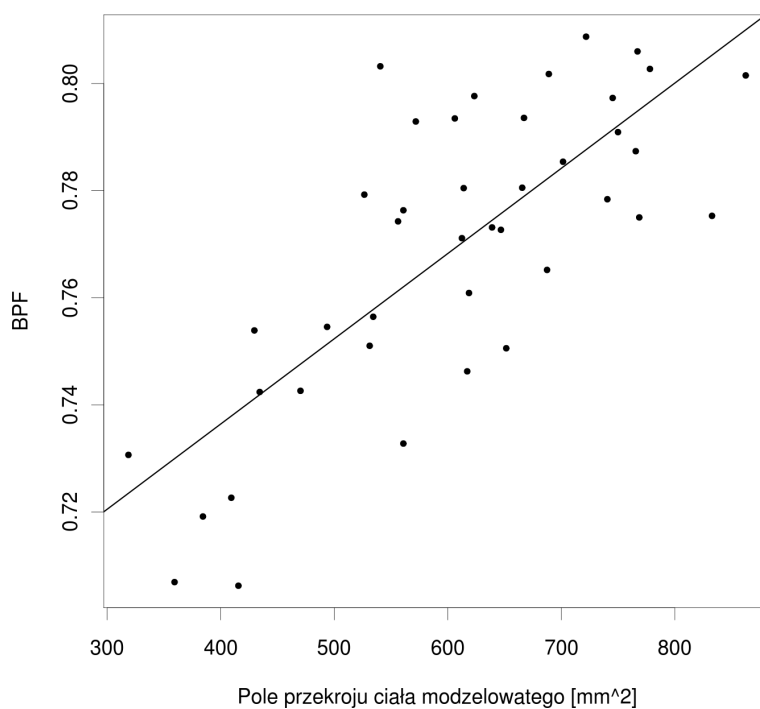
Skróty zastosowane w tabeli: PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy, BPF – wskaźnik objętości miąższu do objętości mózgu.

Ponadto stwierdzono, że BPF i całkowita objętość plak mierzona w cm^3 są ze sobą istotnie negatywnie skorelowane (współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = -0,68$, $p < 0,0001$), co przedstawiono na rycinie nr 12 w formie wykresu punktowego z linią regresji.

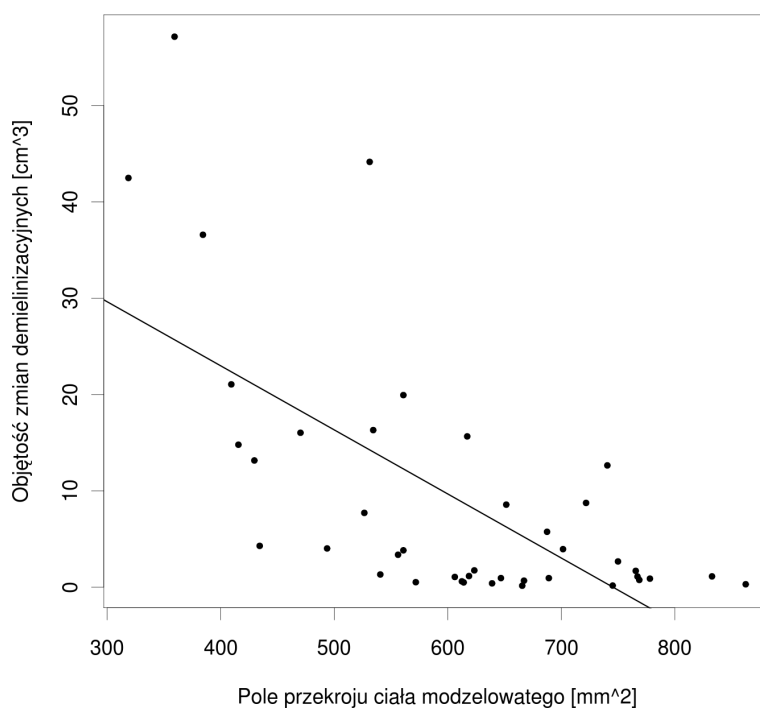


Stwierdzono również bardzo silną dodatnią zależność między polem przekroju ciała modelowatego a wskaźnikiem BPF (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,77$, $p < 0,0001$; współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,71$, $p < 0,0001$), a także silną negatywną korelację między polem przekroju ciała modelowatego a całkowitą objętością plak (współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = -0,63$, $p < 0,0001$), co przedstawiono w postaci wykresów punktowych wraz z linią regresji na rycinach nr 13 i 14.

Rycina 13: Wykres punktowy dla BPF i pola przekroju ciała modelowego, wraz z linią regresji



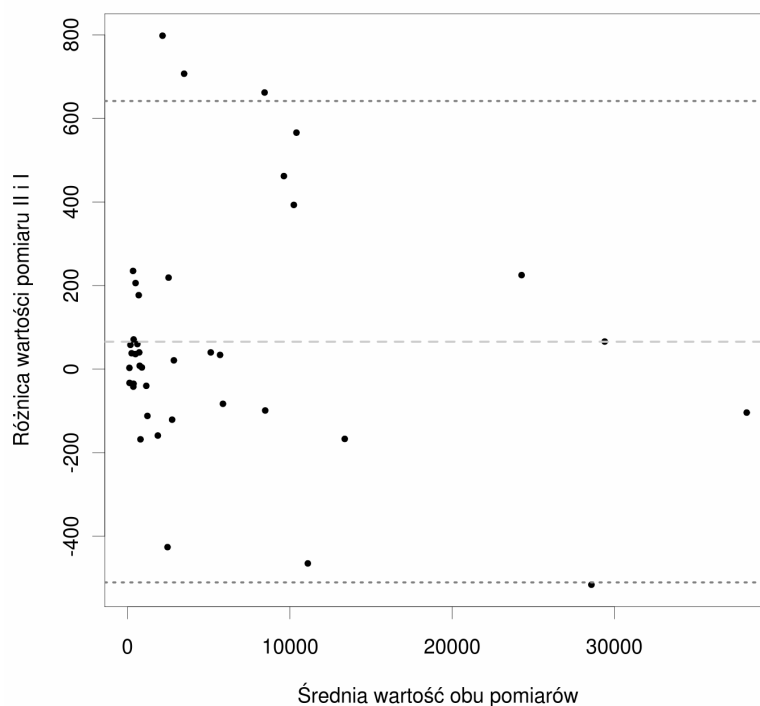
Rycina 14: Wykres punktowy dla całkowitej objętości plak i pola przekroju ciała modelowego, wraz z linią regresji



Zmienność badacza podczas segmentacji uszkodzeń demielinizacyjnych na obrazach FLAIR-SPACE określono za pomocą wewnętrznego współczynnika korelacji, który wyniósł 99,3% ($p < 0,0001$) oraz testu zgodności Blanda-Altmana. W 93% przypadków segmentacji uzyskano zgodność poniżej dwóch odchyłeń standardowych względem rozkładu różnicy pomiarów, co przedstawiono na rycinie nr 15. W analizie statystycznej pod uwagę brano średnią z obydwu pomiarów całkowitej objętości uszkodzeń demielinizacyjnych.

Rycina 15

Wykres zgodności Blanda-Altmana dla dwóch pomiarów objętości uszkodzeń demielinizacyjnych wykonanych przez tego samego badacza



Linie przerywane kropkowe wyznaczają poziom 2 odchyłeń standardowych względem rozkładu różnic pomiędzy dwoma pomiarami. Linia przerywana kreskowa wyznacza średnią różnicę.

5.4. Badania neuropsychologiczne

Wyniki poszczególnych testów neuropsychologicznych przeprowadzonych w grupie badanej przedstawiono w tabeli nr 7. Wyniki uzyskane przez pacjentów w teście na czas reakcji prostej przedstawiono w tabeli nr 8.

Tabela 7

Statystyka opisowa wyników poszczególnych testów neuropsychologicznych

	Mediana	średnia±SD	Q1-Q3 (IQR)	min-max	normalność rozkładu
test spontanicznego tworzenia grup słów	20	n/d	17-23	12-31	Tak, p=0,95
test zapamiętywania listy słów	5	n/d	4-6	2-11	Tak, p=0,11
test rozpoznawania obrazu	Liczba pacjentów, którzy odpowiedzieli poprawnie n= 20 (49%) Liczba pacjentów, którzy odpowiedzieli błędnie n= 21 (51%)				
TMT-A [ms]	27800	37341±28202	21605-46992	12000-153680	Tak, p=0,11
TMT-B [ms]	66830	n/d	44595-91155	35350-426130	Nie, p=0,005
test powtarzania cyfr wprost – wersja wzrokowa	7	n/d	6-9	4-12	Tak, p=0,14
test powtarzania cyfr – wersja słuchowa	6	n/d	5-7	5-10	Tak, p=0,07
Test zapamiętywania szczegółów	7	n/d	4-8	1-8	Nie, p=0,04
Test Matrycy Ravena w Wersji Kolorowej (wynik sumaryczny)	33	32±4	30-35	20-36	Tak, p=0,11

Skróty zastosowane w tabeli: n/d – nie dotyczy.

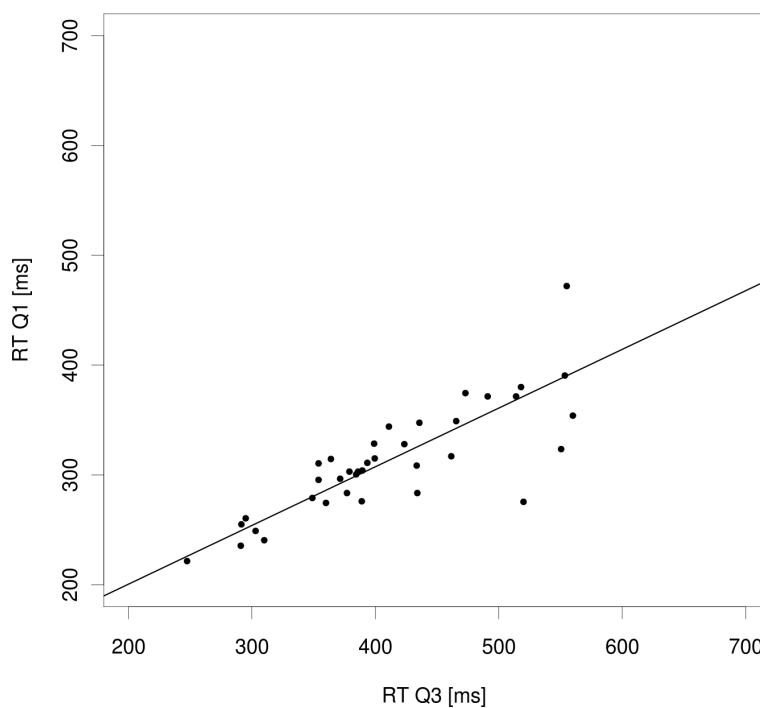
Tabela 8

Wyniki w teście oceniającym czas reakcji prostej w grupie badanej

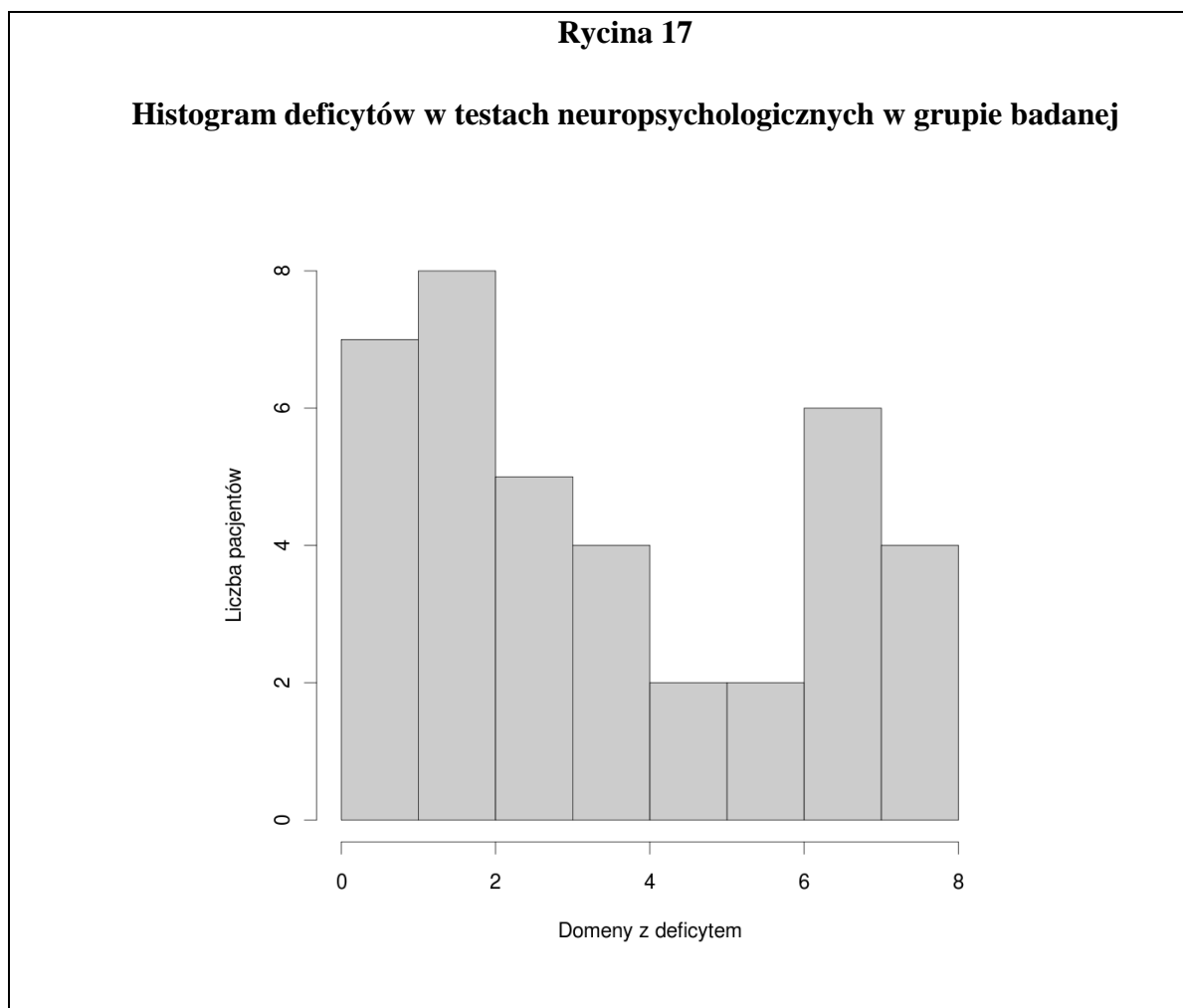
[ms]	mediana	średnia±SD	Q1-Q3 (IQR)	min-max	Zgodność z rozkładem normalnym
RT min	85	101,18±53,22	69,5-125	26-244,5	tak (p=0,16)
RT Q1	309.5	317,29±58,84	279-347,5	221,5-509,5	tak (p=0,46)
RT mediana	339.5	357,79±74,98	314-397	231-636	tak (p=0,45)
RT Q3	396.25	418,47±95,39	360-473	247,5-714,5	tak (p=0,50)
IQR	264	257,82±55,93	237-284	94-412	tak (p=0,48)

W grupie badanej stwierdzono stosunkowo niską wartość współczynnika korelacji pomiędzy Q1 a Q3 RT ($r = 0,87$ przy $p < 0,0001$), co przedstawiono na rycinie nr 16.

Rycina 16: Wykres punktowy RT Q1 [ms] oraz RT Q3 [ms] w grupie pacjentów ze stwardnieniem rozsianym



Na rycinie nr 17 przedstawiono w postaci histogramu zestawienie pacjentów pod względem liczby testów neuropsychologicznych, w których osiągnęli oni wynik gorszy niż mediana grupy dla danego testu, co przyjęto za definicję deficytu poznawczego w domenie neuropsychologicznej owego testu.



Ponadto stwierdzono, że łączny deficyt w domenach neuropsychologicznych istotnie koreluje z rozkładem parametrów testu RT w obrębie badanej grupy: z medianą oraz trzecim kwartylem, a także z wynikami następujących testów: spontanicznego tworzenia grup słów, zapamiętywania listy słów, łączenia punktów w wersji A i B, powtarzania cyfr wprost w wersji wzrokowej, powtarzania cyfr w wersji słuchowej, zapamiętywania szczegółów oraz Testu Matrycy Ravena w wersji kolorowej. W tabeli nr 9 przedstawiono macierze korelacji dla wyników poszczególnych testów i łącznego deficytu neuropsychologicznego.

Tabela 9

Macierze korelacji dla wyników poszczególnych testów neuropsychologicznych i łącznego deficytu poznawczego

	Łączny deficyt poznawczy (suma)			
	Pearson r	p	Spearman r	p
RT min	0,29	0,08	0,27	0,09
RT Q1	0,31	0,06	0,26	0,12
RT mediana	0,33	0,05*	0,28	0,08
RT Q3	0,35	0,03*	0,3	0,07
RT IQR	0,17	0,32	0,24	0,14
test spontanicznego tworzenia grup słów	- 0,66	<0,0001*	- 0,65	<0,0001*
test zapamiętywania listy słów	- 0,56	0,0002*	- 0,58	0,0001*
test łączenia punktów – część A	0,61	<0,0001*	0,74	<0,0001*
test łączenia punktów – część B	n/d	n/d	0,83	<0,0001*
test powtarzania cyfr wprost – wersja wzrokowa	- 0,72	<0,0001*	- 0,76	<0,0001*
test powtarzania cyfr – wersja słuchowa	- 0,56	0,0002*	- 0,58	0,0001*
test zapamiętywania szczegółów	n/d	n/d	- 0,77	<0,0001*
Test Matryc Ravena w Wersji Kolorowej	- 0,68	<0,0001	- 0,69	<0,0001*

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem * oraz wytłuszczonym drukiem.

W modelu regresji krokowej wyjaśniającym łączny deficyt neuropsychologiczny istotne statystycznie znaczenie uzyskały natomiast jedynie następujące testy: powtarzania cyfr wprost w wersji wzrokowej, spontanicznego tworzenia grup słów, zapamiętywania szczegółów oraz zapamiętywania listy słów, co przedstawiono w tabeli nr 10. Model ów opisuje wskaźnik $R^2 = 0,84$ ($p < 0,001$). Wykresy punktowe wyników wybranych testów neuropsychologicznych oraz sumy deficytów poznawczych, wraz z linią regresji, przedstawiono na rycinach nr 18-23.

Tabela 10

Model regresji krokowej dla łącznego deficytu poznawczego jako zmiennej zależnej oraz dla wybranych zmiennych niezależnych

Zmienna zależna	Łączny deficyt poznawczy
Metoda	Regresja krokowa
Kwalifikacja zmiennej jeśli $p <$	0,05
Wyłączenie zmiennej jeśli $p >$	0,1
Liczba pacjentów (n)	38
Współczynnik R^2	0,84
Skorygowany współczynnik R^2	0,82
Poziom istotności	$p < 0,001^*$

Równanie regresji

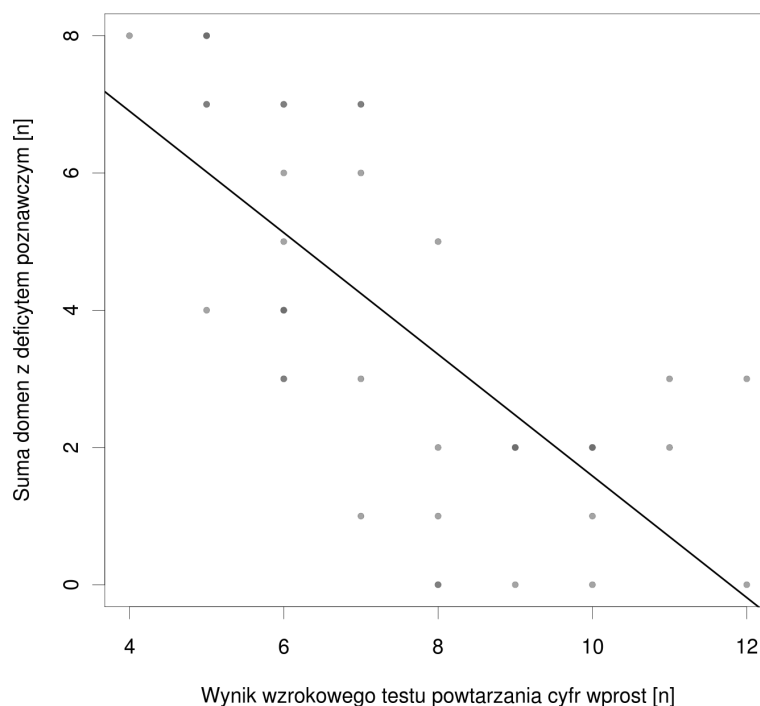
Zmienne niezależne	Współczynnik β	Błąd standardowy	Wartość T	Wartość p
stała równania regresji	14,9282			
test zapamiętywania szczegółów	- 0,3502	0,1121	- 3,123	0,0037*
test powtarzania cyfr wprost w wersji wzrokowej	- 0,5452	0,1031	- 5,290	<0,0001*
test spontanicznego tworzenia grup słów	- 0,1796	0,05256	- 3,417	0,0017*
test zapamiętywania listy słów	- 0,2353	0,1033	- 2,278	0,0293*

Zmienne wyłączone z modelu	Wartość współczynnika r
test powtarzania cyfr – wersja słuchowa	- 0,5620
RT Q3	0,3502
Test Matryc Ravena w wersji kolorowej	- 0,6808
TMT A	0,6209
TMT B	0,6568

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem * oraz wytłuszczonym drukiem.

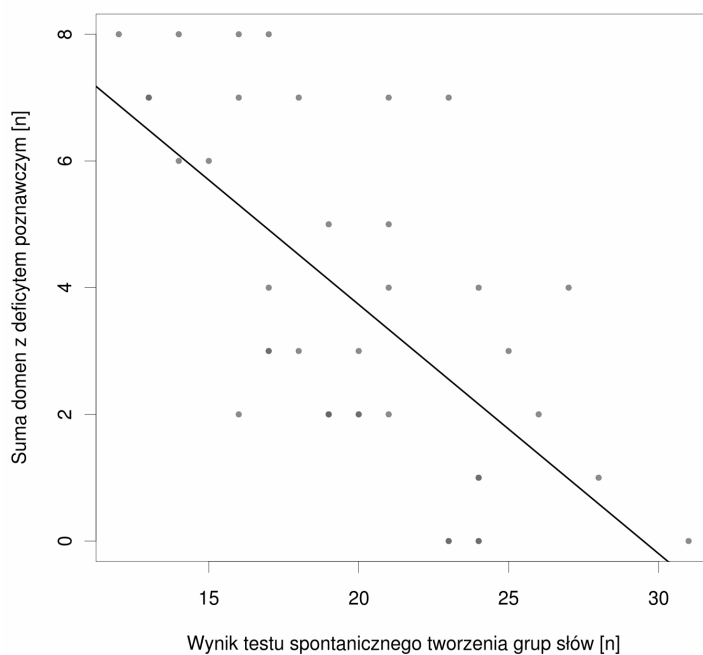
Rycina 18

Wykres punktowy liczby domen z deficytami poznawczymi (n) i wyniku testu wzrokowego powtarzania cyfr wprost (n) w grupie pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, wraz z linią regresji



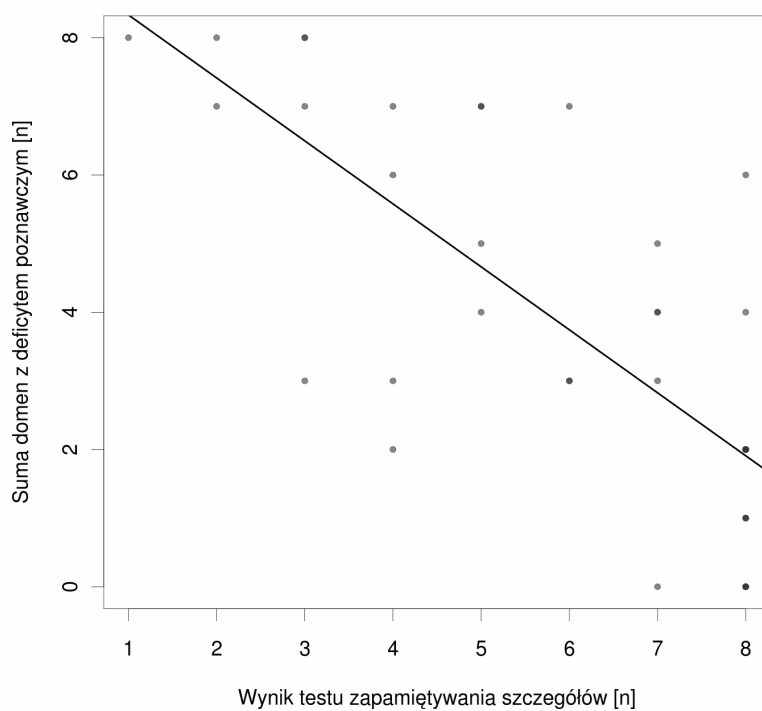
Intensywność skali szarości jest proporcjonalna do liczby pacjentów, którzy uzyskali dany wynik.

Rycina 19: Wykres punktowy liczby domen z deficytami poznawczymi (n) i wyniku testu spontanicznego tworzenia grup słów (n) w grupie pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, wraz z linią regresji



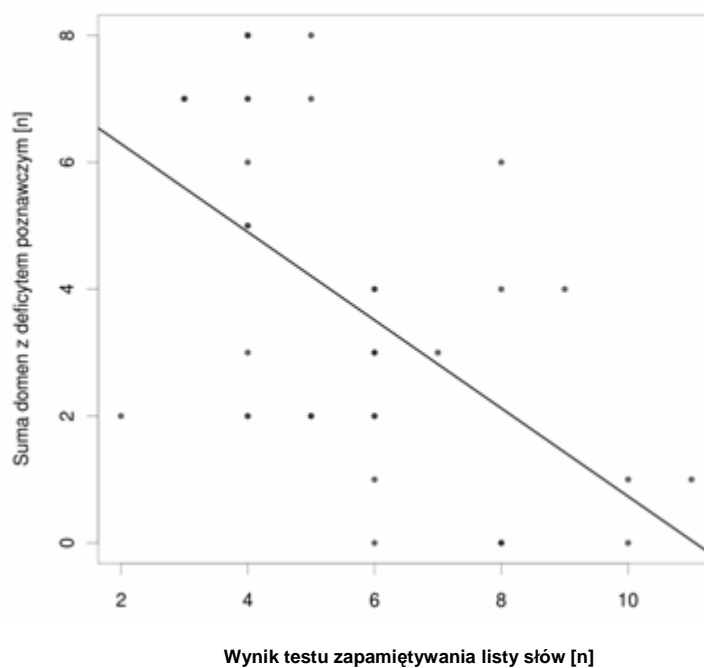
Intensywność skali szarości jest proporcjonalna do liczby pacjentów, którzy uzyskali dany wynik.

Rycina 20: Wykres punktowy liczby domen z deficytami poznawczymi (n) i wyniku testu zapamiętywania szczegółów (n) w grupie pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, wraz z linią regresji



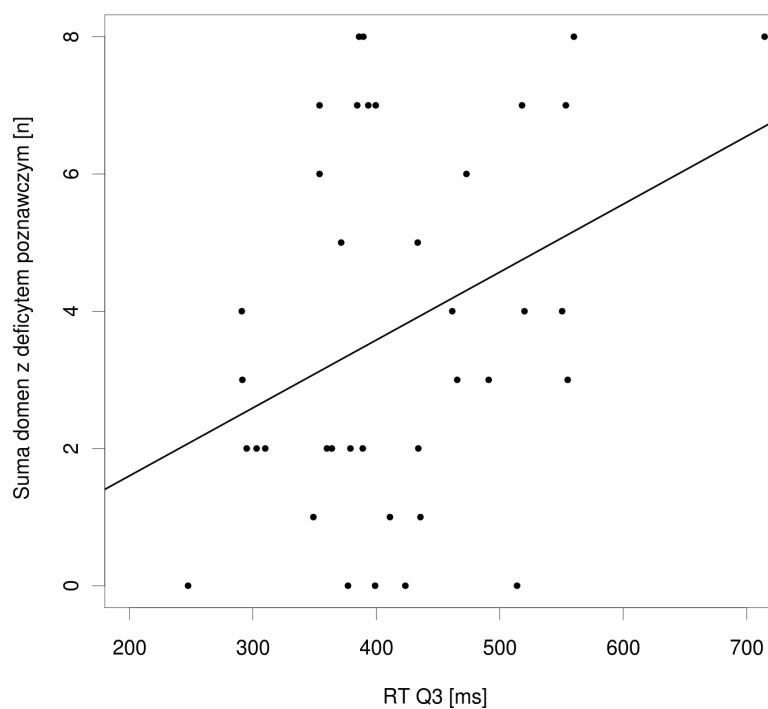
Intensywność skali szarości jest proporcjonalna do liczby pacjentów, którzy uzyskali dany wynik.

Rycina 21: Wykres punktowy liczby domen z deficytami poznawczymi (n) i wyniku testu zapamiętywania listy słów (n) w grupie pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, wraz z linią regresji



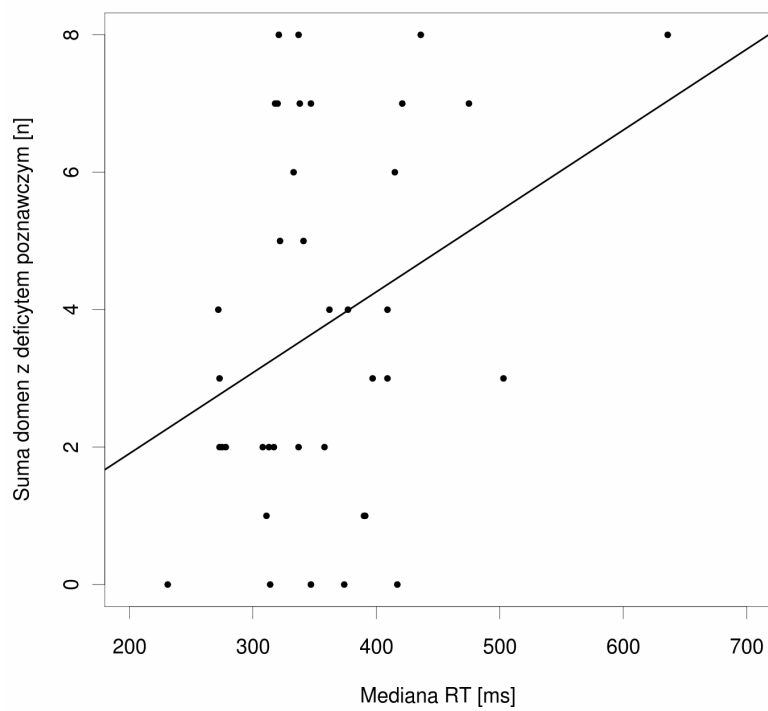
Intensywność skali szarości jest proporcjonalna do liczby pacjentów, którzy uzyskali dany wynik.

Rycina 22: Wykres punktowy liczby domen z deficytami poznawczymi (n) i RT Q3 [ms] w grupie pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, wraz z linią regresji



Rycina 23

Wykres punktowy liczby domen z deficytami poznawczymi (n) i mediany RT (ms) w grupie pacjentów z ze stwardnieniem rozsianym, wraz z linią regresji



5.5. Zależność między parametrami uszkodzenia OUN mierzonymi za pomocą ilościowych badań rezonansu magnetycznego a ekspresją beta-NGF i NT-3 w komórkach układu immunologicznego

5.5.1. Neurotrofina 3

a) Stwierdzono obecność istotnej statystycznie zależności pomiędzy wskaźnikiem objętości mięszu do objętości mózgu (BPF) a stężeniem NT-3 we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. Dla powyższej zależności współczynnik korelacji liniowej Pearsona wynosi $r = 0,37$, przy $p = 0,02$, a współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,42$ przy $p = 0,01$. Wykres punktowy dla BPF i stężenia NT-3 w lizatach mononuklearów krwi obwodowej przedstawiono na rycinie nr 24. Powyższą zależność zidentyfikowano również w ogólnym modelu regresji liniowej, obejmującym zmienne według modelu przedstawionego w tabeli nr 11, o wskaźniku $R^2 = 0,19$ ($p = 0,02$).

Rycina 24

Wykres punktowy dla BPF i stężenia NT-3 w mononuklearach krwi obwodowej

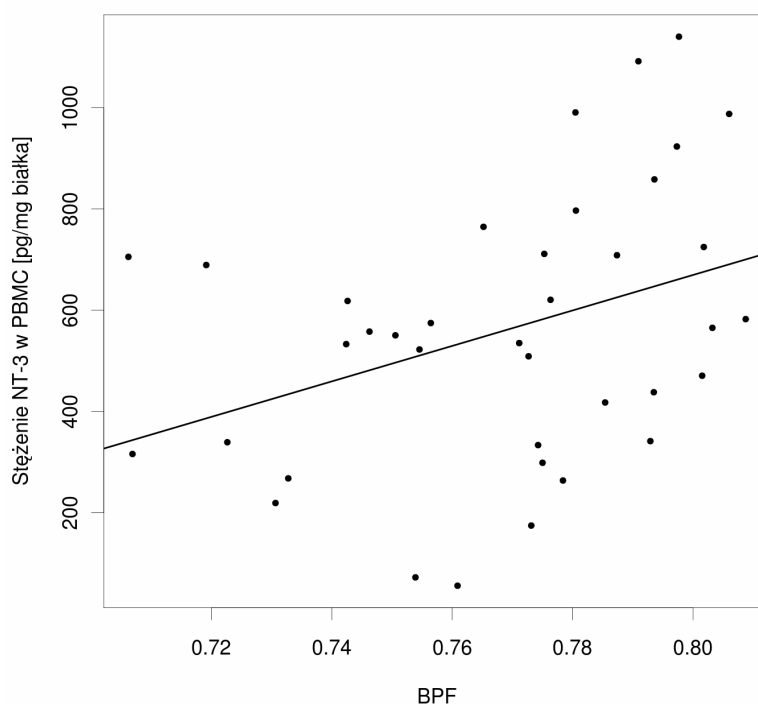


Tabela 11

Ogólny model regresji liniowej dla zmiennej zależnej BPF i wybranych zmiennych niezależnych

Zmienna zależna: BPF				
Zmienne niezależne	współczynnik β	błąd standardowy	wartość T	wartość p
stała równania regresji	0,770	0,017	45,905	< 0,000*
stężenie NT-3 w PBMCs [pg/mg białka]	0,00004	0,00002	2,267	0,03*
wiek [lata]	- 0,00058	0,0004	- 1,515	0,14
$R^2 = 0,19$ $p = 0,02$				

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem* oraz wytłuszczonym drukiem.

W modelu regresji wielorakiej, przy uwzględnieniu całkowitej liczby zmian demielinizacyjnych w mózgowiu jako dodatkowej zmiennej, bardzo silna zależność między BPF a liczbą uszkodzeń powoduje, że wpływ stężenia NT-3 w mononuklearach przestaje mieć w owym modelu istotne znaczenie, co przedstawiono w tabeli nr 12. Model ów opisuje wskaźnik $R^2 = 0,61$ ($p < 0,001$).

Tabela 12

Model regresji wielorakiej dla zmiennej zależnej BPF i wybranych zmiennych niezależnych

Zmienne niezależne	Współczynnik β	błąd standardowy	wartość T	wartość p
stała równania regresji	0,794	0,012	66,171	< 0,000*
stężenie NT-3 w PBMCs [pg/mg białka]	0,00002	0,00001	1,303	0,20
wiek [lata]	- 0,00058	0,0003	- 2,105	0,04*
całkowita objętość płak [cm ³]	- 0,000002	< 0,0000	- 6,040	< 0,000*
R² = 0,61 p < 0,001				

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem* oraz wytłuszczonym drukiem.

b) Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem NT-3 w mononuklearach a całkowitą objętością płak w mózgowiu (współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = -0,21$ przy $p = 0,20$).

c) Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem NT-3 w mononuklearach a objętością istoty szarej mózgowia (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,22$ przy $p = 0,18$, współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,25$ przy $p = 0,12$).

d) Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem NT-3 w mononuklearach a całkowitą objętością mózgowia (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,18$ przy $p = 0,28$, współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,19$ przy $p = 0,25$).

e) Stwierdzono obecność istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem NT-3 w mononuklearach a polem przekroju ciała modzelowatego (współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,32$, $p = 0,05$; współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,28$, $p = 0,08$). Na rycinie nr 25 przedstawiono wykres punktowy dla NT-3 w mononuklearach i pola przekroju ciała modzelowatego, wraz z linią regresji. Zależności tej nie potwierdzono w ogólnym modelu regresji liniowej ($R^2 = 0,08$, $p = 0,08$), który przedstawiono w tabeli nr 13.

Rycina 25

Wykres punktowy dla stężenia NT-3 w mononuklearach krwi obwodowej i pola przekroju ciała modzelowatego, wraz z linią regresji

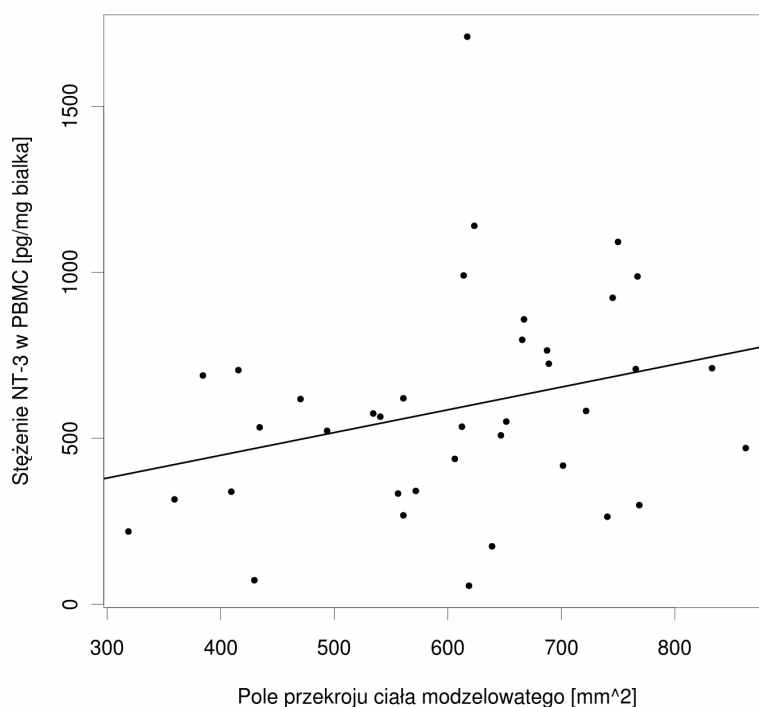


Tabela 13

Ogólny model regresji liniowej dla zmiennej zależnej w postaci pola przekroju ciała modelowatego i wybranych zmiennych niezależnych (stężenie NT-3 w mononuklearach)

Zmienna zależna: pole przekroju ciała modelowatego [mm ²]				
	Współczynnik β	błąd standardowy	wartość T	wartość <i>p</i>
stała równania regresji	174,70	239,99	0,728	0,47
stężenie NT-3 w PBMCs [pg/mg białka]	0,68	0,3866	1,77	0,08
$R^2 = 0,08$, $p = 0,08$				

W modelu regresji krokowej z polem przekroju ciała modelowatego jako zmienną zależną, uwzględniającym jako zmienne niezależne stężenie NT-3 w mononuklearach, a także BPF, wiek, czas trwania choroby oraz całkowitą objętość plak, jedynie związek z BPF okazał się istotny statystycznie. Model ów opisuje wysoki współczynnik $R^2 = 0,59$ przy $p < 0,0001$, a przedstawiono go w tabeli nr 14.

Tabela 14

Model regresji krokowej dla zmiennej zależnej w postaci pola przekroju ciała modelowanego i wybranych zmiennych niezależnych

Zmienna zależna	Pole przekroju ciała modelowanego (mm ²)
Metoda	Regresja krokowa
Kwalifikacja zmiennej jeśli p<	0,05
Wyłączenie zmiennej jeśli p>	0,1
Liczba pacjentów (n)	38
Współczynnik R ²	0,5864
Skorygowany współczynnik R ²	0,5749
Poziom istotności	< 0,0001*

Równanie regresji

Zmienne niezależne	Współczynnik β	Błąd standardowy	Wartość T	Wartość p
stała równania regresji	- 2221,7436			
BPF	3679,2041	514,9768	7,144	< 0,001*

Zmienne wyłączone z modelu	Wartość współczynnika r
wiek [lata]	- 0,1135
czas trwania choroby [lata]	- 0,2199
NT-3 w PBMCs [pg/mg białka]	0,3354
całkowita objętość plak [cm ³]	- 0,6858

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem* oraz wytłuszczonym drukiem.

5.5.2. beta-NGF

a) Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem beta-NGF w mononuklearach a wskaźnikiem BPF (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,17$ przy $p = 0,28$, współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,17$ przy $p = 0,29$).

W modelu regresji wielokrotnej obejmującym zmienne przedstawione w tabeli nr 15 R^2 wyniosło 0,1, nie osiągając krytycznej wartości istotności statystycznej ($p = 0,26$).

Tabela 15

Model regresji krokowej dla zmiennej zależnej BPF i wybranych zmiennych niezależnych.

Zmienna zależna: BPF				
	Współczynnik β	błąd standardowy	wartość T	wartość p
stała równania regresji	0,774	0,017	44,480	< 0,001*
stężenie beta-NGF w PBMCs [pg/mg białka]	0,002870	0,0058	0,493	0,62
wiek [lata]	- 0,000025	0,0005	0,054	0,96
czas trwania choroby [lata]	- 0,001116	0,0008	1,392	0,17

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem* oraz wytłuszczonym drukiem.

b) Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem beta-NGF w mononuklearach a całkowitą objętością płak (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = - 0,29$ przy $p = 0,06$; współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = - 0,19$ przy $p = 0,22$).

c) Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem beta-NGF w mononuklearach a objętością istoty szarej mózgowia (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,02$, $p = 0,9$; współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,06$, $p = 0,73$).

d) Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem beta-NGF w mononuklearach a całkowitą objętością mózgowia (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = - 0,09$, $p = 0,59$; współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,01$, $p = 0,98$).

e) Nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem beta-NGF w mononuklearach a polem przekroju ciała modzelowatego (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,05$, $p = 0,74$; współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,04$, $p = 0,8$).

5.6. Zależność między nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych u pacjentów z RRMS a ekspresją beta-NGF i NT-3 w komórkach układu immunologicznego

5.6.1. Neurotrofina 3

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności między stężeniem NT-3 w mononuklearach krwi obwodowej a wynikami zastosowanych testów neuropsychologicznych, co przedstawiono w tabeli nr 16.

5.6.2. beta-NGF

a) Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności między stężeniem beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej a wynikami następujących testów neuropsychologicznych: TMT-A, TMT-B, test powtarzania cyfr wspak – wersja wzrokowa, test powtarzania cyfr – wersja słuchowa, test zapamiętywania szczegółów, Test Matryc Ravena w Wersji Kolorowej. Statystykę opisową owych zależności przedstawiono w tabeli nr 16.

Tabela 16

Zależność między stężeniem badanych neurotrofin a wynikami poszczególnych testów neuropsychologicznych

	NT-3 PBMCs (pg/mg białka)		beta-NGF PBMCs (pg/mg białka)	
	Pearson r (p)	Spearman r (p)	Pearson r (p)	Spearman r (p)
test spontanicznego tworzenia grup słów	r = 0,09 p = 0,60	r = 0,15 p = 0,38	r = 0,37 p = 0,02*	r = 0,33 p = 0,04*
test zapamiętywania listy słów	r = - 0,16 p = 0,34	r = - 0,13 p = 0,44	r = 0,40 p = 0,00*	r = 0,27 p = 0,08*
TMT-A [ms]	r = - 0,17 p = 0,30	r = - 0,08 p = 0,65	r = - 0,12 p = 0,45	r = - 0,17 p = 0,27
TMT-B [ms]	ND	r = - 0,03 p = 0,85	ND	r = - 0,16 p = 0,31
test powtarzania cyfr wprost – wersja wzrokowa	r = 0,06 p = 0,71	r = 0,07 p = 0,65	r = 0,15 p = 0,33	r = 0,05 p = 0,76
test powtarzania cyfr – wersja słuchowa	r = 0,04 p = 0,80	r = 0,07 p = 0,69	r = 0,08 p = 0,59	r = -0,06 p = 0,72
Test zapamiętywania szczegółów	ND	r = 0,12 p = 0,48	r = 0,25 p = 0,11	r = 0,24 p = 0,14
Test Matryc Ravena w Wersji Kolorowej (wynik sumaryczny)	r = 0,21 p = 0,20	r = 0,17 p = 0,30	r = 0,19 p = 0,23	r = 0,23 p = 0,15
RT Q1	r = 0,73 p = 0,67	r = 0,11 p = 0,51	r = 0,02 p = 0,89	r = 0,15 p = 0,37
RT mediana	r = 0,04 p = 0,81	r = 0,12 p = 0,49	r = 0,05 p = 0,75	r = 0,17 p = 0,31

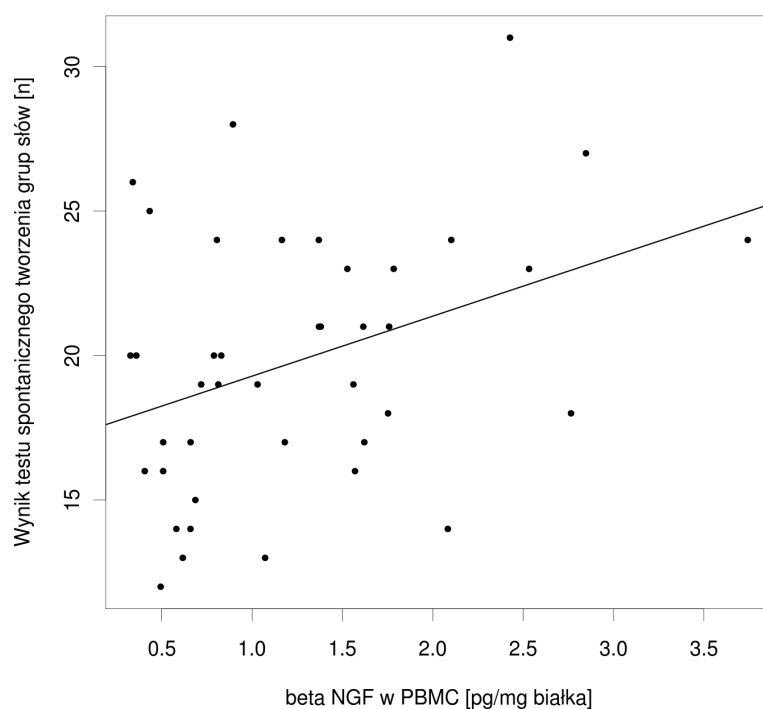
	NT-3 PBMCs (pg/mg białka)		beta-NGF PBMCs (pg/mg białka)	
	Pearson r (p)	Spearman r (p)	Pearson r (p)	Spearman r (p)
RT IQR	r = 0,24 p = 0,16	r = 0,34 p = 0,04*	r = 0,08 p = 0,64	r = 0,17 p = 0,3
RT Q3	r = 0,00 p = 0,98	r = 0,05 p = 0,75	r = - 0,01 p = 0,94	r = 0,11 p = 0,52

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem* oraz wytłuszczonym drukiem.

b) Stwierdzono istotną statystycznie zależność między stężeniem beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej a wynikiem testu spontanicznego tworzenia grup słów. Dla powyższej zależności współczynnik korelacji liniowej Pearsona wynosi $r = 0,37$, przy $p = 0,02$, a współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,33$ przy $p = 0,04$. Powyższą zależność zidentyfikowano także w ogólnym modelu regresji liniowej o współczynniku $R^2 = 0,14$ przy $p = 0,02$. Wykres punktowy dla wyniku testu spontanicznego tworzenia grup słów (WLG max) i stężenia beta-NGF w lizatach mononuklearów krwi obwodowej przedstawiono na rycinie nr 26.

Rycina 26

Wykres punktowy dla wyniku testu spontanicznego tworzenia grup słów oraz stężenia beta-NGF w liszatkach mononuklearów krwi obwodowej, wraz z linią regresji



Zależność powyższa nie osiągnęła istotności statystycznej w modelu regresji krokowej, uwzględniającym takie zmienne jak stężenie betaNGF w mononuklearach, wiek, czas trwania choroby, poziom wykształcenia, BPF oraz całkowita objętość plak. Model ów przedstawiono w tabeli nr 17.

Tabela 17

Model regresji krokowej dla zmiennej zależnej WLG_max (wynik testu spontanicznego tworzenia grup słów) i wybranych zmiennych niezależnych

Zmienna zależna	WLG max
Metoda	Regresja krokowa
Kwalifikacja zmiennej jeśli $p <$	0,05
Wyłączenie zmiennej jeśli $p >$	0,1
Liczba pacjentów (n)	41
Współczynnik R^2	0,3481
Skorygowany współczynnik R^2	0,3138
Poziom istotności	$p < 0,001^*$

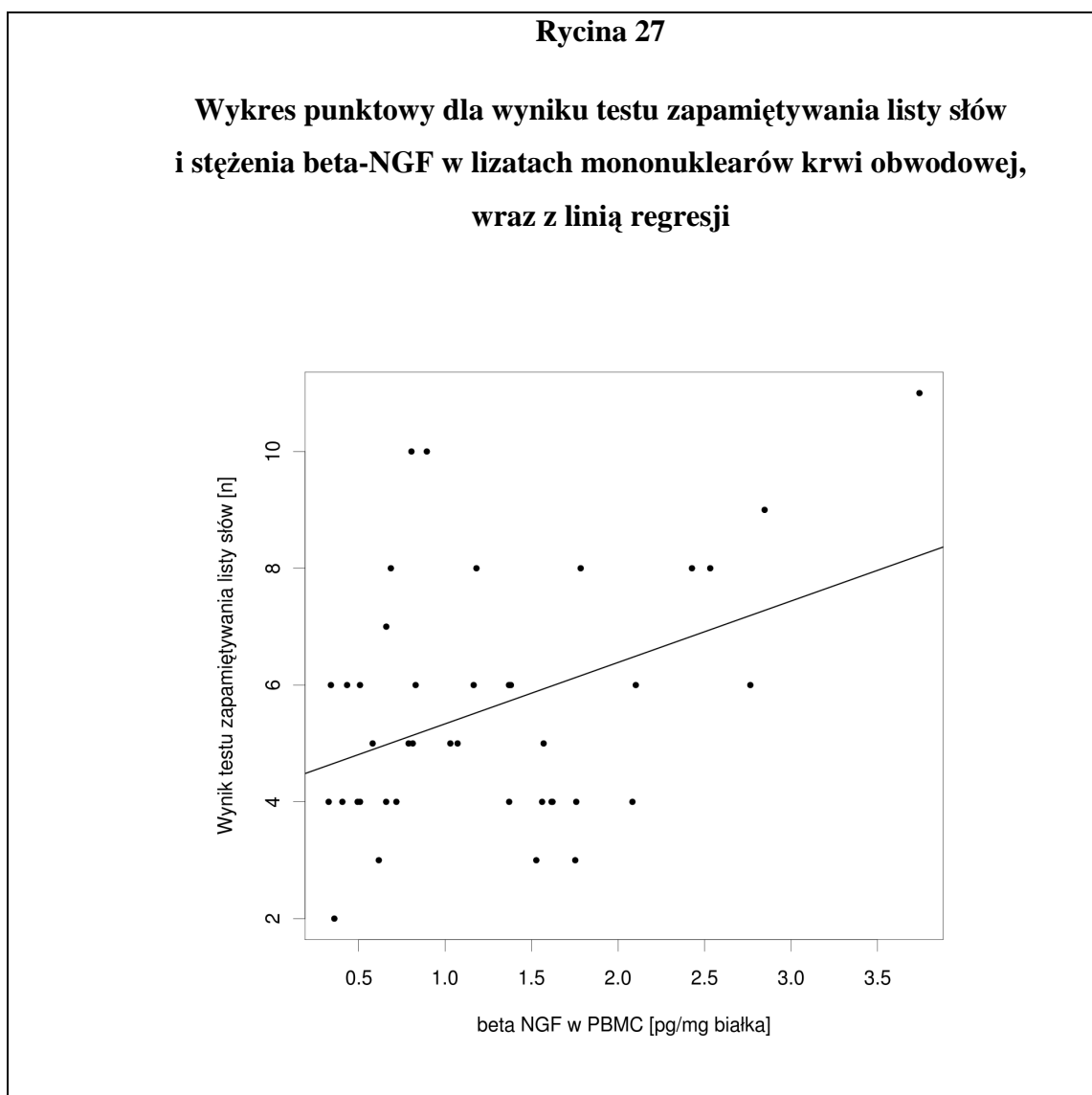
Równanie regresji

Zmienne niezależne	Współczynnik β	Błąd standardowy	T	p
stała równania regresji	15,4662			
czas trwania choroby [lata]	0,4245	0,1964	2,162	0,0370*
całkowita objętość plak [cm ³]	-0,1193	0,03934	-3,033	0,0043*

Zmienne wyłączone z modelu	R
beta NGF w PBMCs [pg/mg białka]	0,3720
BPF	0,4043
czas trwania choroby [lata]	-0,2729
wiek [lata]	-0,2621

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem* oraz wytłuszczonym drukiem.

- c) Stwierdzono istotną statystycznie zależność między stężeniem beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej a wynikiem testu zapamiętywania listy słów. Dla powyższej zależności współczynnik korelacji liniowej Pearsona wynosi $r = 0,37$, przy $p = 0,02$, a współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = 0,33$ przy $p = 0,04$. Powyższą zależność zidentyfikowano również w ogólnym modelu regresji liniowej o współczynniku $R^2 = 0,16$ przy $p = 0,01$. Wykres punktowy dla wyniku testu zapamiętywania listy słów i stężenia beta-NGF w lizatach mononuklearów krwi obwodowej przedstawiono na rycinie 27.



Mimo iż wynik testu zapamiętywania listy słów zależy także od poziomu edukacji (współczynnik korelacji Spearmana 0,40 przy $p < 0,00$), w modelu regresji krokowej ów silny związek traci znaczenie, natomiast zależność od stężenia beta-NGF utrzymuje istotność statystyczną, co przedstawiono w tabeli nr 18.

Tabela 18

Model regresji krokowej dla zmiennej zależnej wlg (wynik testu zapamiętywania listy słów) i wybranych zmiennych niezależnych

Zmienna zależna	Wynik testu zapamiętywania listy słów
Metoda	Regresja krokowa
Kwalifikacja zmiennej jeśli $p <$	0,05
Wyłączenie zmiennej jeśli $p >$	0,1
Liczba pacjentów (n)	41
Współczynnik determinacji R^2	0,4485
Skorygowany współczynnik R^2	0,4194
Poziom istotności	$p < 0,001^*$

Równanie regresji

Zmienne niezależne	Współczynnik β	Błąd standardowy	T	p
stała równania regresji	8,2673			
beta NGF w PBMCs [pg/mg białka]	0,9987	0,3179	3,141	0,0033*
wiek [lata]	-0,09986	0,02236	-4,466	0,0001*

Zmienne wyłączone z modelu	R
beta NGF w PBMCs [pg/mg białka]	0,3988
liczba lat edukacji	0,3629
wiek [lata]	-0,5525
BPF	0,2147
całkowita objętość plak [cm ³]	-0,2299

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem * oraz wytłuszczonym drukiem.

5.7. Zależność między nasileniem zaburzeń funkcji poznawczych a parametrami uszkodzenia OUN w badaniach obrazowych

Wyniki większości testów neuropsychologicznych, z wyjątkiem testu zapamiętywania listy słów oraz parametrów rozkładu wyników w teście RT, są istotnie związane zarówno z BPF, jak i z całkowitą objętością zmian demielinizacyjnych, jak i z polem przekroju ciała modzelowatego. Charakterystykę owych zależności przedstawiono w tabeli nr 19.

Tabela 19

Zależność między wynikami poszczególnych testów neuropsychologicznych a wybranymi neuroradiologicznymi parametrami uszkodzenia OUN

	BPF		całkowita objętość plak (cm ³)		pole przekroju ciała modzelowatego (mm ²)	
	Pearson r (p)	Spearman r (p)	Pearson r (p)	Spearman r (p)	Pearson r (p)	Spearman r (p)
test spontanicznego tworzenia grup słów	r=0,40 p=0,008*	r=0,42 p=0,006*	ND	r= -0,49 p= 0,001*	r=0,45 p=0,003*	r=0,45 p=0,003*
test zapamiętywania listy słów	r=0,21 p=0,18	r=0,25 p=0,12	ND	r= -0,25 p=0,11	r=0,07 p=0,66	r=0,09 p=0,59
TMT-A [ms]	r=-0,61 p<0,0001*	r=-0,67 p<0,0001*	ND	r= 0,43 p=0,0052*	r=-0,59 p=0,0001*	r=-0,53 p=0,0003*
TMT-B [ms]	ND	r=-0,62 p<0,0001*	ND	r= 0,58 p= 0,0001*	ND	r=-0,59 p<0,0001*
test powtarzania cyfr wprost – wersja wzrokowa	r=0,58 p=0,0001*	r=0,59 p<0,0001*	ND	r= -0,46 p= 0,003*	r=0,50 p=0,0008*	r=0,48 p=0,0014*

	BPF		całkowita objętość płak (cm ³)		pole przekroju ciała modelowego (mm ²)	
	Pearson r (p)	Spearman r (p)	Pearson r (p)	Spearman r (p)	Pearson r (p)	Spearman r (p)
test powtarzania cyfr – wersja słuchowa	r=0,56 p=0,001*	r=0,63 p<0,0001*	ND	r=-0,45 p= 0,003*	r=0,46 p=0,0023*	r=0,53 p=0,0004*
Test zapamiętywania szczegółów	ND	r=0,65 p=0,0001*	ND	r= -0,48 p= 0,001*	ND	r=0,45 p=0,003*
Test Matryc Ravena w Wersji Kolorowej (wynik sumaryczny)	r=0,59 p<0,0001*	r=0,59 p=0,0001*	ND	r= -0,47 p= 0,002*	r=0,49 p=0,001*	r=0,39 p=0,01*
RT Q1	r=-0,23 p=0,16	r=-0,21 p=0,20	ND	r=0,15 p=0,37	r=-0,11 p=0,52	r=-0,09 p=0,57
RT mediana	r=-0,29 p=0,08	r= -0,21 p= 0,21	ND	r= 0,16 p= 0,35	r=-0,13 p=0,45	r=-0,04 p=0,81
RT IQR	r=-0,08 P=0,6357	r= -0,05 p=0,74	ND	r= 0,11 p=0,50	r=0,02 p=0,91	r=0,01 p=0,93
RT Q3	r=-0,29 P=0,07	r= -0,20 p= 0,23	ND	r= 0,20 p= 0,22	r=-0,14 p=0,4	r=-0,10 p=0,54

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem * oraz wytłuszczonym drukiem.

5.8. Podsumowanie wyników

1. Stężenie beta-NGF w lizatach mononuklearów krwi obwodowej pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego maleje wraz z czasem trwania choroby.
2. Stężenia beta-NGF i NT-3 w lizatach mononuklearów krwi obwodowej pacjentów z RRMS są ze sobą istotnie związane, a zależność ta ma charakter dodatniej korelacji.
3. Istnieje zależność o charakterze dodatniej korelacji pomiędzy wskaźnikiem objętości miąższu do objętości mózgu (BPF) a stężeniem NT-3 we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów z RRMS.
4. Stwierdzono istotną statystycznie zależność o charakterze dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem NT-3 we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej a polem przekroju ciała modelowego u pacjentów z RRMS.
5. Stwierdzono istotną statystycznie zależność o charakterze dodatniej korelacji między stężeniem beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej chorych z RRMS a wynikiem testu spontanicznego tworzenia grup słów.
6. Istnieje silna zależność typu dodatniej korelacji między stężeniem beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej a wynikiem testu zapamiętywania listy słów. W modelu regresji wielorakiej zależność ta okazała się bardziej istotna niż poziom wykształcenia pacjentów z RRMS.
7. Parametry atrofii mózgowia (BPF) mierzone za pomocą tomografii rezonansu magnetycznego są istotnie związane z całkowitą objętością zmian demielinizacyjnych u pacjentów z RRMS, a zależność ta ma charakter negatywnej korelacji.
8. Wyniki uzyskane w teście spontanicznego tworzenia grup słów, TMT-A, TMT-B, w teście powtarzania cyfr wprost (wersja wzrokowa) oraz powtarzania cyfr w wersji słuchowej, w teście zapamiętywania szczegółów oraz wynik sumaryczny testu matrycy Ravena w wersji kolorowej są istotnie związane z radiologicznymi parametrami atrofii mózgowia (BPF) oraz z całkowitą objętością zmian demielinizacyjnych w mózgowiu. Im wyższy BPF oraz im mniejsza objętość plak, tym lepsze wyniki uzyskane w wyżej wymienionych testach neuropsychologicznych.

6. Dyskusja

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny zróżnicowania pacjentów chorujących na rzutowo-remisyjną postać stwardnienia rozsianego pod względem ekspresji beta-NGF, NT-3 i NT-4/5 w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, w kontekście parametrów uszkodzenia OUN mierzonych przy użyciu ilościowych badań tomografii rezonansu magnetycznego oraz nasilenia zaburzeń funkcji poznawczych określanych za pomocą wybranych testów neuropsychologicznych.

Po raz pierwszy stwierdzono, że ekspresja NT-3 w mononuklearach krwi obwodowej jest istotnie związana z BPF, jednym z najczęściej stosowanych markerów atrofii mózgowia. Związek ów ma charakter dodatniej korelacji: im wyższe stężenie NT-3 w mononuklearach, tym wyższy wskaźnik BPF, co oznacza mniejszy stopień atrofii. Pacjenci z większymi możliwościami produkcji NT-3 przez komórki układu immunologicznego mogą więc prezentować wyższy potencjał neuroprotekcyjny. Obserwacja ta stanowi kolejny dowód na istnienie ochronnej roli procesu autoimmunologicznego w patogenezie SM. Koncepcję autoimmunologii neuroprotekcyjnej wysunięto opierając się na badaniach na modelach zwierzęcych oraz badaniach histopatologicznych mózgow pacjentów chorujących na SM. W 2002 roku Stadelmann i wsp. wykazali obecność innej neurotrofiny, BDNF, w limfocytach T i makrofagach w obrębie plak demielinizacyjnych, szczególnie w przestrzeniach okołonaczyniowych, podczas gdy w grupie kontrolnej osób zdrowych BDNF ulegał ekspresji wyłącznie w populacjach neuronalnych. Poziom ekspresji BDNF w komórkach immunologicznych korelował dodatnio z aktywnością zapalno-demielinizacyjną plak. W tym samym badaniu wykazano również ekspresję receptora dla BDNF, TrkB, na neuronach w bezpośrednim sąsiedztwie plak oraz na reaktywnych astrocytach w obrębie ognisk demielinizacji. Istotny jest fakt, iż w aktywnym brzegu plaki obserwuje się zarówno bardziej intensywne dostarczanie czynników neurotroficznych przez mononukleary, jak i wzrost ekspresji receptorów Trk. W tym kontekście wysoce prawdopodobne wydaje się, że neurotrofiny uwalniane przez mononukleary w bezpośrednim sąsiedztwie plak pełnią rolę ochronną wobec zagrożonych wtórnym uszkodzeniem neuronów, odpowiadających patofizjologicznie strefie penumbry w udarze niedokrwiennym mózgu, co omówiono szerzej we wstępie niniejszej pracy (Hohlfeld, 2008, Kerschensteiner i wsp., 2003).

Podczas gdy opublikowano szereg prac odnośnie roli neuroprotekcynowej BDNF w SM, w tym – niedawno – na temat potencjału ochronnego poszczególnych polimorfizmów genu BDNF (Dinacci i wsp., 2011, Weinstock-Guttman i wsp., 2011), niniejsza rozprawa stanowi pierwszy w literaturze dowód na związek ekspresji NT-3 w mononuklearach z mniejszą atrofią mózgowia u pacjentów z SM. Podobnego związku nie stwierdzono w przypadku beta-NGF, a NT-4/5 wykryto zaledwie w 24,4% lizatów. Przyczyną tego faktu może być fizjologiczne zróżnicowanie poziomu istotności funkcji poszczególnych neurotrofin. Obecność NT-3 jest niezbędna w rozwoju układu nerwowego, podczas gdy ekspresja beta-NGF jest w owym procesie wymagana, ale nie krytyczna, natomiast NT-4/5 to jedyna neurotrofina, której genetyczne wyłączenie (ang. gene knock-out) nie prowadzi do wczesnej śmierci zarodka (Linker i wsp., 2009). Można więc wnioskować, że w przypadku potrzeby dodatkowego, obwodowego wsparcia neurotroficznego ze strony mononuklearów, zwiększeniu ulega synteza NT-3, która jest neurotrofiną o większym znaczeniu i silniejszym działaniu, kosztem mniej istotnych beta-NGF i NT-4/5.

W okresie rozwoju układu nerwowego określone stężenia neurotrofin warunkują równowagę między apoptozą a przetrwaniem poszczególnych komórek. W zdrowym, dorosłym OUN głównym źródłem neurotrofin są neurony, a wpływ neurotrofin wytwarzanych przez komórki układu immunologicznego jest prawdopodobnie znikomy, gdyż przez barierę krew-mózg przechodzą jedynie aktywowane formy limfocytów, które w warunkach prawidłowych nie ulegają reaktywacji w nieuszkodzonym mózgu. Dla ukształtowanego, dorosłego organizmu ludzkiego nie są więc znane normy i zakresy stężeń czynników neurotroficznycych ani w surowicy, ani we frakcji komórek jednojądrzastych, gdyż rolę ich można uznać za marginalną. W SM obserwujemy natomiast dynamiczne relacje pomiędzy układem nerwowym i immunologicznym, które w zdrowym OUN mają znacznie mniejsze znaczenie. Heterogenność pacjentów pod względem ekspresji neurotrofin może w tym przypadku odzwierciedlać zróżnicowanie możliwości regeneracyjnych w odpowiedzi na uszkodzenie układu nerwowego. W celu oceny heterogenności grupy zastosowano więc model badania przekrojowego (ang. cross-sectional study), rezygnując z porównania pacjentów z grupą kontrolną osób zdrowych. Taka analiza porównawcza zostałaby obciążona błędem założenia, że komórki układu immunologicznego odgrywają rolę w homeostazie czynników neurotroficznycych w warunkach fizjologicznych. Interesujące byłoby natomiast zestawienie SM z inną demielinizacyjną patologią OUN (np. choroba Devica) lub też z inną patologią o etiologii

związanej z zaburzeniami w obrębie układu immunologicznego, ale o odmiennej manifestacji klinicznej, np. z toczniem rumieniowatym układowym (ang. systemic lupus erythematosus, SLE). Realizacja takiej analizy jest w praktyce niezwykle trudna: chorobę Devica rozpoznaje się względnie rzadko, a pacjenci z SLE w ogromnej większości są poddawani przewlekłej immunosupresji, zwykle z zastosowaniem doustnych steroidów. Steroidoterapia, poprzez wpływ na komórki układu immunologicznego, może modulować poziom ekspresji czynników neurotroficznych. Ponadto steroidy zmieniają parametry wolumetryczne mózgowia, wpływając na uwodnienie poszczególnych przedziałów tkankowych mózgowia (Khoury i Bakshi, 2010).

W ramach niniejszego projektu przeprowadzono badanie pilotażowe na 9 pacjentkach z SLE, w wieku od 21 do 51 lat (średnia $36,40 \pm 10,26$ lat) i czasie trwania choroby od 0,67 do 6 lat (średnia $3,52 \pm 1,58$ lat). Z uwagi na niewielką liczebność grupy chorych z toczniem, uzyskane dotąd dane potraktowano jako wstępne i nie umieszczono ich w sekcji wyników niniejszej pracy doktorskiej. Ze względu na unikatowość materiału (w literaturze istnieją jedynie pojedyncze doniesienia na temat roli BDNF i NGF w toczniu układowym), zdecydowano się poświęcić temu zagadnieniu fragment dyskusji, mimo że rekrutacja pacjentów z SLE celem dalszej analizy porównawczej jest w toku.

W grupie pacjentów z SLE, w przeciwieństwie do grupy pacjentów z SM, nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności między stężeniem NT-3 w mononuklearach i BPF (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,20$ przy $p = 0,66$; współczynnik korelacji rangowej Spearmana $r = -0,11$ przy $p = 0,82$), ani też istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem pozostałych neurotrofin w mononuklearach a BPF. Stwierdzono natomiast, że stężenie NT-3 było istotnie wyższe w lizatach mononuklearów pacjentów z SM niż u chorych z SLE ($p < 0,0001$, tabela nr 20), natomiast stężenie beta-NGF okazało się istotnie wyższe w komórkach jednojądrzastych pacjentów z SLE niż u pacjentów z SM ($p < 0,001$, tabela). Wyniki te należy interpretować niezwykle ostrożnie, zarówno z uwagi na nierównomierną liczebność grup, jak i na fakt, że wszyscy uwzględnieni w badaniu chorzy z toczniem pozostawali na doustnej steroidoterapii. W kontekście ostatniego zastrzeżenia należy jednak podkreślić, że nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami neurotrofin w mononuklearach pacjentów z toczniem a dawką steroidów.

Tabela 20

Porównanie ekspresji poszczególnych neurotrofin w mononuklearach krwi obwodowej u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym i z toczeniem rumieniowatym układowym

	Pacjenci z SM	Pacjenci z SLE	p
NT-3 w PBMCs (pg/mg białka) średnia±SD	590,10 ± 327,52	19,82 ± 16,71	p<0,0001*
NT-3 w PBMCs (pg/mg białka) mediana, IQR	Q2 = 557,8082 IQR=339,16 - 724,90	Q2= 15,1628 IQR= 6,18 - 37,74	p<0,0001*
beta-NGF w PBMCs (pg/mg białka) średnia±SD	1,26 ± 0,80	2,85 ± 1,31	p < 0,0001*
beta-NGF w PBMCs (pg/mg białka) mediana, Q1, Q3	Q2 = 1,07 IQR = 0,65 - 1,65	Q2 = 2,41 IQR = 2,10 - 3,29	p = 0,0006*

W przypadku, gdy zależność osiągnęła istotność statystyczną, oznaczono ją symbolem * oraz wytłuszczonym drukiem.

Poza porównaniem związku NT-3 i BPF w grupach pacjentów ze zróżnicowaną, autoimmunologiczną patologią OUN, kolejnym krokiem w identyfikacji potencjalnej roli neuroprotektynowej NT-3 w SM powinno być określenie związku BPF i NT-3 w badaniach ciągłych (longitudinalnych) na tej samej grupie chorych ze stwardnieniem rozsianym. W niniejszej pracy potwierdzono związek pomiędzy stabilnym markerem atrofii mózgowia, jakim jest BPF, a stężeniem NT-3 w mononuklearach, które odzwierciedla aktualny (*in tractu*) obwodowy potencjał neurotroficzny pacjentów. Badania ciągłe pozwoliłyby określić, czy wysokie stężenie NT-3 w mononuklearach krwi obwodowej może pełnić funkcję ochronną w kontekście rocznego przyrostu (*tempa*) atrofii.

Ponadto, interesująca byłaby ocena, w jaki sposób stężenie neurotrofin zmienia się w czasie wraz z postępem choroby. W niniejszej pracy wykazano negatywną korelację ekspresji beta-NGF w mononuklearach z czasem trwania choroby, niezależnie od wieku pacjentów. Jest to zgodne z hipotezą, że wraz z czasem trwania choroby wyczerpują się rezerwy neurotroficzne, co prowadzić może do upośledzenia procesów regeneracji OUN, klinicznie manifestując się przejściem choroby w postać przewlekle postępującą. Podobnego związku nie stwierdzono w przypadku NT-3, choć określono istotną zależność ekspresji beta-NGF i NT-3 w mononuklearach pacjentów z SM. Jedną z możliwych przyczyn braku korelacji NT-3 z czasem trwania choroby stanowić może niższa niż dla beta-NGF detekcja, z czym wiąże się mniejsza liczebność badanej grupy.

Warto zaznaczyć, że dla oceny obwodowego potencjału neurotroficznego można badać ekspresję neurotrofin w mononuklearach za pośrednictwem pomiaru stężenia białka w ich lizatach, oceny ekspresji mRNA, a także poprzez badania sekrecji aktywowanych mononuklearów w hodowlach komórkowych. W niniejszej pracy zdecydowano się na pomiar zawartości białka w niestymulowanych komórkach jednojądrzastych. Ocena stężenia neurotrofin w płynie mózgowo-rdzeniowym daje ograniczony wgląd w ich rolę w miejscu uszkodzenia OUN w przebiegu SM, gdyż świadczy przede wszystkim o ogólnym statusie neurotroficznym pacjentów. Poziom neurotrofin w PMR determinowany jest w dużym stopniu przez pulę neuronalną, w obrębie której ma miejsce synteza, uwalnianie z komórek uszkodzonych i uwalnianie na zewnątrz drogą transportu anterogradowego (Stadelmann i wsp., 2002). Zawartość neurotrofin w PMR nie wyjaśnia więc postępu atrofii, ale może ją odzwierciedlać. Z tego względu w niniejszej pracy nie oceniano stężeń neurotrofin w PMR. Uznano natomiast, że pomiar ich zawartości we frakcji mononuklearów krwi obwodowej może stanowić modalność o większym potencjale różnicującym grupę badaną w kontekście patofizjologii atrofii, a nie jej opisu.

Frapującym zagadnieniem jest mechanizm, w którym komórki jednojądrzaste krwi obwodowej podlegają stymulacji do produkcji neurotrofin w obrębie plak. Identyfikacja owego mechanizmu stanowiłaby przełomowe odkrycie w kontekście terapii zarówno stwardnienia rozsianego, jak i innego rodzaju patologii OUN, dla których poszukuje się strategii neuroprotekcijno-neuroregeneracyjnych, przede wszystkim szeroko pojętych chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego. Istnieją przesłanki, że kluczową rolę w stymulacji mononuklearów do wytwarzania czynników neurotroficzných w środowisku OUN odgrywać może interakcja białka CD40 na makrofagach z ligandem CD40L

(CD154). Shibata i wsp. (2003) wykazali, że stymulacja ligandem CD40L ludzkich makrofagów zwiększa ich aktywność neurotroficzną, co skutkuje nasileniem syntezy białka, wzrostem neurytów oraz poprawą funkcji synaps szczurzych neuronów korowych, hodowanych na podłożach kondycjonowanych (ang. conditioned medium) z hodowli wspomnianych stymulowanych makrofagów ludzkich. CD40L ulega ekspresji na infiltrujących OUN aktywowanych limfocytach T, na śródbłonku drobnych naczyń mózgowych (Mach i wsp., 1997) oraz na astrocytach (Calingsan i wsp., 2002). W związku z tym, po przekroczeniu bariery krew-mózg makrofagi mogą podlegać aktywacji przez infiltrujące limfocyty T, a także przez komórki śródbłonka naczyniowego w obrębie plak oraz przez same astrocyty. Mimo sprzyjających warunków do pro-neuroprotekcijnej stymulacji makrofagów w mikrośrodoisku plaki, u wielu pacjentów z RRMS procesy regeneracji są niewystarczające, a choroba ulega progresji do fazy wtórnie postępującej. Istnieje możliwość, że neuroprotekcijna funkcja mononuklearów krwi obwodowej ulega hamowaniu u chorych na SM, co może mieć związek z przesunięciem równowagi odpowiedzi immunologicznej w kierunku prozapalnym. Defektywna regulacja funkcji neuroprotekcyjnych mononuklearów może stanowić jedno z antygenowo niespecyficznych zaburzeń układu immunologicznego prowadzących do rozwoju SM w warunkach, w których osoby bez owego defektu unikną choroby.

Wykazany w niniejszej dysertacji związek NT-3 z BPF stanowi niewątpliwą przesłankę ku temu, aby rozważać NT-3 w kategorii potencjalnych nowych metod terapeutycznych w SM. Niestety, stosunkowo krótki (poniżej dwóch minut) czas półtrwania NT-3 i innych neurotrofin (Pradat i wsp., 2001; Pradat i wsp., 2002) powoduje trudności w zastosowaniu owych cząsteczek w praktyce klinicznej. Z uwagi na fakt, iż NT-3 wykazuje najwyższe powinowactwo względem TrkC, większość efektów biologicznych NT-3 jest najprawdopodobniej wyzwalana przez interakcje z tym właśnie receptorem, a więc efekt terapeutyczny można by uzyskać poprzez zastosowanie agonistów receptora TrkC. Dotychczas udało się wyprodukować względnie wybiórczy inhibitor rodziny receptorów Trk, dostępny jako preparat K-252a, będący glikozylowanym indolo-karbazolowym alkaloidem, który w nieobecności neurotrofin działa jak agonista Trk, a w ich obecności – jak antagonistą Trk (Hohlfeld, 2008; Rasouly i wsp., 1992). CEP-1347, półsyntetyczna pochodna K-252a, zachowuje właściwości neuroprotekcijne, nie wykazując działania antagonistycznego wobec receptorów Trk (Roux i wsp., 2002). Kolejną opcję terapeutyczną stanowią przeciwciała monoklonalne o funkcji wybiórczych agonistów

TrkC. Dotychczas wykazano ich skuteczność w poprawie parametrów klinicznych, elektrofizjologicznych oraz histologicznych w modelu zwierzęcym choroby Charcot–Marie–Tooth u myszy typu Trembler-J, co stanowi przesłankę o ich potencjalnej efektywności w CMT1A i innych neuropatiach (Sahenk i wsp., 2010). Następną możliwością to terapia komórkowa, polegająca na transferze aktywowanych, autoimmunologicznych komórek, zmodyfikowanych *in vitro* tak, aby wydzielały neurotrofiny po ponownym wstrzyknięciu.

Kolejnym interesującym wynikiem w niniejszej pracy jest zależność między stężeniem beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej chorych z RRMS a wynikiem testu spontanicznego tworzenia grup słów oraz testu zapamiętywania listy słów. Pierwsza z tych zależności, choć zidentyfikowana przy użyciu korelacji, traci znaczenie w modelu regresji krokowej, wobec bardzo silnego związku wyniku testu z poziomem wykształcenia oraz całkowitą objętością plak. Test spontanicznego tworzenia grup słów pozwala na ocenę tych funkcji wykonawczych kontrolowanych przez korę przedczołową, które ulegają pełnemu wykształceniu najpóźniej w toku dojrzewania – około 12 roku życia, w przeciwieństwie do 6 roku życia dla pozostałych funkcji wykonawczych (Spreeen i Strauss, 1998). Druga zależność okazała się bardziej istotna niż związek z poziomem wykształcenia czy też z radiologicznymi parametrami uszkodzenia (całkowita objętość zmian demielinizacyjnych) oraz atrofii (BPF). W modelu regresji krokowej wynik testu zapamiętywania listy słów najlepiej spośród podstawionych zmiennych wyjaśniały: stężenie beta-NGF w mononuklearach oraz wiek pacjentów, tworząc model o wysokim współczynniku $R^2=0.45$ przy $p<0.001$. Świadczy to o bardzo silnym związku ekspresji beta-NGF w komórkach jednojądrzastych i wyniku testu zapamiętywania listy słów, który pozwala na ocenę zakresu pamięci bezpośrednio. Test ów jest modyfikacją testu 15 słów Reya (ang. Rey Auditory Verbal Learning Test) oraz Kalifornijskiego Testu Ucznia Werbalnego (ang. California Verbal Learning Test), obejmując zapamiętywanie listy niezwiązanych ze sobą 15 słów (jak w teście Reya, ale w modalności wzrokowej, a nie słuchowej), w jednorazowej próbie i bez dystraktorów (Spreeen i Strauss, 1998). Z uwagi na słabsze uwarunkowanie poziomem wykształcenia test ten może stanowić bardzo dobre narzędzie przesiewowe w badaniu neuropsychologicznym, niezależnie od społeczno-educacyjnego statusu pacjentów.

Warto również podkreślić, że obydwie testy, z wynikami których koreluje stężenie beta-NGF w mononuklearach, istotnie wpływają na globalny deficyt poznawczy pacjentów

z SM, określany jako suma deficytu w domenach neuropsychologicznych, badanych za pomocą zastosowanych testów. Identyfikacja zależności między ekspresją beta-NGF a wynikami testów oceniających pamięć operacyjną oraz semantyczną w niniejszej dysertacji stanowi pierwszą w literaturze obserwację dotyczącą ochronnej funkcji beta-NGF w kontekście zaburzeń poznawczych u pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane. Jest to zgodne z dotychczasowymi obserwacjami na modelach zwierzęcych oraz ze znanym faktem, iż beta-NGF stanowi jeden z czynników warunkujących przetrwanie oraz prawidłowe funkcjonowanie neuronów cholinergicznym w dorosłym mózgu. Można sądzić, że w stwardnieniu rozsianym zwiększone jest zapotrzebowanie na beta-NGF, którego wyższe stężenie w sąsiedztwie narażonych neuronów ma je chronić przed uszkodzeniem. W 2005 roku D'Intino i wsp. wykazali, że w EAE u szczurów szczepu Lewis deficyty funkcji pamięci oraz uczenia się, badane za pomocą testu labiryntu wodnego Morrisa, korelują ze spadkiem aktywności acetylotransferazy cholinowej oraz poziomu mRNA beta-NGF w korze mózgowej, hipokampie i przodomózgowiu podstawnym (D'Intino i wsp., 2005). Co więcej, leczenie z zastosowaniem wybiórczych inhibitorów acetylocholinesterazy (rywastygmina, donepezil) poprawiało funkcje poznawcze, przywracało aktywność acetylocholinesterazy oraz zwiększało ekspresję beta-NGF. Wyniki niniejszej pracy, rozpatrywane w kontekście powyższego doniesienia, mogą więc pośrednio sugerować celowość zastosowania inhibitorów acetylocholinesterazy w leczeniu zaburzeń poznawczych u pacjentów z SM. W praktyce nadal brak rezultatów randomizowanych badań wieloośrodkowych, niemniej doniesienia z pojedynczych ośrodków wskazują na dobrą tolerancję oraz możliwą skuteczność donepezilu w leczeniu chorych z deficytem poznawczym w przebiegu SM (Christodoulou i wsp., 2006; Krupp i wsp., 2004).

Należy zauważyć, że warunkowane obecnością NGF uwalnianie acetylocholinyl zależy od dostępności zewnątrzkomórkowej cholinyl (Auld i wsp., 2001). Co ciekawe, stężenie cholinyl mierzone metodą protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego (ang. ¹H-MR spectroscopy) jest niższe u pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane, u których nie stwierdza się zmian demielinizacyjnych w rutynowym badaniu MRI (Gustafsson i wsp., 2007). Może to wiązać się z lepszą dostępnością cholinyl, zużywanej w procesie wewnątrzkomórkowej syntezy acetylocholinyl. Pacjenci bez uchwytnych w standardowym obrazowaniu plak mogą stanowić odrębną grupę osób z większym potencjałem neuroprotekcylnym. Niewątpliwą wartością miałaby analiza potencjału

neuroprotekcynowego beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej w zestawieniu z danymi z badań spektroskopowych oraz neuropsychologicznych.

Testy neuropsychologiczne w niniejszej pracy zostały wybrane spośród narzędzi prostych, powszechnie dostępnych i względnie mało czasochłonnych. Wyboru owego dokonano z punktu widzenia klinicznej praktyki neurologa, w poszukiwaniu czułych ale nieskomplikowanych testów, które zastosować może każdy lekarz prowadzący pacjentów chorujących na SM. Oczywiście, zastosowanie owych testów w praktyce wymaga w części przypadków walidacji, niemniej już na bieżącym etapie badań mogą one okazać się użytecznym narzędziem w ocenie związku parametrów neuropsychologicznych ze zmiennymi neuroradiologicznymi i neuroimmunologicznymi w przebiegu SM.

Wartość poszczególnych testów jako badań przesiewowych, umożliwiających potwierdzenie obecności zaburzeń poznawczych u pacjentów z SM, oceniono w niniejszej pracy na podstawie stopnia korelacji z globalnym deficytem poznawczym, wyrażonym jako suma deficytu w pojedynczych domenach. W modelu regresji krokowej wyjaśniającym sumę deficytu poznawczego istotnymi zmiennymi okazały się: test powtarzania cyfr wprost w wersji wzrokowej ($r = -0,73$, $p < 0,0001$), test spontanicznego tworzenia grup słów ($r = -0,67$, $p = 0,002$), test zapamiętywania szczegółów ($r = -0,75$, $p = 0,004$), test zapamiętywania listy słów ($r = -0,56$, $p = 0,03$). Wyniki uzyskane w większości z wymienionych testów, za wyjątkiem spontanicznego tworzenia grup słów, zależą w dużej mierze od funkcji uwagi.

Godnym uwagi narzędziem badawczym okazał się również test oceniający czas reakcji prostej. Suma deficytu istotnie koreluje z rozkładem parametrów testu RT w obrębie badanej grupy: z medianą (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r = 0,33$, $p = 0,05$) oraz trzecim kwartylem ($r = 0,35$, $p = 0,03$), choć związek ów nie osiągnął wystarczającej znamienności, aby znaleźć się w modelu regresji krokowej. Mimo iż zwolnienie szybkości odpowiedzi, przy zachowanej dokładności/prawidłowości, jest stosunkowo dobrze udokumentowane wśród pacjentów z SM (Stoquart-ElSankari S i wsp., 2010), mechanizm tego zjawiska pozostaje wciąż niewyjaśniony. Test RT wymaga ciągłego podtrzymywania funkcji uwagi tak, aby uzyskać podobnie szybką odpowiedź podczas reakcji na kolejne bodźce (Godefroy i wsp., 1995). W tym kontekście stwierdzona w niniejszej pracy doktorskiej względnie niska wartość współczynnika korelacji pomiędzy Q1 a Q3 RT ($r = 0,87$ przy $p < 0,0001$) u chorych z SM sugeruje obecność deficytu uwagi u badanych pacjentów.

Wydaje się, że często opisywany w SM deficyt uwagi może wywierać istotny wpływ na sprawność pozostałych funkcji poznawczych, co w niniejszej pracy potwierdzają przedstawione wyżej zależności: model regresji krokowej dla sumy deficytu oraz rozkład parametrów testu RT. Podobnie istotna dla funkcji większości domen neuropsychologicznych jest pojemność pamięci operacyjnej, która ulega redukcji u pacjentów z SM (Archibald i Fisk, 2000). Zarówno funkcja uwagi, jak i pojemność pamięci operacyjnej, podlegają określonym interwencjom behawioralnym, co może okazać się skuteczne w spowolnieniu deterioracji poznawczej. Dowód na potencjalną efektywność ćwiczeń neuropsychologicznych stanowi chociażby wspomniany w części wstępnej pracy fakt, iż we wczesnych etapach badań klinicznych obserwuje się poprawę w zakresie wyników uzyskanych w teście PASAT. Postęp zaburzeń poznawczych jest bowiem powolny, a trening wpływa na poprawę wyników. Wykorzystane w niniejszej pracy testy mogą więc stanowić nie tylko ogólnie dostępne, łatwe w zastosowaniu narzędzia badawcze, ale i – jeśli powtarzane regularnie – ćwiczenia w ramach terapii, i – być może – metodę zapobiegania zaburzeniom poznawczym u pacjentów z SM. Oczywiście, dla oceny efektywności tych praktyk należałoby przeprowadzić randomizowane badania kliniczne, przy czym – z uwagi na powolne tempo rozwoju zaburzeń poznawczych – badania te wymagałyby bardzo długiego okresu obserwacji. Wolny postęp deterioracji intelektualnej u pacjentów z SM stał się również jednym z argumentów przemawiających za zastosowaniem w niniejszej pracy doktorskiej kryterium deficytu w danym teście neuropsychologicznym jako wyniku gorszego niż mediana dla grupy. Uznano, że porównanie pacjentów z grupą osób zdrowych może nie wykazać istotnej różnicy w uzyskanych wynikach, zwłaszcza w przypadku stosunkowo jednorodnej grupy o krótkim czasie trwania choroby ($Q_2=3$ lata), kiedy deficyt poznawczy jeszcze nie ujawnił się.

Koncepcja autoimmunologii neuroprotektoryjnej w SM wymaga dalszych badań. Dotychczasowe strategie terapeutyczne mają na celu redukcję procesu neurozapalnego w SM, a większość leków zarejestrowanych w leczeniu choroby posiada właściwości immunomodulujące. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy wydaje się, że strategie neuroprotektoryjne mogłyby stanowić cenny element wspomagający w tradycyjnie stosowanych terapiach.

Większość badań klinicznych w SM nie uwzględnia pomiaru szybkości przyrostu atrofii mózgowia, mimo ewidentnego jej związku z progresją choroby. Adekwatna ocena atrofii

wymaga dłuższej obserwacji i, konsekwentnie, większych nakładów finansowych. Być może uwzględnienie pomiaru stężeń neurotrofin w mononuklearach pacjentów, które to badanie wymaga jedynie dodatkowej próbki krwi przy rutynowym jej pobraniu i stwarza niewielki koszt, mogłoby dawać wgląd w potencjał neuroprotekcyny pacjentów, skorelowany z atrofią mózgowia. Wyniki niniejszej pracy doktorskiej dostarczają pierwszych przesłanek ku celowości powyższej strategii dla neurotrofiny 3.

7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. NT-3 ma istotny związek z wykładnikami atrofii mózgowia mierzonymi za pomocą badań ilościowych rezonansu magnetycznego u pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego: ze wskaźnikiem BPF oraz polem przekroju ciała modelowego.
2. Ekspresja beta-NGF w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej ma istotny związek z funkcjami poznawczymi pacjentów z RRMS: z wynikami testów neuropsychologicznych oceniających pamięć operacyjną oraz semantyczną, takich jak test zapamiętywania listy słów oraz test spontanicznego tworzenia grup słów, których rezultaty istotnie korelują z globalnym deficytem poznawczym pacjentów.
3. Funkcje poznawcze u pacjentów z RRMS są istotnie związane z radiologicznymi parametrami atrofii mózgowia (BPF) oraz z całkowitą objętością zmian demielinizacyjnych w mózgowiu.
4. Istnieje potrzeba dalszych badań nad funkcją neurotrofin, w szczególności NT-3 i beta-NGF, syntetyzowanych przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej u pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane. Lepsze zrozumienie potencjalnych mechanizmów neuroprotekcyjnych, za pośrednictwem których działają wspomniane neurotrofiny, może dać początek nowym opcjom terapeutycznym, zarówno w kontekście spowalniania postępu choroby, jak i zaburzeń poznawczych pojawiających się w jej przebiegu.

8. Streszczenie

Stwardnienie rozsiane (SM) stanowi przewlekłą, zapalną chorobę ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu demielinizacyjno-zwyrodnieniowym i wciąż niejasnej etiologii. Odkrycia naukowe ostatnich lat sugerują, że proces autoimmunologiczny, który przez wiele lat postrzegano jako podstawowy mechanizm destrukcyjny w przebiegu tej choroby, może odgrywać w OUN także rolę naprawczą. Jednym ze sposobów realizacji funkcji neuroprotekcijnej przez układ immunologiczny jest synteza czynników neurotroficznych, m.in. z rodziny neurotrofin, we frakcji komórek jednojądrzastych (mononuklearów) krwi obwodowej (PBMCs). W warunkach zwiększonego zapotrzebowania na czynniki neurotroficzne, co ma miejsce w sytuacji uszkodzenia układu nerwowego w przebiegu stwardnienia rozsianego, dodatkowa synteza i dostarczanie neurotrofin przez mononukleary może kompensować względny niedobór tych czynników w OUN. Neurotrofiny mogą wywierać efekt neuroprotekcijny na komórki nerwowe bezpośrednio, poprzez receptory Trk na neuronach, jak i pośrednio, poprzez zależną od receptorów Trk, autokrynną regulację funkcji odpowiednich subpopulacji komórek jednojądrzastych na obwodzie. Niewydolność układu immunologicznego w dostarczaniu adekwatnej puli neurotrofin może skutkować ograniczeniem potencjału neuroprotekcijnego, co ma prowadzić do bardziej rozległego uszkodzenia, a więc i większej atrofii, która determinuje postęp choroby. Z progresji atrofii wynikają także zaburzenia poznawcze, których obecność i stopień nasilenia zależą od zmian mogących nie ujawnić się w rutynowo stosowanych metodach neuroobrazowania.

Celem niniejszej pracy było określenie, czy zróżnicowanie grupy pacjentów ze stwardnieniem rozsianym pod względem ekspresji wybranych neurotrofin, beta-NGF, NT-3 i NT-4/5, we frakcji mononuklearów krwi obwodowej wiąże się z różnym potencjałem regeneracji OUN, wyrażonym poprzez mniejszą atrofię mózgowia, określoną m.in. przez wskaźnik objętości mięszu do objętości mózgu (BPF) i pole przekroju ciała modelowatego, oraz lepszą sprawność funkcji poznawczych, badanych za pomocą wybranych testów neuropsychologicznych. Do badanej grupy włączono 41 pacjentów z postacią rzutowo-remisyjną stwardnienia rozsianego, rozpoznaną na podstawie kryteriów McDonalda z 2005 roku. U każdego pacjenta wykonano pełne badanie neurologiczne, z oceną stopnia niesprawności w skali EDSS, badanie tomografii rezonansu magnetycznego mózgowia (MRI) według specjalnie opracowanego protokołu,

uwzględniającego m.in. wolumetryczną sekwencję T1-zależną i wolumetryczną sekwencję FLAIR-space, a także badanie z zastosowaniem wybranych testów neuropsychologicznych. Stężenia neurotrofin w lizatach mononuklearów oraz w surowicy krwi określono przy użyciu metody immunoenzymatycznej ELISA.

Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników stwierdzono, że istnieje zależność o charakterze dodatniej korelacji pomiędzy parametrami atrofii mózgowia, w szczególności wskaźnikiem BPF i polem przekroju ciała modzelowatego, a stężeniem NT-3 we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów z RRMS, co stanowi pierwsze w literaturze doniesienie na temat związku tej neurotrofiny z parametrami neuroradiologicznymi w SM. Wykryto również statystycznie istotną zależność o charakterze dodatniej korelacji między stężeniem beta-NGF w mononuklearach krwi obwodowej chorych z RRMS a wynikami testów neuropsychologicznych: testu zapamiętywania listy słów (silna zależność, bardziej istotna niż poziom wykształcenia) oraz testu spontanicznego tworzenia grup słów. Jest to pierwszy w literaturze dowód na związek beta-NGF z funkcjami poznawczymi u pacjentów z SM, będąc potwierdzeniem dotychczasowych danych uzyskanych na zwierzęcych modelach eksperymentalnych. Ponadto stwierdzono, że stężenie beta-NGF w lizatach PBMCs maleje wraz z czasem trwania choroby, a stężenia beta-NGF i NT-3 w lizatach są ze sobą istotnie dodatnio skorelowane. Detekcja NT-4/5 w mononuklearach badanych pacjentów była bardzo niska (<25%), co uniemożliwiło uwzględnienie jej w dalszej analizie statystycznej. W niniejszej pracy wykazano także obecność statystycznie istotnej korelacji parametrów atrofii mózgowia i całkowitej objętości zmian demielinizacyjnych mierzonych za pomocą badania MRI. Stwierdzono również istotną zależność wyników uzyskanych w wykonanych testach neuropsychologicznych, w szczególności w teście spontanicznego tworzenia grup słów, TMT-A, TMT-B, w teście powtarzania cyfr wprost (wersja wzrokowa) oraz powtarzania cyfr w wersji słuchowej, w teście zapamiętywania szczegółów oraz teście matryc Ravena w wersji kolorowej, z radiologicznymi parametrami atrofii mózgowia (BPF) oraz z całkowitą objętością zmian demielinizacyjnych w mózgowiu.

Prezentowane w niniejszej dysertacji wyniki sugerują związek neurotrofin produkowanych przez komórki układu immunologicznego z parametrami atrofii mózgowia oraz funkcjami poznawczymi u pacjentów z RRMS, przez co mogą potwierdzać koncepcję autoimmunologii neuroprotektoryjnej w stwardnieniu rozsianym.

Mimo że zagadnienie neurotrofin produkowanych przez komórki układu immunologicznego w stwardnieniu rozsianym wymaga dalszych badań, zwłaszcza longitudinalnych (długotrwałych, wieloletnich) w odniesieniu do parametrów atrofii w badaniach neuroradiologicznych, przedstawione w niniejszej pracy wyniki skłaniać mogą do rozważenia nowych możliwości leczenia SM, w szczególności strategii neuroprotekcyjnych jako potencjalnie użytecznego elementu addycyjnego w tradycyjnie stosowanej terapii immunomodulującej.

9. Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS) with unknown etiology. It was recently suggested that autoimmunity, which had long been considered to be destructive in MS, might also play a protective role in the CNS of MS patients. Neurotrophins are polypeptides belonging to the neurotrophic factor family. While neurotrophins mediate cell survival and proliferation in the nervous system, they are also expressed within peripheral blood mononuclear cells fraction (PBMCs) of immunological system. In MS additional neurotrophic support from PBMCs might compensate relative neurotrophins deficiency in the damaged CNS tissue that needs to be repaired. In MS PBMCs-derived neurotrophins might exert their neuroprotective role directly by acting on *trk* receptors on neurons, and indirectly via *trk*-dependent autocrine regulation of peripheral blood immunological cells functions. Failure to produce the adequate neurotrophins concentrations might result in decreased protection of the CNS, consequently leading to increased atrophy, which is the main determinant of MS patients' end-point disability. Progressive atrophy also results in MS-related cognitive deficit.

The aim of this study was to establish whether among MS patients different expression of the chosen neurotrophins in PBMCs fraction, namely beta nerve growth factor (beta-NGF), neurotrophin 3 (NT-3) and neurotrophin 4/5 (NT-4/5) is related to different regeneration potential, represented by smaller brain atrophy, as described by means of brain parenchymal fraction (BPF) and corpus callosum cross-sectional area measurements, and better cognitive performance.

41 patients with clinically definite relapsing-remitting MS (RRMS), according to revised McDonald criteria (2005), were recruited for the study. Each patient underwent complete neurological examination, including EDSS scoring, magnetic resonance imaging (MRI) study using Magnetisation Prepared Rapid Acquisition Gradient Echo (MPRAGE) and FLAIR-space sequences, and a set of neuropsychological tests. Neurotrophins levels were measured in sera and PBMCs by ELISA method, according to manufacturer's instructions.

Based on statistical analysis a significant positive correlation has been found between brain atrophy parameters, namely BPF and corpus callosum cross-sectional area, and NT-3 PBMCs expression in RRMS patients. This is the first study showing the

relationship between NT-3 and neuroradiological parameters in MS. Also, a significant positive correlation has been identified between beta-NGF PBMCs concentration in RRMS patients and their performance in neuropsychological tests, namely 15-Word List Recall Test (a strong correlation that was found to be even more significant than the education level) and spontaneous word list generation test. This study is the first one to support data from experimental animal MS models, indicating that cognitive deficit is related to beta-NGF function in MS. In addition, it was found that beta-NGF PBMCs concentration is significantly correlated with disease duration, and beta-NGF and NT-3 PBMCs levels are positively correlated with each other. NT-4/5 detection in MS patients PBMCs samples was very low (<25%), which made further statistical analysis including this neurotrophin impossible. Also, statistically significant correlation between brain atrophy parameters and total lesion volume in MRI of MS patients was identified. Performance in neuropsychological tests, namely spontaneous word list generation test, trail making tests A and B, visual and auditory digit span, attention to detail test and Raven's Coloured Progressive Matrices, was significantly positively correlated with radiological brain atrophy parameters (BPF) and total lesion volume.

The results presented in this dissertation demonstrate a relationship between neurotrophins produced by peripheral blood mononuclear cells, brain atrophy parameters and cognitive functions in RRMS patients. These findings further support the concept of neuroprotective autoimmunity in multiple sclerosis. Although more studies, especially longitudinal ones using brain atrophy rate measurements, are needed to clarify the role of PBMCs-derived neurotrophins in MS, our findings provide rationale for novel therapeutic approaches. It seems that neuroprotective strategies might be used as potentially valuable add-on therapies, alongside traditional immunomodulatory treatment in multiple sclerosis.

10. Piśmiennictwo

Altman L. Programmed cell death: the paths to suicide. *Trends Neurosci* 1992; 15: 278-280

Archibald CJ, Fisk JD. Information processing efficiency in patients with multiple sclerosis. *J Clin Exp Neuropsychol* 2000; 22: 686-701

Auld DS, Mennicken F, Day JC, Quirion R. Neurotrophins differentially enhance acetylcholine release, acetylcholine content and choline acetyltransferase activity in basal forebrain neurons. *J Neurochem* 2001; 77: 253-262

Azoulay D, Urshansky A, Karni A. Low and dysregulated BDNF secretion from immune cells of MS patients is related to reduced neuroprotection. *J Neuroimmunol* 2008; 195: 186-193

Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miler A, Karni A. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing-remitting MS: reversal by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol* 2005; 167: 215-218

Barkhof F, van Walderveen M. Characterization of tissue damage in multiple sclerosis by nuclear magnetic resonance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354: 1675-1686

Barkhof F, Rocca M, Francis G, Van Waesberghe JH, Uitdehaag BM, Hommes OR, Hartung HP, Durelli L, Edan G, Fernández O, Seeldrayers P, Sørensen P, Margrie S, Rovaris M, Comi G, Filippi M, Early Treatment of Multiple Sclerosis Study Group. Validation of diagnostic magnetic resonance imaging criteria for multiple sclerosis and response to interferon beta1a. *Ann Neurol* 2003; 53: 718-724

Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 2004; 55: 458-468

Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 2002; 36: 375-86

Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961; 4: 53-63

Benedict RH, Weinstock-Guttman B, Fishmann I, Sharma J, Tjoa CW, Bakshi R. Prediction of neuropsychological impairment in multiple sclerosis: comparison of conventional magnetic resonance imaging measures of atrophy and lesion burden. *Arch Neurol* 2004; 61: 226-230

Bermel RA, Bakshi R. The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2006; 5: 158-170

Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2000; 48: 893-901

Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 2003; 206: 165-171

Broshek DK, Barth JT. The Halstead-Reitan Neuropsychological Test Battery. W: *Neuropsychological Assessment in Clinical Practice: A Guide to Test Interpretation and Integration*, ed. Groth-Marnat G. New York, John Wiley and Sons, 2000

Butzkueven H, Zhang JG, Soilu-Hanninen M, Hochrein H, Chionh F, Shipham KA, Emery B, Turnley AM, Petratos S, Ernst M, Bartlett PF, Kilpatrick TJ. LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat Med* 2002; 8: 613-619

Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F, Mattisi I, Grossi P, Favaretto A, Atzori M, Bernardi V, Barachino L, Rinaldi L, Perini P, Gallo P, Filippi M. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66: 1144-1150

Calingasan NY, Erdely HA, Altar CA. Identification of CD40 ligand in Alzheimer's disease and in animal models of Alzheimer's disease and brain injury. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 31-39

Caggiula M, Batocchi AP, Frisullo G, Angelucci F, Patanella AK, Sancricca C, Nociti V, Tonali PA, Mirabella M. Neurotrophic factors and clinical recovery in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2005; 62: 176-182

Carswell R. *Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease.*

London, Longman, Orme, Browne, Green and Longman, 1838

Carter P. The complete book of intelligence tests. John Wiley and Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England, 2005

Chao MV. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 1994; 25: 1373–1385

Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4: 299-309

Chen KS, Nishimura MC, Armanini MP, Crowley C, Spencer SD, Phillips HS. Disruption of a single allele of the nerve growth factor gene results in atrophy of basal forebrain cholinergic neurons and memory deficits. *J Neurosci* 1997; 17: 7288-7296

Christodoulou C, Melville P, Scherl WF, Macallister WS, Elkins LE, Krupp LB. Effects of donepezil on memory and cognition in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2006; 245: 127-136

Comi G, Rovaris M, Leocani L, Martinelli V, Filippi M. Clinical and MRI assessment of brain damage in MS. *Neurol Sci* 2001; 22 Suppl 2: S123-S127

Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Werkerle H., red. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 4 wyd. Churchill Livingstone Elsevier, 2006

Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Rev* 2009; 27: 1-39

Cook SD. *Handbook of Multiple Sclerosis*. 4 wyd., Taylor & Francis Group, LLC. Nowy Jork, 2006

Dastidar P, Heinonen T, Lehtimäki T, Ukkonen M, Peltola J, Eirilä T, Laasonen E, Elovaara I. Volumes of brain atrophy and plaques correlated with neurological disability in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1999; 165: 36-42

Dinacci D, Tessitore A, Russo A, De Bonis ML, Lavorgna L, Picconi O, Sacco R, Bonavita S, Gallo A, Servillo G, Marcuccio L, Comerci M, Galletti P, Alfano B, Tedeschi G. BDNF Val66Met polymorphism and brain volumes in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2011; 32: 117-123

D'Intino G, Paradisi M, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L, Calzà L. Cognitive deficit associated with cholinergic and nerve growth factor down-regulation in experimental allergic encephalomyelitis in rats. *PNAS* 2005; 102: 3070-3075

Fisher E, Rudick RA, Simon JH, Cutter G, Baier M, Lee JC, Miller D, Weinstock-Guttman B, Mass MK, Dougherty DS, Simonian NA. Eight-year follow-up study of brain atrophy in patients with MS. *Neurology* 2002, 59: 1412-1420

Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Wei L, Mannon LJ, Polansky M, Kolson DL. Brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis and secondary progressive multiple sclerosis: longitudinal quantitative analysis. *Radiology* 2000; 214: 655-670

Giacomini PS, Arnold DL. Non-conventional MRI techniques for measuring neuroprotection, repair and plasticity in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2008; 21: 272-277

Godefroy O, Lhullier-Lamy C, Rousseaux M. SRT lengthening: role of an alertness deficit in frontal damaged patients. *Neuropsychologia* 2002; 40: 2232-2241

Gustafsson MC, Dahlqvist O, Jaworski J, Lundberg P, Landtblom AM. Low choline concentrations in normal-appearing white matter of patients with multiple sclerosis and normal MR imaging brain scans. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007; 28: 1306-1312

Hallböök F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol* 1999, 9: 616-621

Harrington AW, Kim JY, Yoon SO. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 2002; 22: 156-66.

Hardmeier M, Wagenpfeil S, Freiteg P, Fisher E, Rudick RA, Kooijmans-Coutinho M, Clanet M, Radue EW, Kappos L: European rIFN beta-1a in Relapsing MS Dose Comparison Trial Study Group. Atrophy is detectable within a 3-month period in untreated patients with active relapsing remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2003; 60: 1736-1739

t' Hart BA, Gran B, Weissert R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2011; 17: 119-125

Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology* 2009; 73: 696-701

Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: Relevance for repair strategies in multiple sclerosis? *J Neurol Sci* 2008; 265: 93-96

Houtchens MK, Benedict RH, Killiany R, Sharma J, Jaisani Z, Singh B, Weinstock-Guttman B, Guttmann CR, Bakshi R. Thalamic atrophy and cognition in multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 69: 1213-1223

Howard RW. On what intelligence is. *Br J Psychol* 1993; 84: 27-37

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 677-736

Huijbregts SCJ, Kalkers NF, de Sonneville LMJ, de Groot V, Reuling LEW, Polman CH. Differences in cognitive impairment of relapsing remitting, secondary, and primary progressive MS. *Neurology* 2004; 63: 335-339

Jaracz K, Wołowicka L, Baczyk G. Analiza walidacyjna polskiej wersji Indeksu Jakości Życia Ferrans i Powers. *Post Rehabil* 2001; 4: 67-73

Johnson EM, Chang JY, Koike T, Martin DP. Why do neurons die when deprived of trophic factors? *Neurobiol Aging* 1989; 10: 549-552

Jones JL, Anderson JM, Phuah CL, Fox EJ, Selmaj K, Margolin D, Lake SL, Palmer J, Thompson SJ, Wilkins A, Webber DJ, Compston DA, Coles AJ. Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity. *Brain* 2010; 133: 2232-2247

Kalkers NF, Ameziane N, Bot JC, Minneboo A, Polman CH, Barkhof F. Longitudinal brain volume measurement in multiple sclerosis: rate of brain atrophy is independent of the disease subtype. *Arch Neurol* 2002; 59: 1572-1576

Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 381-391

Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Initiation of immune response in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173: 2353-2361

Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: Implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 2003; 53: 292-304

Khoury S, Bakshi R. Cerebral atrophy or real atrophy after therapy in multiple sclerosis *Ann Neurol* 2010; 68: 778-779

Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 2001; 21: 5854-5863

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8856-8860

Krupp LB, Christodoulou C, Melville P, Scherl WF, MacAllister WS, Elkins LE. Donepezil improved memory in multiple sclerosis in a randomized clinical trial. *Neurology* 2004; 63: 1579-1585

Kujala P, Portin R, Ruutiainen J. Memory deficits and early cognitive deterioration in MS. *Acta Neurol Scand* 1996; 93: 329-335

Laliv PH, Kantengwa S, Benkhoucha M, Juillard C, Chofflon M. Interferon- β induces brain-derived neurotrophic factor in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2008; 197: 147-151

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; 294: 1945-1948

Levimontalcini R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1952; 350: 158-160

Lewin GR, Barde Y-A. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neuroscience* 1996; 19: 289-317

Lin SY, Wu K, Levine ES, Mount HT, Suen PC, Black IB. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 55: 20-27

Linker R, Lee D-H, Siglienti I, Gold R. Is there a role for neurotrophins in the pathology of multiple sclerosis? *J Neurol* 2007; 254 (suppl 1): I/33-I/40

Linker RA, Gold R, Lühder F. Function of neurotrophic factors beyond the nervous system: inflammation and autoimmune demyelination. *Crit Rev Immunol* 2009; 29: 43-68

Linker RA, Lee DH, Demir S, Wiese S, Kuse N, Siglienti I, Gerhardt E, Neumann H, Sendtner M, Luehder F, Gold R. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain* 2010, 133: 2248-2263

Losy J, Kalinowska-Łyszczarz A. Emerging disease-modifying oral therapies for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2011; 231: 15-22

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275

Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1931-1936

McDonald WI, Miller DH, Barnes D. The pathological evolution of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1992; 18: 319-334

McDonald I, Compston A. The symptoms and signs of multiple sclerosis. W: McAlpine's Multiple Sclerosis, 4 wyd., red. Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Werkerle H; Churchill Livingstone Elsevier, 2006, 287-346

Miller DH, Rudge P, Johnson G, Kendall BE, Macmanus DG, Moseley IF, Barnes D, McDonald WI. Serial gadolinium enhanced magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Brain* 1988; 111: 927-939

Miller D, McDonald I, Smith K. The diagnosis of multiple sclerosis. W: McAlpine's Multiple Sclerosis, 4 wyd., red. Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Werkerle H; Churchill Livingstone Elsevier, 2006, 351-373

Mo L, Yang Z, Zhang A, Li X. The repair of the injured adult rat hippocampus with NT-3-chitosan carriers. *Biomaterials* 2010; 31: 2184-2192

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 938-952

Noseworthy J, Miller D, Compston A. Disease-modifying treatments in multiple sclerosis. W: McAlpine's Multiple Sclerosis, 4 wyd., red. Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Werkerle H.; Churchill Livingstone Elsevier, 2006, 729-802

Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 1971; 9: 97-113

Ombredane A. Les Troubles Mentaux de la Sclérose en Plaques. Presses Universitaires de France, Paryż 1929

Ormerod IE, Miller DH, McDonald WI, du Boulay EP, Rudge P, Kendall BE, Moseley IF, Johnson G, Tofts PS, Halliday AM. The role of NMR imaging in the assessment of multiple sclerosis and isolated neurological lesions. A quantitative study. *Brain* 1987; 110: 1579-1616

Patanella AK, Zinno M, Quaranta D, Nociti V, Frisullo G, Gainotti G, Tonali PA, Batocchi AP, Marra C. Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* 2010; 88: 1106-1112

Peterson LK, Fujinami RS. Inflammation, Demyelination, Neurodegeneration and Neuroprotection in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007; 184: 37-44

Piras MR, Magnano I, Canu EDG, Paulus KS, Satta WM, Soddu A, Conti M, Achene A, Solinas G, Aiello I. Longitudinal study of cognitive dysfunction in multiple sclerosis: neuropsychological, neuroradiological and neurophysiological findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2003; 74: 878-885

Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58: 840-846

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 899-910

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

Pradat PF, Kennel P, Naimi-Sadaoui S, Finiels F, Orsini C, Revah F, Delaere P, Mallet J. Continuous delivery of neurotrophin 3 by gene therapy has a neuroprotective effect in experimental models of diabetic and acrylamide neuropathies. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 2237– 2249

Pradat PF, Kennel P, Naimi-Sadaoui S, Finiels F, Scherman D, Orsinim C, Delaere P, Mallet J, Revah F. Viral and non-viral gene therapy partially prevents experimental cisplatin-induced neuropathy. *Gene Ther* 2002; 19: 1333– 1337

R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2010. ISBN 3-900051-07-0

Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 2002; 296: 868-871

Ramasamy DP, Benedict RH, Cox JL, Fritz D, Abdelrahman N, Hussein S, Minagar A, Dwyer MG, Zivadinov R. Extent of cerebellum, subcortical and cortical atrophy in patients with MS: a case-control study. *J Neurol Sci* 2009; 282: 47-54

Rao SM, Leo GJ, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. Frequency patterns, and prediction. *Neurology* 1991; 41: 685-691

Rasouly D, Rahamim E, Lester D, Matsuda Y, Lazarovici P. Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of protein kinase C inhibition. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 35-43

Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1545-1564

Roca M, Torralva T, Meli F, Fiol M, Calcagno ML, Carpintiero S, De Pino G, Ventrice F, Martin ME, Vita L, Manes F, Correale J. Cognitive deficits in multiple sclerosis correlate with changes in fronto-subcortical tracts. *Mult Scler* 2008; 14: 364-369

Ron MA, Callanan MM, Warrington EK. Cognitive abnormalities in multiple sclerosis: a psychometric and MRI study. *Psychol Med* 1991; 21: 59-68

Roosendaal SD, Moraal B, Pouwels PJ, Vrenken H, Castelijns JA, Barkhof F, Geurts JJ. Accumulation of cortical lesions in MS: relation with cognitive impairment. *Mult Scler* 2009; 15: 708-714

Rorden C, Karnath HO, Bonilha L. Improving lesion-symptom mapping. *J Cogn Neurosci* 2007; 19: 1081-1088

Rosti-Otajärvi E, Hämäläinen P, Koivisto K, Hokkanen L. The reliability of the MSFC and its components. *Acta Neurol Scand* 2008; 117: 421-427

Roux PP, Dorval G, Boudreau M, Angers-Loustau A, Morris SJ, Makkerh J, Barker PA. K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK. *J Biol Chem*. 2002; 277: 49473-49480

Rovaris M, Comi G, Rocca MA, Wolinsky JS, Filippi M: European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. Short-term brain volume change in relapsing-remitting multiple sclerosis: effect of glatiramer acetate and implications. *Brain* 2001; 124: 1803-1812

Rudick RA, Fisher E, Lee JC, Simon J, Jacobs L. Use of the brain parenchymal fraction to measure whole brain atrophy in relapsing-remitting MS. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology* 1999; 53: 1698-1704

Sadovnick AD, Yee IM, Ebers G; Canadian Collaborative Study Group. Recurrence risks to sibs of MS index cases: impact of consanguineous matings. *Neurology* 2001; 56: 784-785

Sahenk Z, Galloway G, Edwards C, Malik V, Kaspar BK, Eagle A, Yetter B, Forgie A, Tsao D, Lin JC. TrkB and TrkC agonist antibodies improve function, electrophysiologic and pathologic features in Trembler J mice. *Exp Neurol*. 2010; 224: 495-506

Seiffer W. Über psychische, insbesondere Intelligenzstörungen bei multipler Sklerose. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1905; 40: 252–303

Selmaj K. Stwardnienie rozsiane. Termedia Wydawnictwo Medyczne, Poznań 2006

Shibata A, Zelivyanskaya M, Limoges J, Carlson KA, Gorantla S, Branecki C, Bishu S, Xiong H, Gendelman HE. Peripheral nerve induces macrophage neurotrophic activities: regulation of neuronal process outgrowth, intracellular signaling and synaptic function. *J Neuroimmunol* 2003; 142: 112-129

Sicotte NL, Kern KC, Giesser BS, Arshanapalli A, Schultz A, Montag M, Wang H, Bookheimer SY. Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis. *Brain* 2008; 131(Pt 4): 1134-1141

Siedlecki T, Kowalski H. Podstawy teoretyczne badań obrazowych. Rezonans magnetyczny. W: Pruszyński B. red. Radiologia. Diagnostyka obrazowa. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002

Simon JH, Li D, Traboulsee A, Coyle PK, Arnold DL, Barkhof F, Frank JA, Grossman R, Paty DW, Radue EW, Wolinsky JS. Standardized MR imaging protocol for multiple sclerosis: consortium of MS Centers consensus guidelines. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 455–461

Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TE, Johansen-Berg H, Bannister PR, De Luca M, Drobnjak I, Flitney DE, Niazy RK, Saunders J, Vickers J, Zhang Y, De Stefano N, Brady JM, Matthews PM. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage* 2004, 23(S1): 208-219

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683-747

Sørensen PS, Haas J, Sellebjerg F, Olsson T, Ravnborg M. IV immunoglobulins as add-on treatment to methylprednisolone for acute relapses in MS. *Neurology* 2004; 63: 2028–2033

Spreen O, Strauss E. A compendium of neuropsychological tests. 2 wyd. Oxford University Press, Nowy Jork, Oxford, 1998

Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Brück W, Hohlfeld R, Lassmann H. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 2002; 125 (Pt 1): 75-85

Steinman L, Zamvil S. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis ro research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006; 60: 12-21

Stoquart-ElSankari S, Bottin C, Roussel-Pieronne M, Godefroy O. Motor and cognitive slowing in multiple sclerosis: An attentional deficit? *Clin Neurol Neurosurg* 2010; 112: 226-232

Stys PK. Multiple sclerosis: autoimmune disease or autoimmune reaction? *Can J Neurol Sci.* 2010; 37 Suppl 2: S16-23

Sundqvist E, Bäärnhielm M, Alfredsson L, Hillert J, Olsson T, Kockum I. Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18: 1349-1352

Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, Miszkiel KA, Thompson AJ, Plant GT, Miller DH. Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 830–833

Swanton JK, Rovira A, Tintoré M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, Huerga E, Miszkiel KA, Plant GT, Polman C, Rovaris M, Thompson AJ, Montalban X, Miller DH. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 2007; 6: 677–686

Tabakman R, Lecht S, Sephanova S, Arien-Zakay H, Lazarovici P. Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. *Prog Brain Res* 2004; 146: 387-401

Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003; 53: 189-197

Thoenen H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res* 2000; 128: 183-191

Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Sastre-Garriga J, Pericot I, Sánchez E, Comabella M, Montalban X. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. *Neurology* 2003; 60: 27-30

Tucker K, Fadool DA. Neurotrophin modulation of voltage-gated potassium channels in rat through TrkB receptors is time and sensory experience dependent. *J Physiol* 2002; 542: 413-429

Urfer R, Tsoulfas P, Soppet D, Escandón E, Parada LF, Presta LG. The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors trkC and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin. *EMBO J* 1994; 13: 5896-5909

Urshansky N, Mausner-Fainberg K, Auriel E, Regev K, Farhum F, Karni A. Dysregulated neurotrophin mRNA production by immune cells of patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2010; 295: 31-37

Vega JA, García-Suárez O, Hannestad J, Pérez-Pérez M, Germanà A. Neurotrophins and the immune system. *J Anat* 2003; 203: 1-19

Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 2002; 420: 74-78

Warrington AE, Rodriguez M. *Regeneration Strategies for Multiple Sclerosis*. W: Cook SD. *Handbook of Multiple Sclerosis*. 4 wyd. Taylor & Francis Group, LLC. Nowy Jork, 2006

Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Tamano-Blanco M, et al. Immune cell BDNF secretion is associated with white matter volume in multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* 2007; 188: 167-174

Weinstock-Guttman B, Benedict RH, Tamaño-Blanco M, Ramasamy DP, Stosic M, Polito J, Zivadinov R, Ramanathan M. The rs2030324 SNP of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with visual cognitive processing in multiple sclerosis. *Pathophysiology* 2011; 18: 43-52

Wekerle H, Lassmann H. The immunology of inflammatory demyelinating disease. W: McAlpine's Multiple Sclerosis, 4 wyd.; red. Compston A, Confavreux C, Lassmann H, McDonald I, Miller D, Noseworthy J, Smith K, Wekerle H; Churchill Livingstone Elsevier, 2006, 491-555

Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM. A p75 (NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 2002; 5: 1302-1308

Woolrich, Jbabdi S, Patenaude B, Chappell M, Makni S, Behrens T, Beckmann C, Jenkinson M, Smith SM. Bayesian analysis of neuroimaging data in FSL. *NeuroImage* 2009; 45: S173-186

Xie CW, Sayah D, Chen QS, Wei WZ, Smith D, Liu X. Deficient long-term memory and long-lasting long-term potentiation in mice with a targeted deletion of neurotrophin-4 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 8116-8121

Yong VW, Marks S. The interplay between the immune and central nervous systems in neuronal injury. *Neurology* 2010; 74 (Suppl 1): S9-S16

Zarei M, Chandran S, Compston A, Hodges J. Cognitive presentation of multiple sclerosis: evidence for a cortical variant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 872-877

Zhang J, Vandevyver C, Stinissen P, Mertens N, van den Berg-Loonen E, Raus J. Activation and clonal expansion of human myelin basic protein-reactive T cells by bacterial superantigens. *J Autoimmun* 1995; 8: 615-632

Zhang Y, Brady M, Smith S. Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Trans Med Imaging* 2001; 20: 45-57

Ziehn MO, Avedisian AA, Tiwari-Woodruff S, Voskuhl RR. Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. *Lab Invest* 2010; 90: 774-786

Zipoli V, Goretti B, Hakiki B, Siracusa G, Sorbi S, Portaccio E, Amato MP. Cognitive impairment predicts conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2010; 16: 62-67

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 2006; 9: 268-275

Zivadinov R, Sepcic J, Nasuelli D, De Masi R, Bragadin LM, Tommasi MA, Zambito-Marsala S, Moretti R, Bratina A, Ukmar M, Pozzi-Mucelli RS, Grop A, Cazzato G, Zorzon M. A longitudinal study of brain atrophy and cognitive disturbances in the early phase of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2001; 70: 773-380