

Lek. Tomasz Grzegorski

**Analiza stężeń
wybranych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych
w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym
we wczesnym okresie postaci rzutowo-remisyjnej
stwardnienia rozsianego**

**Rozprawa
na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Prof. zw. dr hab. n. med. Jacek Losy

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Jolanta Florczak-Wyspiańska

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



**Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Poznań, 2020

Słowa kluczowe:

stwardnienie rozsiane, postać rzutowo-remisyjna, wczesny okres, cytokiny, surowica, płyn mózgowo-rdzeniowy, stężenie, IL-2, IL-10, TNF- α , TGF- β , limfocyty Treg, kryteria McDonalda 2017

Keywords:

multiple sclerosis, relapsing-remitting multiple sclerosis, early phase, cytokines, serum, cerebrospinal fluid, concentration, IL-2, IL-10, TNF- α , TGF- β , Treg cells, the 2017 McDonald criteria

Wyrazy wdzięczności za nadzór merytoryczny
i poświęcony czas pragnę złożyć
mojemu Promotorowi, Nauczycielowi i Mentorowi,
Panu Prof. dr hab. Jackowi Losemu

Pracę dedykuję Pacjentom

Spis treści

Spis tabel	8
Spis rycin	10
Wykaz skrótów	11
1. Zarys stwardnienia rozsianego	14
1.1. Definicja	14
1.2. Wybrane aspekty historii SM	14
1.3. Etiopatogeneza	18
1.3.1. Immunopatogeneza	19
1.3.2. Neurodegeneracja	25
1.4. Czynniki ryzyka	26
1.4.1. Infekcje	26
1.4.2. Czynniki genetyczne	28
1.4.3. Niedobór witaminy D ₃	28
1.4.4. Palenie tytoniu	29
1.4.5. Otyłość	30
1.4.6. Nadmierne spożywanie soli	31
1.5. Postaci kliniczne	32
1.6. Epidemiologia	32
1.7. Obraz kliniczny	33
1.7.1. Objawy kliniczne	33
1.7.2. Neuroradiologia	35
1.7.3. Analiza płynu mózgowo-rdzeniowego	36
1.7.4. Potencjały wywołane i optyczna koherentna tomografia	37
1.8. Diagnostyka	37
1.9. Ocena aktywności choroby	39
1.10. Leczenie	40
1.10.1. Leczenie rzutu	40
1.10.2. Leczenie modyfikujące przebieg choroby	40
1.10.3. Leczenie objawowe	42
2. Limfocyty T regulatorowe i cytokiny związane z ich funkcją	43
2.1. Limfocyty T regulatorowe (Treg)	43

2.2. Wybrane cytokiny prozapalne i przeciwzapalne	46
2.2.1. Interleukina 2.....	46
2.2.2. Czynn timer martwicy nowotworów – α	48
2.2.3. Interleukina 10.....	49
2.2.4. Transformujący czynnik wzrostu – β	51
3. Cele pracy	57
3.1. Cele ogólne	57
3.2. Cele szczegółowe	57
4. Materiał i metody	58
4.1. Osoby badane	58
4.1.1. Grupa RRMS-rzut.....	59
4.1.2. Grupa RRMS-remisja	60
4.1.3. Grupa kontrolna.....	61
4.2. Badanie neuroobrazowe	62
4.3. Badanie immunoenzymatyczne i obliczanie indeksów cytokin	62
4.4. Opracowanie statystyczne	65
5. Wyniki	66
5.1. Charakterystyka badanych grup.....	66
5.2. Analiza statystyczna struktury płci	67
5.3. Analiza statystyczna struktury wieku	68
5.4. Analiza porównawcza stężeń IL-2	69
5.4.1. Surowica.....	69
5.4.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy.....	70
5.5. Analiza porównawcza stężeń TNF- α	70
5.5.1. Surowica.....	70
5.5.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy.....	71
5.6. Analiza porównawcza stężeń IL-10	73
5.6.1. Surowica.....	73
5.6.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy.....	73
5.7. Analiza porównawcza stężeń TGF- β 2.....	74
5.7.1. Surowica.....	74
5.7.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy.....	74
5.8. Analiza porównawcza stężeń IL-2 w zależności od aktywności choroby w MRI	76

5.9. Analiza porównawcza stężeń TNF- α w zależności od aktywności choroby w MRI	77
5.10. Analiza porównawcza stężeń IL-10 w zależności od aktywności choroby w MRI	78
5.11. Analiza porównawcza stężeń TGF- β 2 w zależności od aktywności choroby w MRI	79
5.12. Analiza porównawcza wartości indeksu IL-2	81
5.13. Analiza porównawcza wartości indeksu TNF- α	81
5.14. Analiza porównawcza wartości indeksu IL-10	83
5.15. Analiza porównawcza wartości indeksu TGF- β 2	83
5.16. Analiza porównawcza wartości indeksu IL-2 w zależności od aktywności choroby w MRI	84
5.17. Analiza porównawcza wartości indeksu TNF- α w zależności od aktywności choroby w MRI	84
5.18. Analiza porównawcza wartości indeksu IL-10 w zależności od aktywności choroby w MRI	85
5.19. Analiza porównawcza wartości indeksu TGF- β 2 w zależności od aktywności choroby w MRI	85
5.20. Analiza zależności wartości indeksu IgG od stężeń cytokin	86
5.21. Analiza korelacji między stężeniami cytokin a czasem trwania rzutu.	87
5.22. Analiza korelacji pomiędzy wartościami indeksów cytokin a czasem trwania rzutu	88
5.23. Podsumowanie wyników	89
6. Dyskusja	89
6.1. Znaczenie biomedyczne	89
6.2. Przegląd dotychczasowych badań	90
6.3. Analiza porównawcza dotychczasowych badań	95
6.4. Pojęcie „wczesny okres choroby” w odniesieniu do RRMS	99
6.5. Uwagi dotyczące czasu trwania rzutu	100
6.6. Znaczenie przyjętych kryteriów rozpoznania SM	101
6.7. Niepowodzenia dotyczące pomiaru stężeń cytokin	102
6.8. Dobór pacjentów do grup RRMS-rzut i RRMS-remisja	103
6.9. Interpretacja wyników	103
6.10. Zalety i ograniczenia badania	105

7. Wnioski końcowe.....	106
Streszczenie w języku polskim	107
Streszczenie w języku angielskim.....	109
Podziękowania.....	111
Piśmiennictwo.....	112
Zgoda Komisji Bioetycznej.....	141
Zgoda Komisji Bioetycznej (aneks).....	142

ZAŁĄCZNIKI:

- Załącznik nr 1 — Charakterystyka pacjentów ze stężeniem IL-2 w surowicy powyżej progu czułości metody ELISA
- Załącznik nr 2 — A. Charakterystyka pacjentów ze stężeniem IL-2 w PMR powyżej progu czułości metody ELISA
- B. Charakterystyka pacjentów ze stężeniem IL-10 w PMR powyżej progu czułości metody ELISA

Spis tabel

Tabela 1. Leki modyfikujące przebieg choroby stosowane w SM i czas ich wprowadzenia na rynek medyczny	18
Tabela 2. Najważniejsze objawy SM i ich rozpowszechnienie	34
Tabela 3. Zestawienie obecnie stosowanych DMDs w terapii SM	41
Tabela 4. Zestawienie podstawowych cech IL-2, TNF- α , IL-10 i TGF- β	54
Tabela 5. Charakterystyka demograficzna i kliniczna badanych grup	66
Tabela 6. Zestawienie danych dotyczących wieku pacjentów.....	68
Tabela 7. Zestawienie danych dotyczących stężenia IL-2 w surowicy	69
Tabela 8. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TNF- α w surowicy pomiędzy grupami.....	70
Tabela 9. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TNF- α w PMR pomiędzy grupami	71
Tabela 10. Statystyka opisowa i porównanie stężeń IL-10 w surowicy pomiędzy grupami.....	73
Tabela 11. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TGF- β 2 w surowicy pomiędzy grupami.....	74
Tabela 12. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TGF- β 2 w PMR pomiędzy grupami.....	74
Tabela 13. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TNF- α w zależności od aktywności w MRI	77
Tabela 14. Statystyka opisowa i porównanie stężeń IL-10 w zależności od aktywności w MRI	78
Tabela 15. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TGF- β 2 w zależności od aktywności w MRI	79
Tabela 16. Statystyka opisowa i porównanie wartości indeksu TNF- α w badanych grupach.....	81
Tabela 17. Statystyka opisowa i porównanie wartości indeksu TGF- β 2 w badanych grupach.....	83
Tabela 18. Statystyka opisowa i porównanie wartości indeksu TNF- α w zależności od aktywności w MRI	84
Tabela 19. Statystyka opisowa i porównanie wartości indeksu TGF- β 2 w zależności od aktywności w MRI	85

Tabela 20. Zestawienie danych dotyczących wartości indeksu IgG w badanych grupach	86
Tabela 21. Zależność wartości indeksu IgG od stężeń cytokin w surowicy i PMR w badanych grupach	86
Tabela 22. Zestawienie danych dotyczących czasu trwania rzutu SM u badanych pacjentów	87
Tabela 23. Zależność pomiędzy stężeniami cytokin w surowicy i PMR, a czasem trwania rzutu	87
Tabela 24. Zależność pomiędzy wartościami indeksów cytokin, a czasem trwania rzutu	88

Spis rycin

Rycina 1. Procesy w etiopatogenezie SM.....	19
Rycina 2. Immunopatogeneza SM.....	20
Rycina 3. Schematyczne przedstawienie limfocytu Treg	45
Rycina 4. Wybrane aspekty sieci IL-2.....	47
Rycina 5. Wybrane aspekty sieci TNF- α	49
Rycina 6. Wybrane aspekty sieci IL-10	51
Rycina 7. Wybrane aspekty sieci TGF- β	53
Rycina 8. Sieć funkcjonalna i rola limfocytów Treg w patogenezie SM.....	56
Rycina 9. Test ELISA w wersji kanapkowej	63
Rycina 10. Struktura płci w badanych grupach	67
Rycina 11. Wiek pacjentów w grupach (średnia $\pm$ błąd std. $\pm$ odch. std.)	68
Rycina 12. Wiek pacjentów w grupach (mediana $\pm$ 25%-75% $\pm$ min-maks). ...	69
Rycina 13. Stężenie TNF- α w PMR (średnia $\pm$ błąd std. $\pm$ odch. std.)	72
Rycina 14. Stężenie TNF- α w PMR (mediana $\pm$ 25%-75% $\pm$ min-maks)	72
Rycina 15. Stężenie TGF- β 2 w PMR (średnia $\pm$ błąd std. $\pm$ odch. std.)	75
Rycina 16. Stężenie TGF- β 2 w PMR (mediana $\pm$ 25%-75% $\pm$ min-maks)	76
Rycina 17. Stężenia TGF- β 2 w surowicy w grupie RRMS-rzut w zależności od aktywności choroby w MRI (średnia $\pm$ błąd std. $\pm$ odch. std.).....	80
Rycina 18. Stężenia TGF- β 2 w surowicy w grupie RRMS-rzut w zależności od aktywności choroby w MRI (mediana $\pm$ 25%-75% $\pm$ min-maks)....	80
Rycina 19. Wartości indeksów TNF- α w badanych grupach (średnia $\pm$ błąd std. $\pm$ odch. std.)	82
Rycina 20. Wartości indeksów TNF- α w badanych grupach (mediana $\pm$ 25%-75% $\pm$ min-maks)	82

Wykaz skrótów

APCs	— komórki prezentujące antygen (ang. antigen presenting cells)
BKM	— bariera krew–mózg
BMI	— współczynnik masy ciała (ang. body mass index)
CAT	— tomografia komputerowa osiowa (ang. computerized axial tomography)
CIS	— zespół klinicznie izolowany (ang. clinically isolated syndrome)
CRP	— białko C – reaktywne (ang. c – reactive protein)
CSF	— płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. cerebrospinal fluid)
CSIF	— czynnik hamujący syntezę cytokin (ang. cytokine synthesis inhibitory factor)
CSPG	— proteoglikan siarczanu chondroityny (ang. chondroitin sulfate proteoglycan)
CTLA-4	— antigen–4 limfocytów T cytotoksycznych (ang. cytotoxic T cell antigen–4)
DIS	— rozsianie w przestrzeni (ang. dissemination in space)
DMDs	— leki modyfikujące przebieg choroby (ang. disease modifying drugs)
DMT	— terapia modyfikująca przebieg choroby (ang. disease modifying therapy)
EBNA-1	— Epstein’a–Barr antygen jądrowy–1 (ang. Epstein–Barr nuclear antigen–1)
EBV	— wirus Epstein – Barr (ang. Epstein – Barr virus)
EDSS	— rozszerzona skala oceny niesprawności (ang. expanded disability status scale)
ELISA	— test immunoenzymatyczny (ang. enzyme – linked immunosorbent assay)
EPH	— efryna
FGF-2	— czynnik wzrostu fibroblastów-2 (ang. fibroblast growth factor-2)
FLAIR	— ang. fluid-attenuated inversion recovery
FSE	— szybkie echo spinowe (ang. fast spin - echo)
GAP-43	— białko związane ze wzrostem–43 (ang. growth - associated protein–43)
HHV-6	— ludzki wirus herpes typu 6 (ang. human herpesvirus 6)
HLA	— ludzkie antygeny leukocytarne (ang. human leukocyte antigens)
HS	— wysokiej czułości (ang. high sensitivity)
HSV	— wirus opryszczki pospolitej (ang. herpes simplex virus)
HTLV-1	— ludzki, T–limfotropowy wirus–1 (ang. Human, T–lymphotropic virus–1)
ICAM-1	— międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna–1 (ang. intercellular adhesion molecule-1)
IFN-γ	— interferon-γ
Komórki NK	— komórki “naturalni zabójcy” (ang. natural killer cells)

LAG-3 — gen aktywacji limfocytu-3 (ang. lymphocyte – activation gene-3)

LFA-1 — antygen związany z funkcją limfocytów-1 (ang. lymphocyte function-associated antigen-1)

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

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

MHC — główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)

MOG — glikoproteina mieliny oligodendrocytów (ang. myelin oligodendrocytes glycoprotein)

MR — rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance)

MRI — obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging)

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

OCT — optyczna koherentna tomografia (ang. optical coherence tomography)

OUN — ośrodkowy układ nerwowy

PCR — łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

PECAM-1 — płytkowa cząsteczka adhezyjna komórek śródbłónka-1 (ang. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1)

PLP — białko proteolipidu (ang. proteolipid protein)

PMR — płyn mózgowo-rdzeniowy

PPMS — postać pierwotnie postępująca stwardnienia rozsianego (ang. Primary progressive multiple sclerosis)

PW — potencjały wywołane

RRMS — postać rzutowo-remisyjna stwardnienia rozsianego (ang. Relapsing-remitting multiple sclerosis)

SM — stwardnienie rozsiane (łac. sclerosis multiplex)

SPMS — postać wtórnie postępująca stwardnienia rozsianego (ang. Secondary progressive multiple sclerosis)

TGF- β — transformujący czynnik wzrostu- β (ang. transforming growth factor- β)

TLR9 — receptor toll – podobny 9 (ang. toll – like receptor 9)

TNFSF — nadrodzina czynnika martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor superfamily)

TNF- α — czynnik martwicy nowotworów- α (ang. tumor necrosis factor- α)

Treg cells, Tregs — limfocyty T regulatorowe (ang. T regulatory cells)

- VCAM-1 — cząsteczka adhezyjna komórek naczyń-1 (ang. vascular cell adhesion molecule-1)
- VDR — receptor witaminy D (ang. vitamin D receptor)
- VGCC — bramkowane napięciem kanały wapniowe (ang. voltage – gated calcium channels)
- VZV — wirus ospy wietrznej i półpaśca (ang. varicella zoster virus)

1. Zarys stwardnienia rozsianego

1.1. Definicja

Stwardnienie rozsiane (łac. sclerosis multiplex, SM) jest przewlekłą, zapalno-degeneracyjną, narządowo-swoistą chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu demielinizacyjnym i charakterze postępującym, której patomechanizm nie został do tej pory w pełni poznany. Złożone mechanizmy immunologiczne odpowiedzialne są za wieloogniskowe zniszczenie osłonki mielinowej (demyelinizację), jej odbudowę (remielinizację), utratę aksonów oraz rozplem komórek glejowych. Wspomniane cztery procesy patologiczne odpowiedzialne są za wieloogniskowość i różnoczesowość objawów klinicznych choroby [1, 2].

1.2. Wybrane aspekty historii SM

Z pewnością SM występuje od wieków. Jego objawy i przebieg zawsze wywoływały duże zaniepokojenie samych chorych oraz ich rodzin, jak również chęć wyjaśnienia przyczyn choroby. Z uwagi na jedynie szczątkową dokumentację i brak istotnych szczegółów niewiele wiadomo o postrzeganiu, rozpoznawaniu i próbach leczenia choroby w okresach wcześniejszych niż XIX w.

Uważa się, że pierwszy opis przypadku SM pochodzi z XIV w. i dotyczy kobiety o imieniu Lidwina, która pochodziła ze Schiedam (Holandia) [3, 4]. Przypuszcza się, że chorowała na SM przez ponad 30 lat. Pewnego dnia doznała upadku podczas jazdy na łyżwach. Od czasu tego zdarzenia wystąpiły u niej trudności w poruszaniu się, które (podobnie jak sam upadek na łyżwach) mogły być spowodowane istniejącym wcześniej niedowładem kończyn dolnych. Z czasem zaczęła skarżyć się na ból zębów, za który mogła być odpowiedzialna występująca niekiedy w przebiegu choroby neuralgia nerwu trójdzielnego. W późniejszym okresie dołączył się też niedowład prawej kończyny górnej, zaburzenia połykania, widzenia oraz dalsze, postępujące trudności w chodzeniu. W średniowieczu uważano, że takie objawy zsyłane są bezpośrednio przez Boga – jako kara za grzechy własne i / lub cudze, albo jako swoiste wyróżnienie i powołanie do męczeństwa. Lidwina była podziwiana przez otaczających ludzi. W miejscu jej grobu wybudowano kaplicę. Z kolei w otoczeniu jej miejsca

zamieszkania powstał szpital. Ostatecznie została beatyfikowana i kanonizowana przez papieża Leona XIII w 1890 r. [3, 4].

Naukowe dociekania co do przyczyn i natury SM miały swój początek w XVIII w., a rozwinęły się na szerszą skalę dopiero w XIX w. Początkowo powstawały coraz liczniejsze opisy przypadków SM. Naturę schorzenia po raz pierwszy nazwał w 1866 r. Edmé Vulpian, który użył określenia: „sclérose en plaques disseminées” [5]. Główne zasługi przypisuje się jednak paryskiemu lekarzowi i badaczowi Jean Martin Charcot’owi (1825 – 1893), który poprzez swoje liczne badania i wykłady rozpowszechnił wiedzę o tej chorobie wśród ówczesnych neurologów. Opisał on zarówno jej kliniczne jak i neuropatologiczne cechy. Związany był z ważnym paryskim ośrodkiem – Salpêtrière. Jego badania nad SM rozpoczęły się, gdy zauważył on zaburzenia ruchowe u swojej pokojówki, które uniemożliwiały jej wykonywanie swojej pracy. Początkowo podejrzewał kiłę OUN, która była wówczas chorobą bardzo rozpowszechnioną. Miał niepowtarzalną okazję dokładnie obserwować i śledzić przebieg jej schorzenia, co dostarczyło mu cennych danych. Gdy kobieta zmarła, przeprowadził badanie sekcyjne jej mózgowia i rdzenia kręgowego. Stwierdził obecność licznych, rozsianych ognisk (plak). Niewątpliwą, często wymienianą zasługą Charcot’a jest powiązanie zaburzeń poznawczych z SM. Wcześniej uważano bowiem, że nie mogą one wystąpić w przebiegu tej choroby. Jego darmowe i otwarte wykłady przyniosły mu międzynarodową sławę. Do 1921 r. schorzenie określane było eponimem „choroba Charcot’a”. Obecnie jednak eponim ten zarezerwowany jest dla stwardnienia zanikowego bocznego [4, 6, 7].

Od samego odkrycia choroby zastanawiano się nad jej naturą. Jedną z pierwszych teorii była hipoteza naczyniowa. Wywodziła się ona z obserwacji Eduarda Rindfleisch’a, który dostrzegł w centrum plak naczynia. Wysłunięto jednak podejrzenie, że „naczynia” dostrzeżone przez Rindfleisch’a to ogniska lokalnej zakrzepicy. W wyniku takich spekulacji nawet jeszcze w XX w. nie wykluczano terapii antykoagulantami jako właściwego leczenia SM [8, 9]. W 1875 r. Moxon wysunął hipotezę, w myśl której SM jest w swoim rozsianiu podobna do chorób wysypkowych [10]. W 1878 r. Hamilton stwierdził z kolei, że schorzenie może zostać wywołane przez ekspozycję na zimno, a nawet stres [11]. Punktem przełomowym było zaproponowanie przez Pierre’a Marie w 1895 r. teorii, wg której czynnikiem spustowym choroby jest infekcja [12, 13]. Do dziś nie została ona potwierdzona ani obalona – jest aktualnie przedmiotem szerokiej debaty. Skoro choroba miałaby być wywoływana przez

patogen, to czymś niewątpliwie rozsądnym byłoby poszukiwanie właściwej szczepionki. Dlatego też prace wielu uczonych XIX w. miały na celu jej wynalezienie. Za najbardziej prawdopodobne czynniki chorobotwórcze uważane były wirusy oraz krętki. Dlatego aż do II wojny światowej w terapii SM stosowane były leki wykorzystywane wówczas w leczeniu kiły. W XX w. popularyzowano też teorię, że czynnikiem wywołującym schorzenie jest toksyna, co skłaniało wielu badaczy do jej poszukiwania [14, 15]. Jednak dopiero Glanzmann w 1932 r. i Rivers w 1935 r. zaproponowali, że SM może być chorobą o podłożu immunologicznym [16, 17]. Hipoteza ta szczególnie rozwinęła się w latach 60-tych i 70-tych XX w. Jednak pomimo licznych i kosztownych badań prowadzonych od wielu lat w licznych krajach świata, w dalszym ciągu immunopatogeneza choroby nie jest całkowicie poznana. Można zatem stwierdzić, że historia badań nad naturą SM w dalszym ciągu się toczy i nie wiadomo jak zaskakujące i ciekawe punkty będzie w przyszłości zawierać.

Nakłucie lędźwiowe wykonał po raz pierwszy Quincke w 1891 r. Wykonywano je głównie u pacjentów z podejrzeniem kiły OUN albo SM. Pierwszym badaniem o pewnej wartości w różnicowaniu tych jednostek chorobowych był test koloidowy. W 1964 r. Lature odkrył w badaniu metodą elektroforezy żelowej płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) prążki oligoklonalne [4]. W 1980 r. zaprezentowano pierwszy skaner rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance, MR) przeznaczony do użytku komercyjnego. W 1981 r. Doyle i wsp. użyli skanera MR o wartości indukcji magnetycznej 0,15 T w celu zobrazowania mózgowia kilku pacjentów z SM i zdrowych. Okazało się, że badanie MR pozwala precyzyjnie zróżnicować istotę szarą i białą oraz uwidocznicić plaki demielinizacyjne [4, 18]. Kolejne próby użycia MR wykazały jego zdecydowaną przewagę nad stosowaną wcześniej w diagnostyce SM tomografią komputerową osiową (ang. computerized axial tomography, CAT). Stopniowo powstawało coraz doskonalsze oprogramowanie przeznaczone do obsługi skanerów. W 1986 r. Grossman po raz pierwszy wykazał wzmocnienie w obrazie MR pewnych obszarów po podaniu kontrastu gadolinowego. Tłumaczył, że wzmocnienie to następuje w miejscach uszkodzenia bariery krew – mózg (BKM) [19].

Próby wyjaśnienia przyczyn i natury choroby od samego początku związane były z poszukiwaniem skutecznych metod jej leczenia. Stwardnienie rozsiane zawsze uważane było za chorobę nieuleczalną. Nigdy bowiem nie wynaleziono leku, który spowodowałby wyleczenie. Aż do XX w. próby leczenia tego schorzenia oparte były jedynie na przesłankach empirycznych i zaleceniach klinicystów cieszących się dobrą

reputacją w Europie. Stosowano metody takie jak: stymulacja elektryczna, pokrywanie pacjentów zimnymi, mokrymi ręcznikami, „terapia” zimną wodą, modyfikacja diety, stosowanie strychniny, azotanu srebra, arszeniku, kofeiny, efedryny, alkoholu, wyciągu z kory nadnerczy, witamin, izoniazydu, narkotyków, jodku potasu, hydroterapii, psychoterapii i wielu innych metod [4]. Spastyczność leczono stosując ciepłe kąpiele i ruch bierny. Z uwagi, że podejrzewano czynnik infekcyjny jako kluczowy dla rozwoju choroby często zalecano szczepienia, tonsilektomię czy ekstrakcję zębów. Z uwagi, że jedną z możliwych teorii rozwoju schorzenia była hipoteza Rindfleisch’a, w myśl której odpowiedzialna jest za nie zakrzepica małych naczyń w centrum plak demielinizacyjnych [8], pacjentom podawano leki antykoagulacyjne. Próby stosowania steroidów rozpoczęły się w 1912 r., kiedy Judson Bury dostrzegł zmniejszenie objawów choroby po zastosowaniu wyciągu z kory nadnerczy [20]. Początkowo próby stosowania kortyzolu i ACTH nie były satysfakcjonujące. Próbowano nawet podawać leki intratekalnie, lecz nierzadko skutkowało to zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych. Dożylna steroidoterapia w czasie rzutów choroby (wlew metyloprednizolonu poprzedzony wlewem ACTH) stosowana była od 1961 r. W kolejnych latach stopniowo wycofywano ACTH zastępując go metyloprednizolonem [4]. Druga połowa XX w. przyniosła odkrycie pierwszych leków modyfikujących przebieg choroby (ang. disease modifying drugs, DMDs). Rozpoczęła się era, w której skuteczność leków weryfikowana jest w dużych, podwójnie zaślepionych, randomizowanych badaniach klinicznych. Obecnie obserwujemy wyraźny rozkwit, jeśli chodzi o liczbę i jakość takich badań. Testowane są w ten sposób nowe DMDs, które cechują się wyższą skutecznością i bardziej korzystnym profilem działań niepożądanych. Pomimo tego jednak, w dalszym ciągu nie wynaleziono leku, który pozwoliłby na wyleczenie choroby. Pocieszający jest jednak fakt, że pomimo, iż pozostaje ona nieuleczalna, za pomocą dostępnych leków możemy (przynajmniej u niektórych pacjentów) skutecznie kontrolować jej przebieg i zmniejszyć liczbę rzutów w ciągu roku.

Poniżej zestawiono stosowane w terapii SM DMDs wraz z okresem ich wprowadzenia na rynek medyczny [21].

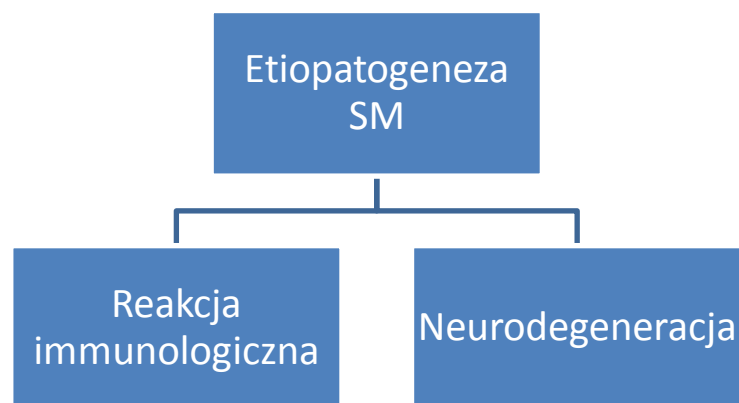
Tabela 1. Leki modyfikujące przebieg choroby stosowane w SM i czas ich wprowadzenia na rynek medyczny

Nazwa leku	Wprowadzenie na rynek medyczny
Interferony	Lata 90-te XX w.
Octan glatirameru	2003 r.
Mitoksantron	2000 r.
Natalizumab	2006 r.
Fingolimod	2011 r.
Teryflunomid	2013 r.
Alemtuzumab	2013 r.
Fumaran dimetylu	2014 r.
Okrelizumab	2018 r.
Kladrybina	2019 r.

1.3. Etiopatogeneza

Chociaż na całym świecie prowadzone są liczne i kosztowne badania naukowe mające na celu wyjaśnienie przyczyn SM, etiopatogeneza choroby pozostaje niewyjaśniona. Wiadomo, że w jej rozwoju ważną rolę pełnią zaburzenia w zakresie działania układu immunologicznego, jednak do tej pory nie ustalono mechanizmu spustowego. Wiadomo także, że już we wczesnym okresie choroby dochodzi do zmian zanikowych mózgowia. Stwardnienie rozsiane wywoływane jest prawdopodobnie na skutek złożonych oddziaływań czynników genetycznych i środowiskowych.

W etiopatogenezie SM istotne są dwa odmienne procesy: reakcja immunologiczna związana z zapaleniem oraz neurodegeneracja. Do tej pory nie ma dowodów który z tych procesów występuje jako pierwszy oraz czy i jak są one wzajemnie powiązane. Ponadto wydaje się, że istnieją czynniki ryzyka, które sprzyjają rozwojowi SM.



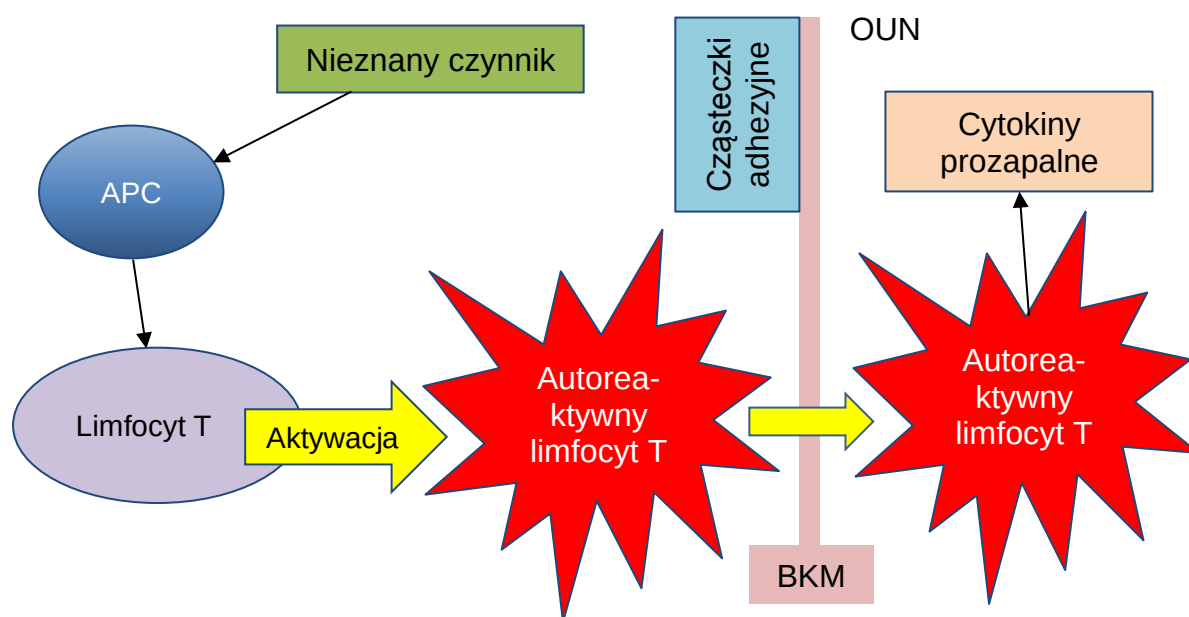
Rycina 1. Procesy w etiopatogenezie SM

1.3.1. Immunopatogeneza

Ośrodkowy układ nerwowy jest obszarem uprzywilejowanym immunologicznie, w efekcie czego nasilenie reakcji immunologicznych i ich negatywne skutki są tu znacznie mniejsze niż na obwodzie. Cechę tą OUN zawdzięcza specyficznej morfologii (zwłaszcza obecności BKM), słabej ekspresji antygenów głównego układu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC), nieobecności drenażu limfatycznego, mniejszej liczbie komórek prezentujących antygen (ang. antigen presenting cells, APCs) oraz obecności czynników immunosupresyjnych takich jak np. transformujący czynnik wzrostu- β (ang. transforming growth factor- β , TGF- β) [22 - 26].

Wg najczęściej podawanej i najbardziej prawdopodobnej teorii, w rozwoju SM zasadniczą rolę pełnią limfocyty Th CD4+. Pod wpływem nieznanego czynnika dochodzi do ich aktywacji poza OUN. Postuluje się, że takim czynnikiem może być wirus, a do aktywacji limfocytów T i późniejszej autoagresji dochodzi w mechanizmie mimikry molekularnej u osób genetycznie do tego predysponowanych. Wiadomo, że niektóre wirusy zawierają sekwencję aminokwasów obecną w białku zasadowym mieliny (ang. myelin basic protein, MBP), które wchodzi w skład osłonki mielinowej [22 - 26]. Możliwe też, że dochodzi do takiej aktywacji za pośrednictwem superantygeny [27]. W procesie aktywacji limfocytów T uczestniczą APCs, do których w OUN należą głównie komórki dendrytyczne i mikroglej. W wyniku tego procesu powstają subpopulacje limfocytów T: limfocyty Th1, Th2 i Th17, które uzyskują zdolność przedostawania się przez BKM do OUN, naruszając tym samym jego immunologiczne uprzywilejowanie. Przedostawanie to możliwe jest dzięki umiejscowionym w obrębie śródbłónki cząsteczkom adhezyjnym, integrynom, chemokinom i metaloproteinazom.

Szczególną zaś rolę odgrywają selektyny obecne na powierzchni limfocytów T i glikoproteiny na powierzchni śródbłonka. Spośród cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonka warto wspomnieć o międzykomórkowej cząsteczce adhezyjnej-1 (ang. intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), cząsteczce adhezyjnej komórek naczyń-1 (ang. vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) i płytkowej cząsteczce adhezyjnej komórek śródbłonka-1 (ang. platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1), natomiast spośród integryn o integrynie $\alpha 4\beta 1$ i antygenie związanym z funkcją limfocytów-1 (ang. lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1). W OUN limfocyty T pod wpływem ponownej aktywacji (antygenami mielinowymi i niemyelinowymi) ulegają klonalnej ekspansji. Limfocyty Th1 wytwarzają liczne cytokiny prozapalne (np. IL-2, czynnik martwicy nowotworów- α (ang. tumor necrosis factor- α , TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), limfotoksyna- α) prowadząc do aktywacji makrofagów i lokalnego mikrogleju, oraz pobudzają opsonizację i cytotoksyczność prowadząc do uszkodzenia struktur nerwowych. Na skutek wzmożonej chemotaksji zwiększa się napływ komórek zapalnych do OUN. Jednakże dochodzi także do proliferacji pełniących funkcję ochronną limfocytów Th2, które z kolei wytwarzają cytokiny przeciwzapalne (np. IL-4, IL-4, IL-10, IL-13), które ograniczają reakcję zapalną, wspierają funkcje eozynofili i stymulują limfocyty B do wytwarzania przeciwciał. W SM dochodzi do zaburzenia proporcji liczby limfocytów Th1 i Th2 na korzyść tych pierwszych [22 - 26].



Rycina 2. Immunopatogeneza SM

Szczególną rolę w immunopatogenezie SM pełnią limfocyty Th17 (limfocyty CD4+ mające zdolność wytwarzania IL-17), które produkują liczne prozapalne cytokiny, w tym interleukinę 17. Zaobserwowano zwiększoną ich liczbę w PMR w czasie rzutu choroby oraz w obszarach aktywnego uszkodzenia OUN. Udział tych komórek w rozwoju SM był przedmiotem wielu badań naukowych ostatniego dziesięciolecia i nadal nie jest do końca wyjaśniony. Interleukina 17 działa poprzez swoje receptory zlokalizowane na powierzchni różnych komórek (np. makrofagów czy komórek śródbłona) [22 - 26]. Indukuje ona produkcję innych cytokin prozapalnych oraz chemokin, które z kolei powodują rozszczelnienie BKM. Limfocyty Th17 stymulowane są do produkcji IL-17 przez IL-23, która dodatkowo pobudza ich dojrzewanie [28]. Wydaje się, że komórki te odgrywają prawdopodobnie ważną rolę w zapoczątkowaniu reakcji immunologicznej wobec antygenów mieliny, podczas gdy limfocyty Th1 podtrzymują reakcję zapalną. Ostatnio zwrócono uwagę na cząsteczkę CD70, która jest istotnym markerem i stymulatorem limfocytów Th17 [29].

Warto też zwrócić uwagę na rolę limfocytów T CD8+. Są one głównym składnikiem nacieków zapalnych w OUN. Znajdują się w okolicy uszkodzonych aksonów i oligodendrocytów, które niszczą prawdopodobnie jako bezpośrednie komórki efektorowe. Limfocyty T CD8+ uwalniają także TNF- α powodując śmierć neuronów poprzez receptor p55, oraz INF- γ nasilając cytotoksyczność i napływ kationów Ca²⁺. Wytwarzają też granzym B i perforynę powodując uszkodzenie błon komórkowych [22 - 26, 30].

Kolejna istotna w patogenezie SM populacja komórek układu immunologicznego to limfocyty T regulatorowe (ang. T regulatory cells, Treg cells). Zostały one omówione w rozdziale 2.1.

Chociaż na przestrzeni dziesięcioleci uważano, że w patogenezie SM decydującą rolę odgrywają limfocyty T, oczywistym był fakt, że limfocyty B są także w nią zaangażowane. Świadczy o tym chociażby obecność immunoglobulin w PMR, który w warunkach prawidłowych nie powinien ich zawierać. Zainteresowanie rolą limfocytów B w rozwoju choroby wzrasta w ostatnich latach. Nie została ona do tej pory dokładnie poznana. Nie tylko odpowiedzialne są one za produkcję przeciwciał (po przekształceniu w plazmocyty), ale pełnią także funkcję APCs zarówno we krwi jak i w OUN. Ponadto, limfocyty B aktywują limfocyty T CD4+. Wiadomo też, że komórki te pełnią funkcję regulacyjną wytwarzając przeciwzapalną interleukinę 10. W SM ta

funkcja limfocytów B jest zaburzona. Ponadto wytwarzają one IL-6, TNF- α i IL-35, które aktywują dopełniacz i limfocyty T [22 - 26, 31].

Nie bez znaczenia dla rozwoju schorzenia jest też rzadziej wspominany udział astrocytów. Te komórki gleju wytwarzają liczne prozapalne cytokiny i chemokiny. Biorą udział w rozszczelnieniu komórek śródbłonna BKM ułatwiając przedostawanie się przez nią autoreaktywnych limfocytów T. Co więcej, aktywują mikroglej i wytwarzają wolne rodniki. Będąc transporterami glutaminianu nasilają spowodowaną nim cytotoksyczność. Poprzez nadprodukcję czynnika wzrostu fibroblastów-2 (ang. fibroblast growth factor-2, FGF-2), proteoglikanu siarczanu chondroityny (ang. chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG) i efryny (EPH) hamują procesy naprawcze w OUN: remielinizację i regenerację aksonów [32].

W immunopatogenezie SM istotny jest też udział mikrogleju. Dochodzi w jego obrębie do wytwarzania cytokin prozapalnych i wolnych rodników, oraz spadku ekspresji czynników immunosupresyjnych [32].

Chociaż obecność autoprzeciwciał w surowicy i PMR pacjentów chorujących na SM została potwierdzona, to jednak nie wiadomo czy pełnią one tak istotną rolę w patogenezie choroby jak w innych chorobach autoimmunologiczno-zapalnych (np. w miastonii). Osłonka mielinowa może być niszczona w wyniku reakcji autoimmunologicznej z udziałem przeciwciał przeciw składnikom mieliny (anty-MBP, anty-MOG (ang. myelin – oligodendrocytes glycoprotein), anty-MAG (ang. myelin – associated glycoprotein), anty-PLP (ang. proteolipid protein)), która może przybierać różne typy reakcji immunologicznej. Przeciwciała te są bowiem zdolne do opsonizacji antygenów mieliny, przez co ułatwiają ich fagocytozę przez makrofagi. Jest to reakcja cytotoksyczności zależnej od przeciwciał, która stanowi typ II reakcji immunologicznej. Możliwa jest także reakcja typu III (tworzenie kompleksów immunologicznych). Przeciwciała wytwarzane są przez plazmocyty, które powstają w wyniku dojrzewania limfocytów B [22 - 26, 33].

Ważnym zagadnieniem w procesie immunopatogenezy SM, które w ostatniej dekadzie zyskało duże zainteresowanie, jest nieprawidłowa regulacja procesu apoptozy. Istnieje teoria, że do autoagresji przyczynia się zmniejszenie apoptozy autoreaktywnych limfocytów T. Skutkiem tych zaburzeń jest zmniejszenie eliminacji limfocytów T cytotoksycznych i uszkodzenie oraz utrata oligodendrocytów i aksonów. Regulacja apoptozy jest procesem bardzo złożonym i zachodzi dzięki interakcji licznych czynników pobudzających i hamujących. Duże znaczenie ma wpływ DMDs

na ww. procesy, gdyż mogą one dzięki temu istotnie wpłynąć na częstość rzutów [34, 35]. Jest to ważny kierunek w opracowywaniu nowych leków.

Ponieważ SM jest chorobą zapalną, wiele uwagi poświęca się badaniu roli cytokin w jej immunopatogenezie. Nie ulega wątpliwości, że jest ona znacząca. Cytokiny są białkami wpływającymi na proliferację, wzrost i wzajemne interakcje komórek układu odpornościowego. Tworzą w ten sposób sieć czynnościową, która stanowi bardzo skomplikowany i czuły układ zapewniający równowagę immunologiczną w organizmie. Wytwarzane są przez leukocyty. Ich podstawowe cechy to:

- plejotropowość – zdolność do wielokierunkowego, często zupełnie odmiennego działania na różne populacje komórek
- synergizm lub antagonizm – wzajemne potęgowanie danego efektu lub działanie przeciwstawne
- sprzężenie zwrotne (dodatnie lub ujemne) – pobudzanie lub hamowanie wytwarzania innych cytokin. Przykładowo cytokiny prozapalne wytwarzane przez limfocyty Th1 hamują wytwarzanie cytokin przeciwzapalnych wytwarzanych przez limfocyty Th2 i odwrotnie.
- redundancja – różne cytokiny mogą wywoływać ten sam wpływ na daną populację komórek (ich cecha wspólna), natomiast zupełnie odmiennie efekty na inne komórki (cecha różnicująca dane cytokiny).

Cytokiny działają poprzez specyficzne dla siebie receptory błonowe o dużej swoistości. Wyróżniamy cytokiny:

- prozapalne (np. IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α)
- przeciwzapalne (np. IL-4, IL-10, IL-35, TGF- β)

Wg innego podziału wyróżniamy [23]:

- czynniki wzrostu (np. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4)
- aktywatory (np. interferony)
- czynniki o działaniu regulacyjnym i cytotoksycznym (TGF- β , IL-10, IL-12, TNF- α)

- chemokiny cechujące się działaniem chemotaktycznym (stymulacja migracji różnych komórek układu odpornościowego do ognisk zapalnych (np. CXCL10, CXCL13, MIP-1 β))

Cytokiny są niezbędne do aktywacji limfocytów T i regulacji reakcji immunologicznej.

Odrębnym zagadnieniem jest immunopatogeneza SM we wczesnym okresie schorzenia. Jest ona szczególnie mało poznana. Chociaż odkryto do tej pory wiele mechanizmów, które w przebiegu choroby odgrywają określoną rolę w uszkodzeniu struktur OUN, nie ustalono, które z nich mają miejsce we wczesnym jej okresie, a które w późniejszych. Zagadnienie to jest bardzo ważne, gdyż taka wiedza mogłaby przyczynić się do opracowania nowych DMDs, które cechowałyby się szczególną skutecznością w pewnych okresach choroby. Dotyczy to zwłaszcza postaci rzutowo-remisyjnej (ang. relapsing – remitting multiple sclerosis, RRMS), której podatność na leczenie jest największa. Zahamowanie choroby w jej wczesnym stadium byłoby niezwykle korzystne dla pacjentów. Ponadto, byłyby większe możliwości znalezienia przydatnych klinicznie markerów biochemicznych w surowicy i / lub PMR, które umożliwiłyby diagnostykę i monitorowanie przebiegu schorzenia w jego wczesnym okresie. W literaturze można znaleźć liczne doniesienia dotyczące obrazowania MRI w tym okresie choroby i możliwości z niego wynikających. Niestety jednak liczba badań poświęconych poznawaniu immunopatogenezy wczesnego okresu RRMS jest niewielka. Wiadomo, że w okresie tym ważną rolę pełnią cytokiny, które mają zdolność zwiększania aktywności komórek prozapalnych, np. limfocytów Th17 [36]. Uważa się, że stężenia neurofilamentów w surowicy oraz białka τ w PMR pacjentów we wczesnym okresie RRMS mogą być markerami progresji choroby [37, 38]. Wykazano, że procentowy udział limfocytów Th1 w tym okresie schorzenia wzrasta w surowicy i maleje w PMR [39]. Rot i wsp. przeprowadzili w 2018 r. badanie, w którym badali w PMR pacjentów z wczesnym SM stężenie białka GAP-43 (ang. growth-associated protein - 43). Białko to jest ważne dla procesu wzrostu aksonalnego i związanych z tym procesów regeneracji. Autorzy wykazali, że jego stężenie w PMR jest pozytywnie skorelowane z wykładnikami procesu zapalnego, co przemawia za tym, że już we wczesnym okresie SM zachodzą procesy regeneracji aksonów, których intensywność jest prawdopodobnie proporcjonalna do nasilenia reakcji zapalnej [40]. Z kolei Singh i wsp. wykazali rok wcześniej, że limfocyty T V δ 1 są markerem okresu wczesnego

choroby [41]. Możliwe, że ważny udział w immunopatogenezie wczesnego SM pełnią obwodowe plazmoblasty VH4+, które posiadają zdolność rozpoznawania antygenów istoty szarej [42]. Pomimo skąpej wiedzy na temat immunopatogenezy wczesnego okresu choroby, przeprowadzono do tej pory kilka badań oceniających skuteczność DMDs we wczesnym SM [43, 44].

1.3.2. Neurodegeneracja

Drugim obok reakcji immunologicznej procesem, który odgrywa rolę w patogenezie SM jest neurozwyrodnienie. Jego wykładnikami jest uszkodzenie oraz utrata aksonów i mieliny. W efekcie dochodzi do zmian zanikowych w OUN, co bezpośrednio związane jest z narastaniem niesprawności i zaburzeń poznawczych [45, 46]. Najczęściej i najwcześniej do zaniku korowego dochodzi w obrębie płata czołowego, tylnej części zakrętu obręczy, wyspy, płatów skroniowych i mózdzku [46]. Nie ustalono do tej pory czy neurodegeneracja występuje wtórnie do reakcji zapalnej, czy też ma charakter pierwotny. Za pierwotną rolę procesów zwyrodnieniowych przemawia opublikowany w 2004 r. opis przypadku 14-letniego pacjenta, który zmarł w wyniku gwałtownie postępującego zespołu pniowego wywołanego przez zmianę demielinizacyjną umiejscowioną w pniu mózgu. Badanie neuropatologiczne wykazało heterogenność ogniska. W pewnej jego części uwidoczniono uszkodzenie osłonek mieliniowych, śmierć oligodendrocytów na drodze apoptozy i aktywację mikrogleju, jednak bez obecności limfocytów T. W innych zaś obszarach tego ogniska stwierdzono klasyczne nacieki zapalne. Autorzy badania założyli, że pierwszy z wymienionych obrazów jest pierwotny w stosunku do drugiego wnioskując, że proces neurozwyrodnienia poprzedza aktywację układu immunologicznego [47]. Opinia ta oparta na podstawie ww. wykładników jest jednak kontrowersyjna. Wg niektórych badaczy, autorzy opisu tego przypadku nie dokonali oceny subpopulacji limfocytów T CD8+ oraz nie wykluczyli hipoksji jako powikłania gwałtownie postępującego SM i potencjalnej przyczyny wspomnianego obrazu neuropatologicznego. Warto zaznaczyć, że w zdecydowanej większości badań stwierdzono nacieki limfocytarne już na etapie formowania plaki, co sugeruje, że jednak proces zapalny jest pierwotny i dominujący [26].

Wydaje się, że proces neurodegeneracji odgrywa dużą rolę w patogenezie postaci postępujących SM. Świadczy o tym podwyższone miano przeciwciał przeciw

gangliozydom w tych postaciach schorzenia [48]. Innym potencjalnym markerem neurozwyrodnienia w OUN jest obecność różnych podjednostek neurofilamentów w PMR i surowicy pacjentów z SM. Neurofilamenty są istotnym składnikiem cytoszkieletu aksonów, przez co mogą być wykorzystywane do oceny uszkodzenia aksonalnego [49]. Wydaje się, że funkcję ochronną przed uszkodzeniem aksonalnym pełnią peroksysomy oligodendrocytów [50].

Istotną przyczyną procesu neurozwyrodnieniowego są zaburzenia funkcji mitochondriów, a konkretnie nieprawidłowe działanie łańcucha oddechowego, delecje w obrębie mtDNA, zaburzenia działania Na^+ / K^+ ATPazy, stres oksydacyjny i uwalnianie wolnych rodników. Stres oksydacyjny jest dodatkowo nasilany przez uwalnianie kationów Fe^{3+} z uszkodzonych oligodendrocytów [32].

Do uszkodzenia aksonów przyczyniają się także zaburzenia kanałów jonowych. Redystrybucja kanałów sodowych w obrębie aksonów nasila zapotrzebowanie energetyczne. Poprzez aktywację TRPM4 (ang. transient potential receptor melastatin 4) oraz kanałów VGCC (ang. voltage-gated calcium channels) i ASIC1 (ang. acid-sensing ion channel 1) dochodzi do nadmiaru kationów Ca^{2+} wewnątrz aksonu, co z kolei prowadzi do proteolizy cytoszkieletu [32].

Wiadomo też, że do procesu neurozwyrodnienia w przebiegu SM przyczynia się upośledzenie wytwarzania białek koniecznych dla prawidłowego transportu wewnątrzaksonalnego [32].

1.4. Czynniki ryzyka

1.4.1. Infekcje

Patogeny mogą wywoływać odpowiedź immunologiczną poprzez własne antygeny, które zawierają podobną sekwencję aminokwasów jak niektóre antygeny znajdujące się w obrębie OUN, zwłaszcza antygen osłonki mielinowej, którym jest MBP. Inne potencjalne białka osłonki mielinowej mogące mieć swoje podobne odpowiedniki wśród białek patogenów to MOG, MAG czy PLP. Jest to zjawisko mimikry molekularnej. Inny potencjalny mechanizm zakłada uwalnianie antygenów OUN do krwi obwodowej w wyniku neuroinfekcji i następczą aktywację układu immunologicznego [26]. Szczególnie prawdopodobnym czynnikiem ryzyka wydają się być infekcje wirusowe. Dotyczy to zwłaszcza EBV (ang. Epstein – Barr virus), przeciw któremu przeciwciała stwierdzone są u ponad 99% chorych na SM. Ryzyko

wystąpienia tego schorzenia jest wyższe u osób, które przebyły mononukleozę zakaźną [51]. Ciekawych danych dostarczyło jedno z nowszych badań, w którym autorzy używali transferu magnetyzacji, by zbadać zależność między stężeniem przeciwciał anty – EBNA-1 (ang. Epstein – Barr nuclear antigen–1) u pacjentów z SM, a współczynnikiem transferu magnetyzacji (ang. magnetisation transfer ratio, MTR). Współczynnik ten mierzyli oni w kilku obszarach mózgowia. W badanej grupie istniała ujemna korelacja między stężeniem przeciwciał anty – EBNA-1 a MTR w obrębie istoty szarej mózgowia. Jest to kolejna silna przesłanka świadcząca o udziale wirusa EBV w patogenezie SM [52]. Do innych potencjalnych wirusów należą: wirus odry, świnki, różyczki, ludzki wirus herpes typu 6 (ang. human herpesvirus 6, HHV-6), wirus opryszczki pospolitej (ang. herpes simplex virus, HSV), wirus ospy wietrznej i półpaśca (ang. varicella zoster virus, VZV) i ludzki wirus T – limfotropowy (ang. human T – lymphotropic virus–1, HTLV-1). Szczególnie prawdopodobny jest udział wirusa HHV-6. Wykazuje on tropizm do wielu komórek OUN, w tym do mikrogleju, oligodendrocytów i astrocytów. Uważa się, że także bakterie mogą być niespecyficznym czynnikiem spustowym rozwoju SM u osób predysponowanych. Parratt i wsp. stwierdzili obecność kompleksów immunologicznych *Chlamydia pneumoniae* w surowicy u 24% pacjentów z SM. Kompleksy te występują także u pacjentów chorujących na inne choroby neurologiczne, a nawet u osób zdrowych, jednak rzadziej [53]. Wcześniej z kolei stwierdzono, że osoby chorujące na SM mają w PMR wyższe stężenia DNA i RNA *C. pneumoniae* w porównaniu z pacjentami cierpiącymi na inne choroby neurologiczne [54]. Wyniki takie sugerują udział tego patogenu w złożonej immunopatogenezie choroby. Do tej pory nie potwierdzono jednak takiego udziału w przypadku któregośkolwiek z ww. czynników chorobotwórczych. Zarówno wirusy jak i bakterie mogą mieć udział w kodowaniu superantygenów. Są one zdolne do stymulacji limfocytów T bez udziału antygenów MHC [55]. Z uwagi jednak na heterogenność SM, mechanizm, w którym infekcja przyczynia się do rozwoju objawów może być odmienny u różnych pacjentów.

1.4.2. Czynniki genetyczne

Aktualnie postuluje się, że SM jest chorobą wielogenową i wieloczynnikową (z istotnym wpływem zarówno czynników genetycznych jak i środowiskowych). Potwierdza to obserwacja, że identyczny genotyp u bliźniąt jednojajowych nie jest czynnikiem wystarczającym do rozwoju choroby i znaczenie mają także czynniki środowiskowe. Zaobserwowano zwiększoną częstość choroby u krewnych I stopnia osób dotkniętych nią. Zgodność jej występowania u bliźniąt jednozygotycznych, dizygotycznych oraz pozostałego rodzeństwa wynosi odpowiednio 25,3% - 35,0%, 2,0% - 5,4% oraz 2,9% [56, 57]. Największe znaczenie mają mutacje w genach MHC klasy II, szczególnie w rejonie DR i DQ. Uważa się, że geny te warunkują podatność na SM nawet w 60%. Najsilniejszym genetycznym czynnikiem ryzyka jest obecność genu HLA-DRB1*1501 na chromosomie 6p21 [26, 58]. Zwiększa ona 2 - 4 krotnie ryzyko rozwoju SM, jednak nie jest dla niego konieczna. Ponadto haplotyp ten występuje u 20% - 30% osób zdrowych. Istotną rolę odgrywają też geny kodujące cząsteczki biorące udział w odpowiedzi układu immunologicznego, np. cytokiny. Uważa się, że szczególne znaczenie mają geny dla receptora α IL-2 i receptora α IL-7 [59]. Istnieją też uzasadnione przesłanki, że zmiany epigenetyczne mogą istotnie wpłynąć na ryzyko rozwoju schorzenia [60]. Pośrednim dowodem na znaczenie czynników genetycznych w rozwoju choroby jest zwiększona częstość jej występowania u osób rasy kaukaskiej pochodzących z północnej Europy w porównaniu z innymi grupami etnicznymi, np. Amerykanami.

1.4.3. Niedobór witaminy D₃

Wiadomo, że choroba występuje częściej na terenach o wyższych szerokościach geograficznych i mniejszym nasłonecznieniu [61 - 63]. Ciekawych danych dostarczyły badania nad migracją ludności. Okazuje się, że osoby migrujące przed ukończeniem 15 roku życia mają takie samo ryzyko wystąpienia choroby jak ludność miejscowa. W przypadku migracji po osiągnięciu tego wieku ryzyko to pozostaje takie, jak w kraju, z którego dana osoba emigrowała [64, 65]. Ponieważ szerokość geograficzna jest związana z określonym nasłonecznieniem, nie dziwi fakt, że od dawna prowadzi się badania mające na celu potwierdzenie lub odrzucenie hipotezy o wpływie niedoboru witaminy D₃ na rozwój SM. Wiadomo, że obniżone stężenie witaminy D₃ w surowicy krwi częściej obserwuje się w populacji osób z SM i jest ono czynnikiem ryzyka

konwersji zespołu klinicznie izolowanego (ang. clinically isolated syndrome, CIS) do SM oraz bardziej nasilonych zarówno klinicznych i obrazowych wykładników aktywności choroby [66, 67]. Co więcej, jej stężenie w surowicy krwi zależy od okresu choroby i jest najniższe w czasie rzutu [68]. Wykazano, że niskie stężenie witaminy D₃ w surowicy krwi jest czynnikiem ryzyka większej częstości rzutów, natomiast jej suplementacja ma znaczenie ochronne. Nie tylko zmniejsza częstość rzutów, ale też hamuje powstawanie nowych ognisk widocznych w sekwencji T2 - zależnej w badaniu MR, ognisk wzmacniających się po podaniu kontrastu gadolinowego jak również czarnych dziur [69, 70]. Obserwacje te można próbować przynajmniej częściowo wyjaśnić właściwościami immunomodulującymi aktywnej formy witaminy D₃ (1,25 dihydroksywitaminy D₃), zwłaszcza jej hamującym wpływem na komórki układu immunologicznego i procesy, w których biorą one udział. Dla przykładu zmniejsza ona liczbę komórek dendrytycznych poprzez hamowanie ich różnicowania i dojrzewania. Indukuje również apoptozę limfocytów B i hamuje produkcję przeciwciał. Ponadto hamuje funkcję limfocytów Th17, w wyniku czego zmniejsza wytwarzanie prozapalnej IL-17. Stymuluje natomiast powstawanie limfocytów Treg, które pełnią funkcję przeciwzapalną i hamują limfocyty Th1, a zwiększają aktywność ograniczających reakcję zapalną limfocytów Th2. Ponadto, witamina D₃ hamuje transkrypcję genów cytokin prozapalnych i zwiększa produkcję cytokin przeciwzapalnych. Obniża także cytotoksyczność limfocytów CD8+. Efekt immunomodulujący witaminy D₃ wynika z jej działania poprzez specyficzny dla siebie receptor VDR (ang. vitamin D receptor). Znajduje się on na powierzchni limfocytów T i B, monocytów, makrofagów, komórek dendrytycznych i neutrofilii [71].

1.4.4. Palenie tytoniu

Palenie tytoniu sprzyja konwersji CIS do SM, większej aktywności choroby i szybszej progresji do postaci wtórnie postępującej. Wpływ ten jest większy wraz z długością i intensywnością palenia. Wiadomo też, że palenie związane jest z większą objętością stwierdzanych w badaniu MR ognisk demielinizacyjnych w mózgowiu oraz jego zanikiem [72 - 76]. Wpływ substancji zawartych w dymie tytoniowym na OUN odbywa się w kilku mechanizmach [77 - 81]. Po pierwsze, wywierają one wpływ zarówno na funkcję limfocytów T jak i B, jak również APCs. Co więcej, powodują wzrost parametrów stanu zapalnego (np. białka C – reaktywnego (ang. c – reactive protein,

CRP) i liczby krążących leukocytów we krwi. Zmieniają też stosunek limfocytów Th1 / Th2. U palaczy stwierdzono również większą ekspresję ważnego dla immunologicznej homeostazy białka Fas (CD95) na powierzchni limfocytów T CD4+ i B. Po drugie, zwiększają przepuszczalność BKM i umożliwiają przez to migrację autoreaktywnych limfocytów T do OUN. Do jej uszkodzenia dochodzi między innymi na skutek działania metaloproteinazy 9, której stężenie w surowicy jest wyższe u osób palących. Po trzecie, dym tytoniowy zawiera wiele substancji wywierających bezpośrednie działanie toksyczne na neurony i inne komórki układu nerwowego. Najbardziej narażone są neurony i oligodendrocyty z uwagi na ich największe zapotrzebowanie energetyczne. W mechanizmie hipoksji może dochodzić do ich martwicy i uwolnienia antygenów neuronalnych do krwi, co wywołuje kaskadę procesów związanych z autoagresją. Ponadto, wspomniane działanie toksyczne powoduje demielinizację, utratę oligodendrocytów i aksonów oraz blok przewodnictwa wzdłuż aksonów. Po czwarte, uważa się, że efekt dymu tytoniowego związany jest z genotypem pacjenta chorującego na SM. Wg niektórych autorów, u palących pacjentów może dochodzić do zmian epigenetycznych, takich jak metylacja DNA, regulacja miRNA czy modyfikacja histonów. Wykazano, że palenie jest czynnikiem ryzyka SM zwłaszcza u pacjentów, którzy w układzie ludzkich antygenów leukocytarnych (ang. human leukocyte antigens, HLA) posiadają geny sprzyjające wystąpieniu choroby.

1.4.5. Otyłość

Obecnie wzrasta zainteresowanie otyłością jako potencjalnym czynnikiem ryzyka wystąpienia SM i większego nasilenia jego objawów. W 2013 r. Munger i wspólnicy stwierdzili, że podwyższona wartość BMI (ang. body mass index) jest czynnikiem ryzyka wystąpienia SM u dzieci, zwłaszcza dziewcząt [82]. Podobne zjawisko zaobserwowano u dorosłych [83]. Ciekawych danych dostarczyło badanie przekrojowe z 2019 r. na 140 chorych na SM. Autorzy stwierdzili istnienie korelacji pomiędzy BMI a ocenianą w skali EDSS (ang. Expanded Disability Status Scale) niesprawnością włączonych do badania pacjentów z tym schorzeniem. Ponadto, pacjenci otyli wykazywali w PMR wyższe stężenia czynników prozapalnych takich jak leptyna i IL-6, natomiast obniżone IL-13, która jest cytokiną przeciwzapalną. Co więcej, wykazano istnienie korelacji pomiędzy stężeniem triglicerydów w surowicy i stosunkiem

TC / HDL-C, a stężeniem IL-6 w PMR [84]. Huppke i wsp. przeprowadzili ostatnio duże jednoośrodkowe, retrospektywne badanie liczące 453 dzieci z postacią dziecięcą SM, które leczone były DMDs. Badanie potwierdziło większą liczbę rzutów w czasie terapii I linii (czyli jej mniejszą skuteczność) u otyłych dzieci, jak również częstszą potrzebę zastosowania u nich terapii II linii w porównaniu z dziećmi bez niedowagi [85]. Tak ciekawe wnioski skłaniają do poszukiwania możliwych mechanizmów w jakich otyłość powiązana jest z SM. Istnieje kilka teorii. Wiadomo, że jelitowa flora bakteryjna ma duże znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego. W jej skład wchodzi różne gatunki bakterii. Niektóre z nich mają właściwości prozapalne, inne przeciwzapalne. Uważa się, że u osób otyłych dochodzi do deregulacji jelitowej flory bakteryjnej na korzyść gatunków prozapalnych, które poprzez indukcję limfocytów Th17 nasilają reakcję zapalną. Ponadto, u pacjentów tych zwiększa się wytwarzanie leptyny i innych adipokin, które także mają właściwości prozapalne [86]. Inna teoria zakłada potencjalny związek obniżonego stężenia witaminy D₃ z wyższym ryzykiem SM u pacjentów otyłych. Wykazano bowiem, że w surowicy krwi osób otyłych stężenie aktywnego metabolitu witaminy D₃ (1,25 dihydroksyvitaminy D) jest niższe [87, 88].

Ocena otyłości jako potencjalnego czynnika ryzyka zachorowania na SM wymaga jednak dalszych badań.

1.4.6. Nadmierne spożywanie soli

Obecnie wzrasta zainteresowanie spożyciem chlorku sodu jako czynnikiem ryzyka rozwoju SM, a liczba publikacji poświęconych temu zagadnieniu ciągle wzrasta. Wyniki badań są sprzeczne. Z jednej strony udowodniono, że dieta bogata w sól sprzyja klinicznej i rezonansowej aktywności choroby, co jest spowodowane prawdopodobnie zwiększeniem aktywności limfocytów Th17. W ten sposób próbuje się przynajmniej częściowo wyjaśnić wzrastającą częstość występowania SM i innych chorób autoimmunologicznych w krajach, gdzie powszechna jest „dieta krajów zachodnich” [89 - 91]. Wykorzystując ¹H-MRI oraz ²³Na-MRI, Brownlee i wsp. wykazali w liczącym 96 pacjentów badaniu przekrojowym z 2019 r. akumulację sodu w korowej istocie szarej u pacjentów z tym schorzeniem. Była ona większa u osób z SM w porównaniu z pacjentami z CIS i osobami zdrowymi, oraz korelowała z wartościami skali EDSS [92]. Z drugiej jednak strony, Cortese i wsp. przeprowadzili w 2017 r. duże badanie kohortowe, w którym nie potwierdzono zwiększonego ryzyka rozwoju SM

u osób spożywających większe ilości chlorku sodu [93]. Co więcej, duże, oparte na pomiarze stężenia sodu w moczu z dobowej zbiórki oraz ocenie klinicznej i rezonansowej badanie randomizowane z 2017 r. wykazało, że podaż soli w diecie nie wpływa na przebieg SM ani jego aktywność [94]. Nie potwierdzono również zależności między dietą bogatą w sól a ryzykiem rozwoju choroby oraz czasem do wystąpienia rzutu. Wniosek ten dotyczy jednak populacji dziecięcej [95, 96].

1.5. Postaci kliniczne

W zależności od przebiegu klinicznego wyróżnia się kilka postaci SM. Najczęstsza z nich to RRMS (85% przypadków). W jej przebiegu pacjent doświadcza naprzemiennie rzutów i remisji choroby. Rzut definiowany jest jako obiektywne pogorszenie stanu neurologicznego o początku ostrym lub podostrym, trwające co najmniej 24 godziny, bez objawów infekcji, gorączki, encefalopatii. Aby rozpoznać kolejny, niezależny rzut, pogorszenie musi nastąpić co najmniej 30 dni po poprzednim. Początkowo objawy neurologiczne rzutu wycofują się całkowicie, jednak z czasem kolejne rzuty pozostawiają po sobie coraz większe deficyty i niesprawność chorego. Dlatego u większości pacjentów RRMS przechodzi w postać wtórnie postępującą SM (ang. secondary progressive multiple sclerosis, SPMS). Po 10 latach trwania RRMS dochodzi do tego u około 30% - 50% osób, natomiast po 25 latach odsetek ten sięga 80%. W 10-15% przypadków przebieg choroby jest od początku postępujący (postać pierwotnie postępująca) (ang. primary progressive multiple sclerosis, PPMS). Ta postać choroby cechuje się szybszym narastaniem niesprawności niż RRMS. Jej objawy pojawiają się jednak o około 10 lat później. Rzadko schorzenie ma przebieg pierwotnie postępujący z nakładającymi się dodatkowo rzutami [97 - 100]. Ostatnio wyróżnia się także postać łagodną SM. Rozpoznaje się ją w przypadku powolnego narastania niesprawności mierzonej w skali EDSS. Często rozpoczyna się ona u osób młodych, które prezentują pojedynczy deficyt neurologiczny [100].

1.6. Epidemiologia

Stwardnienie rozsiane rozpoczyna się najczęściej w wieku młodym. Pierwsze objawy mają zazwyczaj miejsce w przedziale wiekowym 20 - 40 r.ż. (średnio: 29 – 32 r.ż. dla RRMS), jednak u 5% chorych występują poniżej 18 r.ż., natomiast w 3% - 12%

przypadków choroba rozpoczyna się w wieku powyżej 50 r.ż. Późniejszy wiek wystąpienia choroby dotyczy zazwyczaj PPMS i wynosi średnio 35 – 39 lat [22, 97 - 99].

Kobiety chorują częściej niż mężczyźni. W RRMS stosunek liczby chorych kobiet do mężczyzn wynosi od 2,3:1 do 3,3:1 i wzrasta wraz z liczbą rzutów w ciągu roku. Z kolei PPMS występuje z taką samą częstością u obu płci [22, 101].

Częstość występowania SM jest ściśle uzależniona od szerokości geograficznej i największa w Europie, północnych Stanach Zjednoczonych, południowej Kanadzie, Nowej Zelandii i południowo – wschodniej Australii [22]. Z kolei najniższą częstość występowania obserwuje się w Japonii, Kolumbii, Wenezueli i niektórych krajach Afryki. W Polsce częstość występowania SM wynosi w zależności od obszaru i metodyki badania 52,9 – 121,3 / 100000 osób, a całkowita liczba chorych sięga około 40000. Warto nadmienić, że obszar Polski należy do strefy wysokiego ryzyka tego schorzenia [102 - 105].

Zaobserwowano, że podatność na wystąpienie choroby jest odmienna w zależności od rasy i pochodzenia etnicznego. Najbardziej podatne są osoby rasy białej [22, 106].

Stwardnienie rozsiane stanowi najczęstszą nieurazową przyczynę niepełnosprawności osób młodych w Europie [107]

1.7. Obraz kliniczny

1.7.1. Objawy kliniczne

Symptomatologia SM jest bardzo bogata. W przebiegu choroby mogą wystąpić objawy uszkodzenia dróg długich, pozagałkowe zapalenie nerwu wzrokowego, objawy pniowe, zespół mózdkowy, zaburzenia zwieraczy, objawy psychopatologiczne, zaburzenia funkcji seksualnych czy zespół przewlekłego zmęczenia. Pierwszy epizod objawów klinicznych charakterystycznych dla procesu demielinizacyjnego OUN nazywany jest zespołem klinicznie izolowanym sugerującym stwardnienie rozsiane (ang. clinically isolated syndrome (CIS) suggestive of multiple sclerosis) i występuje u 85% chorych. Jego wystąpienie nie jest równoznaczne z rozpoznaniem SM [108]. Zespół klinicznie izolowany najczęściej objawia się cechami uszkodzenia dróg długich (do 52% przypadków), zwłaszcza asymetrycznymi, przejściowymi parestezjami i nieco rzadziej zaburzeniami funkcji ruchowych. Często jest także manifestacja CIS w postaci

jednostronnego pozagałkowego zapalenia nerwu wzrokowego (15-30% przypadków), które objawia się spadkiem ostrości widzenia, zaburzeniami widzenia barw (zwłaszcza czerwonej i zielonej) oraz bólem gałki ocznej towarzyszącym jej poruszaniu. Zaburzenia widzenia rozpoczynają się ostro lub podostro i nieleczone ustępują u około 90% pacjentów w ciągu 2-6 miesięcy. Objawy uszkodzenia pnia mózgu stanowią CIS w 9-10% przypadków i najczęściej mają postać porażenia międzyjądrowego czy uszkodzeń nerwów czaszkowych, co jest przyczyną podwójnego widzenia. Rzadziej choroba rozpoczyna się zespołem mózdkowym (11% przypadków) oraz wykładnikami zaburzeń funkcji pęcherza moczowego (1%). Z kolei w 21-55% CIS ma charakter wieloogniskowy [22, 108 - 110].

Stwardnienie rozsiane cechuje się wieloogniskowym uszkodzeniem OUN. Procentowy rozkład głównych objawów choroby został przedstawiony poniżej.

Tabela 2. Najważniejsze objawy SM i ich rozpowszechnienie

Objaw	Częstość występowania [%]
Niedowłady	80
Zaburzenia czucia	73
Ataksja	72
Dysfunkcja pęcherza moczowego	62 – 75
Spastyczność	70
Ból	70
Zaburzenia jelitowe	do 70
Depresja	50
Zaburzenia funkcji seksualnych	40 – 90
Zespół przewlekłego zmęczenia	48 – 84
Zaburzenia funkcji poznawczych	34 – 65
Pozagałkowe zapalenie nerwu wzrokowego	30
Podwójne widzenie	26
Dyzartria	25
Dysfagia	10
Neuralgia nerwu trójdzielnego	2

1.7.2. Neuroradiologia

Podstawową techniką neuroobrazowania używaną w celu diagnostyki i monitorowania przebiegu SM jest tomografia rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI). Najczęściej wykorzystuje się sekwencje FLAIR (ang. fluid-attenuated inversion recovery), PD / T2 – zależną oraz T1 – zależną z podaniem kontrastu gadolinowego, która umożliwia ocenę aktywności ognisk.

Najważniejsze odchylenia w badaniu MRI stwierdzane w przebiegu SM stanowią ogniska (plaki) demielinizacyjne w istocie białej mózgowia stwierdzane w sekwencji T2 (ogniska stare) i T1 po podaniu kontrastu gadolinowego (ogniska świeże). Mają one kształt owalny i usytuowane są prostopadłe do płaszczyzny komór bocznych. Zmiany w sekwencji T2 i FLAIR występują u ponad 95% pacjentów. Charakterystyczne dla SM obszary występowania ww. ognisk to nerw wzrokowy ze skrzyżowaniem wzrokowym, lokalizacja podkorowa, okołokomorowa oraz podnamiotowa [22, 108, 109, 111, 112, 113]. Ich występowanie często stwierdza się już na etapie CIS (50-70% przypadków) [22, 108, 111, 114]. U 52-71% pacjentów doświadczających pierwszego klinicznego epizodu sugerującego demielinizację OUN ogniska te umiejscowione są okołokomorowo, nieco rzadziej głęboko w istocie białej (21-39%) i podkorowo (7-8%), natomiast najrzadziej podnamiotowo (2%) [22, 108, 111, 114]. Należy zwrócić uwagę na fakt, że już na etapie CIS w badaniu MRI mózgowia stwierdzane są ogniska bezobjawowe. Najczęściej występują one u pacjentów z pozagałkowym zapaleniem nerwu wzrokowego (74%) oraz w przypadkach zajęcia pnia mózgu (60%) [22, 108, 111, 114, 115].

W przypadkach pozagałkowego zapalenia nerwu wzrokowego w przebiegu SM ww. plaki umiejscowione są na przebiegu n. wzrokowego i / lub innych elementów drogi wzrokowej. Widoczne są one najlepiej w sekwencji FSE (ang. fast spin-echo) i STIR (ang. short inversion-time inversion-recovery). W ostrej fazie zmiany te widoczne są u ponad 95% pacjentów [116, 117].

Na przestrzeni wielu dekad uważało się, że SM jest chorobą wyłącznie istoty białej. Jednak obecnie coraz większą uwagę zwraca się na występowanie w przebiegu choroby ognisk w istocie szarej [118]. Ich uwidocznienie w rutynowo wykorzystywanych technikach MRI jest jednak trudne. Wykorzystuje się w tym celu bardziej zaawansowane techniki, które stosowane są głównie w celach naukowych. Należą do nich: DIR (ang. double inversion recovery), PSIR (ang. phase - sensitive inversion recovery) oraz MPRAGE (ang. magnetization – prepared rapid acquisition

with gradient echo) 3D w wysokiej rozdzielczości [119, 120]. Ich dostępność jest niestety ciągle niska. Znaczenie zmian korowych zostało szczególnie podkreślone w obecnych kryteriach rozpoznania choroby (kryteria McDonalda 2017) i są one obecnie uwzględniane w rezonansowych kryteriach rozsiania w przestrzeni (ang. dissemination in space, DIS) [112]. Występowanie ognisk korowych już we wczesnym SM sięga 38% przypadków. Stwierdza się je także na etapie CIS w ponad 30% przypadków [22, 108, 111 - 114, 117 - 120].

Kolejną cechą SM stwierdzaną w badaniach neuroobrazowych jest zanik mózgowia, co stanowi wykładnik neurozwyrodnieniowego tła choroby. Obecny jest już u pacjentów z CIS. Koreluje z progresją objawów klinicznych i niesprawności w przebiegu tego schorzenia [22, 111, 112, 117, 121, 122].

Na odrębny komentarz zasługują obszary demielinizacji uwidocznione w sekwencji T2 - zależnej w obrębie rdzenia kręgowego. Bezobjawowe zmiany w tej lokalizacji stwierdzane są u 30 - 50% pacjentów doświadczających pierwszego w życiu klinicznego epizodu demielinizacji. W 40% przypadków CIS znajdują się one w regionie piersiowo - lędźwiowym rdzenia kręgowego. W przebiegu SM ogniska demielinizacji w rdzeniu kręgowym występują u 90% pacjentów. Z reguły umiejscowione są one w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego, są asymetryczne i zajmują mniej niż dwa sąsiadujące segmenty rdzenia kręgowego [22, 108, 111, 112, 115, 123 - 125].

1.7.3. Analiza płynu mózgowo-rdzeniowego

U większości pacjentów chorujących na SM stwierdza się charakterystyczne odchylenia w badaniu PMR. Właściwości fizyczne PMR nie odbiegają zazwyczaj od normy. Do 20% pacjentów wykazuje nieznacznie podwyższoną cytozę (do 50 komórek/ μ l). Większość wśród stwierdzanych komórek stanowią limfocyty. U jednej trzeciej pacjentów stwierdza się nieznacznie podwyższone stężenie białka. Ważnym parametrem służącym do oceny lokalnej syntezy przeciwciał w OUN jest tzw. indeks IgG (wskaźnik Linka – Tiblinga). Oblicza się go wg następującego wzoru:

$$\text{Indeks IgG} = \frac{[\text{IgG w PMR}]}{[\text{IgG w surowicy}]} \times \frac{[\text{albumina w surowicy}]}{[\text{albumina w PMR}]}$$

O lokalnej syntezie przeciwciał w OUN świadczą wartości indeksu IgG > 0,7. Jest on podwyższony u 90% pacjentów chorujących na SM. Jednak najbardziej swoistym

parametrem służącym do oceny syntezy immunoglobulin w obrębie OUN jest obecność w obrazie elektroforetycznym co najmniej dwóch prążków oligoklonalnych IgG w PMR przy ich jednoczesnej nieobecności w surowicy. Preferowaną i najczulszą metodą ich wykrywania jest ogniskowanie izoelektryczne w żelu agarozowym z następczym immunoblottingiem. Warto nadmienić, że Losy i wsp. wykorzystując tą metodę wykazali w 1990 r. w PMR pacjentów z SM obecność prążków oligoklonalnych poszczególnych podklas IgG. U wszystkich z badanych osób stwierdzono prążki oligoklonalne IgG1. U niektórych pacjentów wykazano je również w podklasach IgG3, IgG2 i IgG4 w malejącej częstości [126]. W ponad połowie przypadków CIS i w 90% przypadków SM stwierdza się obecność prążków oligoklonalnych swoistych dla PMR. Ich obecność u pacjentów z CIS jest predyktorem rozwoju SM [22, 66, 111, 127 - 129].

1.7.4. Potencjały wywołane i optyczna koherentna tomografia

Wydłużenie latencji wzrokowych i somatosensorycznych potencjałów wywołanych (PW) stwierdza się u odpowiednio 29 - 43,8% i 50% pacjentów z CIS. U pacjentów z klinicznie potwierdzonym SM częstość ta sięga odpowiednio 85% i 80% [22, 111, 128 - 130].

Optyczna koherentna tomografia (ang. optical coherence tomography, OCT) jest narzędziem rzadko wykorzystywanym w rutynowej diagnostyce SM. Jej znaczenie w tej diagnostyce jest przedmiotem badań naukowych. Wykazano, że już na etapie CIS grubość warstwy nerwowej siatkówki mierzona za pomocą OCT jest mniejsza w porównaniu z osobami zdrowymi, co dodatkowo koreluje z wydłużeniem latencji wzrokowych PW [22, 111, 130].

1.8. Diagnostyka

Proces diagnostyczny SM obejmuje badanie podmiotowe i przedmiotowe, neuroobrazowanie za pomocą MRI, analizę PMR oraz rzadziej badanie PW i OCT. Chorobę można rozpoznać po udowodnieniu rozsiania jej wykładników w czasie i przestrzeni. Ocena ta oparta jest na analizie objawów klinicznych, obrazu MRI oraz wyniku badania PMR. Szczegółowe zasady diagnostyki SM zawarte są w kryteriach McDonalda, obecnie w wersji z 2017 r [112].

Wg ww. kryteriów rozpoznanie postaci rzutowo-remisyjnej choroby można postawić w czterech przypadkach:

1. Dwa rzuty choroby z objawami wynikającymi z uszkodzenia dwóch różnych obszarów OUN, przy założeniu, że obiektywnie (w badaniu neurologicznym) potwierdzone zostanie rozszanie objawów w przestrzeni (objawy z dwóch obszarów OUN). Dopuszczalne jest stwierdzenie drugiego rzutu (z innego obszaru OUN) na podstawie wiarygodnego wywiadu chorobowego.
2. Dwa obiektywnie potwierdzone rzuty choroby z objawami wynikającymi z uszkodzenia jednego obszaru OUN. Wówczas dla rozpoznania SM należy wykazać spełnienie kryteriów rozszania w przestrzeni w MRI lub oczekiwać na kolejny rzut z objawami wynikającymi z uszkodzenia innego obszaru OUN.
3. Jeden obiektywnie potwierdzony rzut z objawami wynikającymi z uszkodzenia dwóch obszarów OUN. Wówczas dla rozpoznania SM należy wykazać spełnienie kryteriów rozszania w czasie w MR lub oczekiwać na kolejny rzut lub wykazać obecność specyficznych dla PMR prążków oligoklonalnych.
4. Jeden obiektywnie potwierdzony rzut z objawami wynikającymi z uszkodzenia jednego obszaru OUN. Wówczas dla rozpoznania SM należy wykazać spełnienie kryteriów rozszania w przestrzeni i czasie w MR, lub oczekiwać na kolejny rzut z objawami wynikającymi z uszkodzenia innego niż dotychczas obszaru OUN, lub wykazać obecność specyficznych dla PMR prążków oligoklonalnych.

Rozszanie w przestrzeni można stwierdzić na podstawie MRI, gdy co najmniej jedno hiperintensywne w sekwencji T2-zależnej ognisko można stwierdzić w co najmniej dwóch z następujących lokalizacji: okołokomorowo, korowo / podkorowo, podnamiotowo, w rdzeniu kręgowym.

Rozszanie w czasie można stwierdzić na podstawie MRI w sytuacji jednoczesnej obecności wzmacniających i niewzmacniających się po podaniu kontrastu gadolinowego ognisk hiperintensywnych, lub w przypadku stwierdzenia nowego

ogniska hiperintensywnego w sekwencji T2-zależnej / nowego ogniska wzmacniającego się po podaniu kontrastu gadolinowego w sekwencji T1-zależnej w porównaniu z badaniem poprzednim.

Należy pamiętać, że w świetle kryteriów McDonald'a 2017 wykazanie obecności specyficznych dla PMR prążków oligoklonalnych jest równoznaczne z potwierdzeniem rozsiania wykładników choroby w czasie [112].

Odmienne kryteria obowiązują w przypadku rozpoznania PPMS [112]. Należy wykazać niezależne od występowania rzutów narastanie niesprawności przez rok oraz co najmniej dwa z poniższych warunków:

- Co najmniej jedno ognisko hiperintensywne w sekwencji T2-zależnej w co najmniej jednej z następujących lokalizacji: okołokomorowo, korowo / podkorowo, podnamiotowo.
- Co najmniej dwa ogniska hiperintensywne w sekwencji T2-zależnej w rdzeniu kręgowym.
- Obecność prążków oligoklonalnych specyficznych dla PMR.

Rozpoznanie SM można postawić jedynie po wykluczeniu innych prawdopodobnych jednostek chorobowych.

Warto podkreślić, że zarówno w Polsce jak i na świecie wzrasta obecnie liczba ośrodków dysponujących skanerami MR o wartości indukcji magnetycznej przekraczającej 1,5 T. W literaturze istnieją doniesienia dotyczące diagnostyki SM z użyciem skanerów MRI o indukcji magnetycznej 3 T, czy nawet 7 T [131 - 133]. Pomimo wyższej czułości diagnostycznej skanerów o indukcji magnetycznej 3 T i 7 T w porównaniu ze skanerami 1,5 T, wydaje się, że rzadko implikuje to wcześniejszą diagnozę SM. W efekcie korzyść z ich stosowania w rutynowej diagnostyce choroby jest niewielka [133].

1.9. Ocena aktywności choroby

Aktywność RRMS można ocenić na podstawie kryterium klinicznego i/lub radiologicznego. Klinicznym dowodem aktywności choroby jest wystąpienie jej rzutu. Natomiast w obrazie MRI o aktywności RRMS świadczy obecność wzmacniających się po podaniu kontrastu gadolinowego ognisk w sekwencji T1-zależnej, i/lub stwierdzenie nowych i/lub wyraźnie powiększających się ognisk w sekwencji T2-

zależnej w porównaniu z badaniem poprzednim. Innym przydatnym parametrem jest stopień zaniku mózgowia. Aktywność RRMS jest definiowana w określonym przedziale czasu. Zazwyczaj jest to 1 rok [112, 134, 135].

Zespół klinicznie izolowany uważamy za aktywny jeśli w obrazie MRI poza typowymi ogniskami hiperintensywnymi sugerującymi zmiany demielinizacyjne stwierdza się ogniska w sekwencji T1-zależnej wzmacniające się po podaniu środka kontrastowego [112, 134, 135].

1.10. Leczenie

W procesie leczniczym SM wyróżnia się trzy rodzaje postępowania: leczenie rzutu, terapia modyfikująca przebieg choroby (ang. disease modifying therapy, DMT) i postępowanie objawowe.

1.10.1. Leczenie rzutu

Uznanym i przyjętym na całym świecie postępowaniem w przypadku rzutu SM jest podawanie metyloprednizolonu w dawce 1g i.v. przez 3 - 5 dni. Następnie (w zależności od nasilenia objawów i odpowiedzi na leczenie) terapię można kontynuować podając metyloprednizolon doustnie przez kilka dni do kilku tygodni. W przypadkach łagodniejszych rzutów choroby można stosować lek wyłącznie doustnie. Skuteczność glikokortykosteroidów w terapii rzutu SM została potwierdzona w licznych badaniach. Ich działanie polega na uszczelnianiu BKM, zmniejszeniu liczby limfocytów T CD4+ i wydzielania przez nie cytokin prozapalnych [22, 136, 137].

1.10.2. Leczenie modyfikujące przebieg choroby

Celem DMT jest zmniejszenie rocznej liczby rzutów i zahamowanie /spowolnienie progresji choroby. Wykorzystywane są w tym celu DMDs. Zestawione są one poniżej.

Tabela 3. Zestawienie obecnie stosowanych DMDs w terapii SM

Lek	Mechanizm działania	Uwagi
Interferon β [138, 139]	• Hamowanie proliferacji limfocytów Th (w tym Th17) i ekspresji antygenów zgodności tkankowej • Zwiększanie syntezy IL-10 i zmniejszanie wytwarzania cytokin prozapalnych • Hamowanie migracji komórek zapalnych przez BKM • Aktywacja komórek NK (ang. natural killer cells) i makrofagów • Regulacja prezentacji antygenów limfocytom T	• W praktyce klinicznej stosuje się interferon β-1a [138] i 1b [139]. • Lek I linii
Octan glatirameru [140]	• Hamowanie aktywności limfocytów T • Działanie neuroprotekcyjne • Zmniejszenie liczby prozapalnych limfocytów Th1 na rzecz immunoregulujących Th2	• Syntetyczny kopolimer składający się z czterech aminokwasów wchodzących w skład osłonki mielinowej • Lek I linii
Fumaran dimetylu [141, 142]	• Działanie immunomodulujące • Hamowanie różnicowania komórek dendrytycznych • Aktywacja ścieżki transkrypcyjnej czynnika jądrowego Nrf2 i zwiększanie ekspresji genów wpływających na ochronę antyoksydacyjną • Stymulacja odpowiedzi Th2-zależnej	• Ester metylowy kwasu fumarowego • Lek I linii
Teryflunomid [143]	• Hamowanie syntezy pirymidyn poprzez blokowanie dehydrogenazy dihydroorotanowej, co w efekcie zmniejsza proliferację limfocytów T i B	• Aktywny metabolit leflunomidu • Lek I linii
Natalizumab [144, 145]	• Hamowanie wiązania się limfocytów T z VCAM-1 na śródbłonku naczyń poprzez blokowanie znajdującej się na nich $\alpha 4/\beta 1$ integryny	• Humanizowane przeciwciało monoklonalne blokujące $\alpha 4/\beta 1$ – integrynę na limfocytach • Lek II linii*

Fingolimod [145, 146]	• Internalizacja receptorów dla fosforanu-1-sfingozyny, co powoduje hamowanie uwalniania limfocytów z węzłów chłonnych • Działanie neuroprotekcyjne	• Strukturalny analog sfingozyny, który jest fosforylowany wewnątrz komórki • Lek II linii*
Mitoksantron [147]	• Efekt cytotoksyczny • Hamowanie transkrypcji i translacji poprzez wiązanie z DNA • Hamowanie proliferacji limfocytów, APCs oraz wytwarzanie cytokin prozapalnych	• Syntetyczny antybiotyk antracyklinowy o silnym działaniu przeciwnowotworowym • Lek III linii
Alemtuzumab [148]	• Zmniejszanie liczby dojrzałych, wykazujących ekspresję CD52, limfocytów na obwodzie	• Przeciwciało monoklonalne anty - CD52 • Lek II linii*
Kladrybina [21, 149]	• Hamowanie syntezy DNA dzielących się limfocytów T i B • Pobudzanie apoptozy limfocytów T i B	• Syntetyczny analog deoksyadenozyny • Stosowana w przypadkach RRMS o dużej aktywności • Rekonstrukcja układu immunologicznego • Lek II linii*
Okrelizumab [150]	• Hamowanie aktywności limfocytów B wykazujących ekspresję CD20	• Humanizowane przeciwciało anty - CD20 • Lek II linii*

* W przypadkach SM o dużej aktywności lek stosuje się w I linii leczenia.

Rzadziej w DMT stosuje się dożylnie immunoglobuliny ludzkie, azatioprynę, metotreksat, cyklofosfamid i plazmaferezę.

1.10.3. Leczenie objawowe

W leczeniu SM ważne miejsce zajmuje postępowanie objawowe. Jest ono wielokierunkowe i obejmuje leczenie spastyczności, zespołu zmęczenia, zaburzeń zwieraczy, bólu, zaburzeń seksualnych, depresji, a także działania mające na celu poprawę funkcji poznawczych.

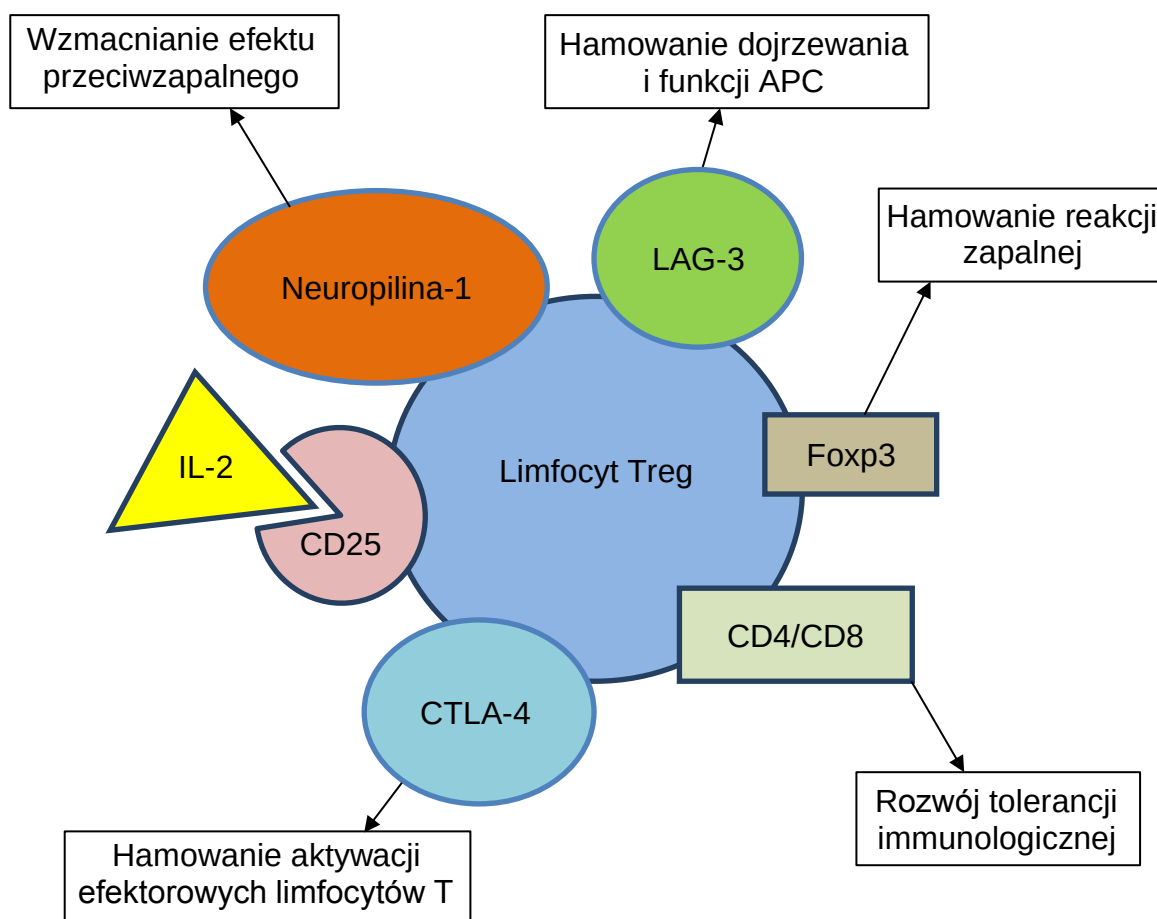
2. Limfocyty T regulatorowe i cytokiny związane z ich funkcją

2.1. Limfocyty T regulatorowe (Treg)

Ostatnio wiele uwagi poświęca się roli limfocytów Treg w patogenezie SM. Ich funkcję można najogólniej określić jako hamowanie reakcji immunologicznej. Często hamują autoreaktywną i / lub zbyt nasiloną odpowiedź układu immunologicznego, z czego wynika ich ważna funkcja regulatorowa i duże znaczenie w rozwoju chorób autoimmunologicznych. Są one również kluczowe dla prawidłowego rozwoju tolerancji immunologicznej. Limfocyty Treg charakteryzują się ekspresją czynnika transkrypcyjnego Foxp3 [151] i cząsteczki CD25, która stanowi łańcuch α receptora dla interleukiny 2 [152]. Należy jednak zaznaczyć, że istnieją limfocyty, które także hamują odpowiedź układu immunologicznego i nie wykazują ekspresji ww. cząsteczek. Są one również zaliczane do limfocytów Treg w szerszym znaczeniu tego określenia. Jednak w znaczeniu ścisłym, jak zostało wspomniane, do grupy limfocytów Treg zaliczają się jedynie komórki wykazujące ekspresję Foxp3 i CD25. W badaniu przeprowadzonym na myszach wykazano, że czynnik Foxp3 ma kluczowe znaczenie dla immunosupresyjnych właściwości limfocytów Treg [153]. Ponadto większość z nich wykazuje ekspresję CD103, LAG-3 (ang. Lymphocyte-activation gene-3) oraz CTLA-4 (ang. cytotoxic T cell antigen-4). Do tej pory nie odnaleziono jednak markera, który byłby specyficzny dla tych komórek [23]. Jest to heterogenna grupa limfocytów o odmiennych immunofenotypach. Znajdują się wśród nich zarówno limfocyty CD4+ [23, 154, 155], CD8+ [156] oraz niewykazujące ekspresji żadnej z tych cząsteczek [157]. W zależności od podjednostek receptora, z którym się łączą wyróżniamy limfocyty T_{H1} [158] i T_{H2} [159]. Limfocyty Treg powstają zarówno w grasicy jak i na obwodzie z limfocytów konwencjonalnych. Jednym z ważniejszych mechanizmów działania limfocytów Treg jest wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, przede wszystkim IL-10, TGF- β i IL-35. Innym mechanizmem jest zabijanie komórek układu odpornościowego poprzez wydzielanie granzymu A, granzymu B oraz perforyny. W procesie tym istotna jest cząsteczka CD46, która przekazuje sygnały limfocytom Treg [160]. Mogą one też wytwarzać działającą immunosupresyjnie adenozyne przy udziale cząsteczek CD39 i CD73 [161]. Innym ważnym pośrednikiem, za pomocą którego omawiane limfocyty wywierają efekt immunosupresyjny jest cAMP, który hamuje limfocyty i komórki dendrytyczne [162]. Warto też nadmienić, że limfocyty Treg wykazują szereg cząsteczek powierzchniowych o znaczeniu immunosupresyjnym.

Należy do nich CTLA-4 (hamowanie aktywacji efektorowych limfocytów T) [163], LAG-3 (hamowanie dojrzewania i funkcji APCs) [164], neuropilina-1 (poprzez interakcję z semaforyną-4a na powierzchni innych komórek układu immunologicznego wzmacnia efekt limfocytów Treg) [165].

Udział limfocytów Treg w patogenezie SM jest ewidentny. Álvarez-Sánchez i wsp. badali w 2019 r. rolę limfocytów Treg CD39+ w RRMS. Częsteczka CD39 ma duże znaczenie dla właściwości immunosupresyjnych tych komórek i ściśle związana jest z ich funkcją. Wykazano, że ich liczba we krwi obwodowej zwiększa się w czasie rzutu i koreluje z wartością EDSS [166]. Większość wcześniejszych badań wykazała jednak odwrotną korelację pomiędzy liczbą limfocytów Treg i nasileniem ekspresji ich cząsteczek powierzchniowych, a nasileniem choroby i wynikiem w skali EDSS. Ich przedmiotem badań nie były jednak komórki CD39+ [167 - 169]. Ciekawych danych dostarczyło badanie z 2011 r., w którym autorzy zauważyli mniejszą liczbę limfocytów Treg we krwi obwodowej osób z SM w porównaniu z osobami zdrowymi, jednak w czasie rzutu ich liczba wracała do normy [170]. Wg Li i wsp. rozbieżności w wynikach badań mogą wynikać z różnych immunofenotypów badanych limfocytów Treg. W 2019 roku przeprowadzili oni metaanalizę, w której podkreślają, że proporcja limfocytów Treg we krwi obwodowej pacjentów z SM jest niższa w porównaniu z osobami zdrowymi pod warunkiem, że zdefiniujemy je jako komórki CD4+ CD25+ Foxp3+ [171].



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie limfocyta Treg

Nie powinien dziwić fakt, że komórki te są potencjalnym ważnym celem w opracowywaniu nowych DMDs. Udowodniono, że octan glatirameru wpływa na zwiększenie ich produkcji IL-10 [172]. Z kolei interferon β -1a zwiększa ich liczbę we krwi obwodowej [173]. Schlöder i wsp. wykazali w 2017 r., że terapia fumaranem dimetylu przywraca limfocytom T efektorowym wrażliwość na działanie limfocytów Treg [174]. Podobne działanie ma interferon β -1b [175]. W badaniu z 2019 r. Shariati i wsp. badali wpływ sylimaryny (zioła znanego już w starożytności) na limfocyty Treg *in vitro*. Badanie pokazało, że substancja ta zwiększa ich proliferację, produkcję przez nie cytokin przeciwzapalnych i ekspresję ważnych cząsteczek powierzchniowych [176].

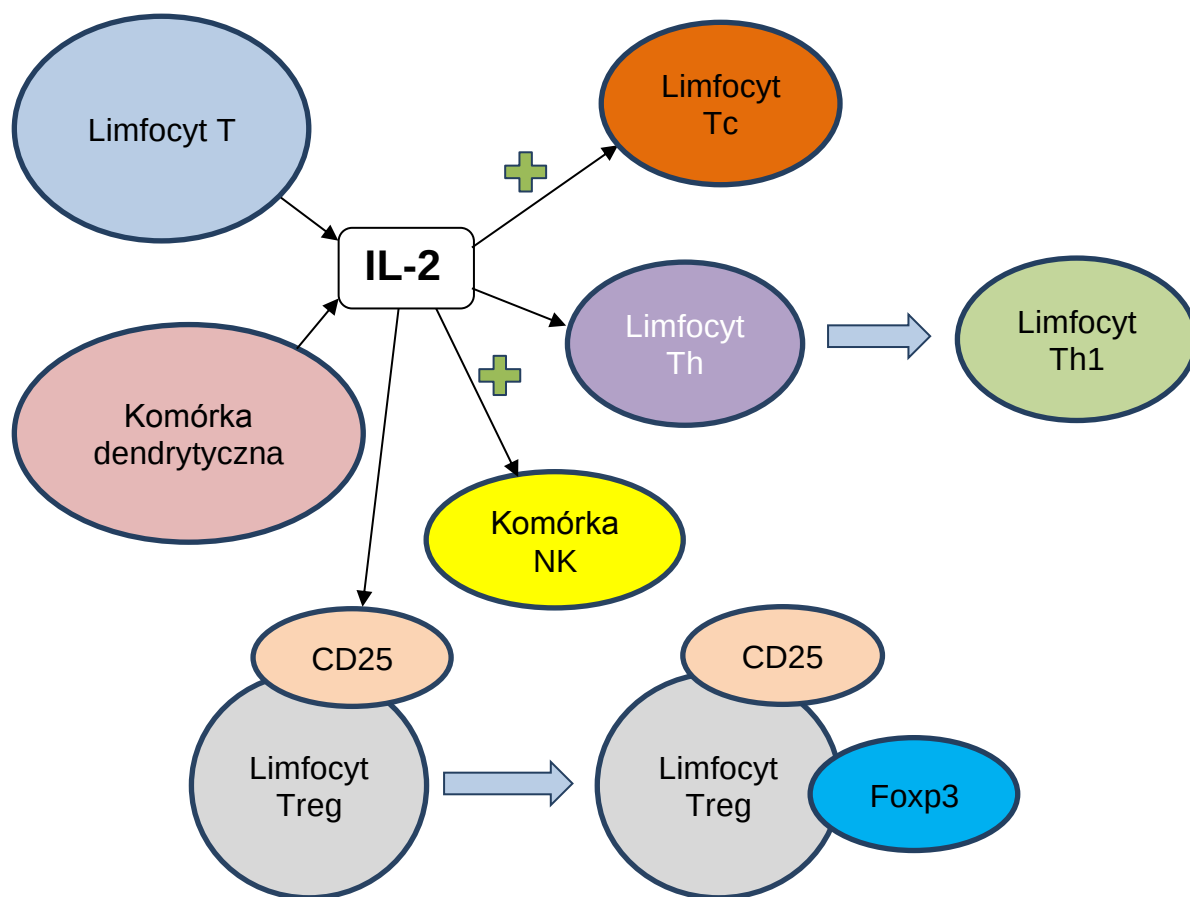
2.2. Wybrane cytokiny prozapalne i przeciwzapalne

2.2.1. Interleukina 2

Interleukina 2 to monomer o masie cząsteczkowej 15,5 – 16,0 kDa [177]. Pod względem chemicznym jest glikozylowanym polipeptydem. Po raz pierwszy została zidentyfikowana w 1976 r [178]. Wytwarzana jest głównie przez limfocyty T, komórki dendrytyczne i mikroglej. Jest cytokiną prozapalną. Efekt ten wywołuje głównie poprzez pobudzanie wzrostu limfocytów T cytotoksycznych [179]. Stymuluje także różnicowanie limfocytów Th w kierunku Th1 [180]. Jest ważnym czynnikiem aktywacji komórek NK, które mają zdolność usuwania komórek nowotworowych oraz zakażonych wirusem. Z drugiej jednak strony cytokina ta jest ważna dla rozwoju i przetrwania limfocytów Treg, które wykazują na swojej powierzchni ekspresję cząsteczki CD25 stanowiącej łańcuch α jej receptora [152, 181 - 184]. Uważa się, że limfocyty Treg mogą wywierać swój efekt immunosupresyjny między innymi poprzez interakcję z IL-2. Mogłoby odbywać się to w dwóch potencjalnych mechanizmach: hamowanie produkcji IL-2 i/lub wiązanie jej poprzez cząsteczkę CD25 [185]. Skutkowałoby to brakiem stymulacji limfocytów T cytotoksycznych i ich apoptozą. Bardziej prawdopodobny jest jednak pierwszy z wymienionych mechanizmów, ponieważ wykazano, że efekt przeciwzapalny limfocytów Treg jest niezależny od wiązania przez nie IL-2 [186]. Możliwe, że istotne znaczenie dla działania przeciwzapalnego limfocytów Treg ma zwiększanie na ich powierzchni ekspresji czynnika Foxp3 na skutek stymulacji przez IL-2 [184].

Już w 1986 r. wykryto ekspresję IL-2 i jej receptora przez komórki znajdujące się w obrębie plak SM w mózgowiu [187]. Rok później stwierdzono za pomocą cytofluorografii obecność w PMR chorych na SM oraz inne choroby zapalne OUN obecność komórek wykazujących ekspresję receptora IL-2 [188]. Ciekawych danych dostarczyło również badanie przeprowadzone 22 lata później z użyciem cytometrii przepływowej. Jego autorzy nie znaleźli w PMR istotnych różnic w liczbie komórek wykazujących ekspresję IL-2 w porównaniu z osobami zdrowymi, natomiast odnotowali u pacjentów z SM większą liczbę innych komórek zapalnych, które nie wykazywały ekspresji tej cytokiny [189]. W 1996 r. stwierdzono jej podwyższone stężenie w surowicy pacjentów z SM w czasie rzutu, co zdecydowanie sugerowało udział tej cytokiny w zaostrzeniach reakcji zapalnej w przebiegu SM [190].

Produkcja IL-2 oceniana też była kilkakrotnie jako wykładnik skuteczności leczenia DMDs [191, 192]. W badaniu z 2016 r. wykazano, że terapeutyczna modulacja receptora IL-2 przywraca komórkom NK ich (zaburzoną w SM) aktywność cytolityczną, co powinno niewątpliwie skłaniać do badań nad DMDs działającymi na IL-2 i / lub jej receptor [193]. Takim lekiem był daklizumab – przeciwciało blokujące receptor IL-2. Został on jednak wycofany z powodu poważnych działań niepożądanych. Co ciekawe, wydaje się, że witamina D₃ może działać protekcyjnie w SM poprzez utrzymywanie ekspresji CD25 na powierzchni limfocytów Treg jak również stężenia rozpuszczalnej formy tej cząsteczki w surowicy [194]. Z pewnością znaczenie IL-2 w SM wymaga dalszych badań i będzie im poddawane.



Rycina 4. Wybrane aspekty sieci IL-2

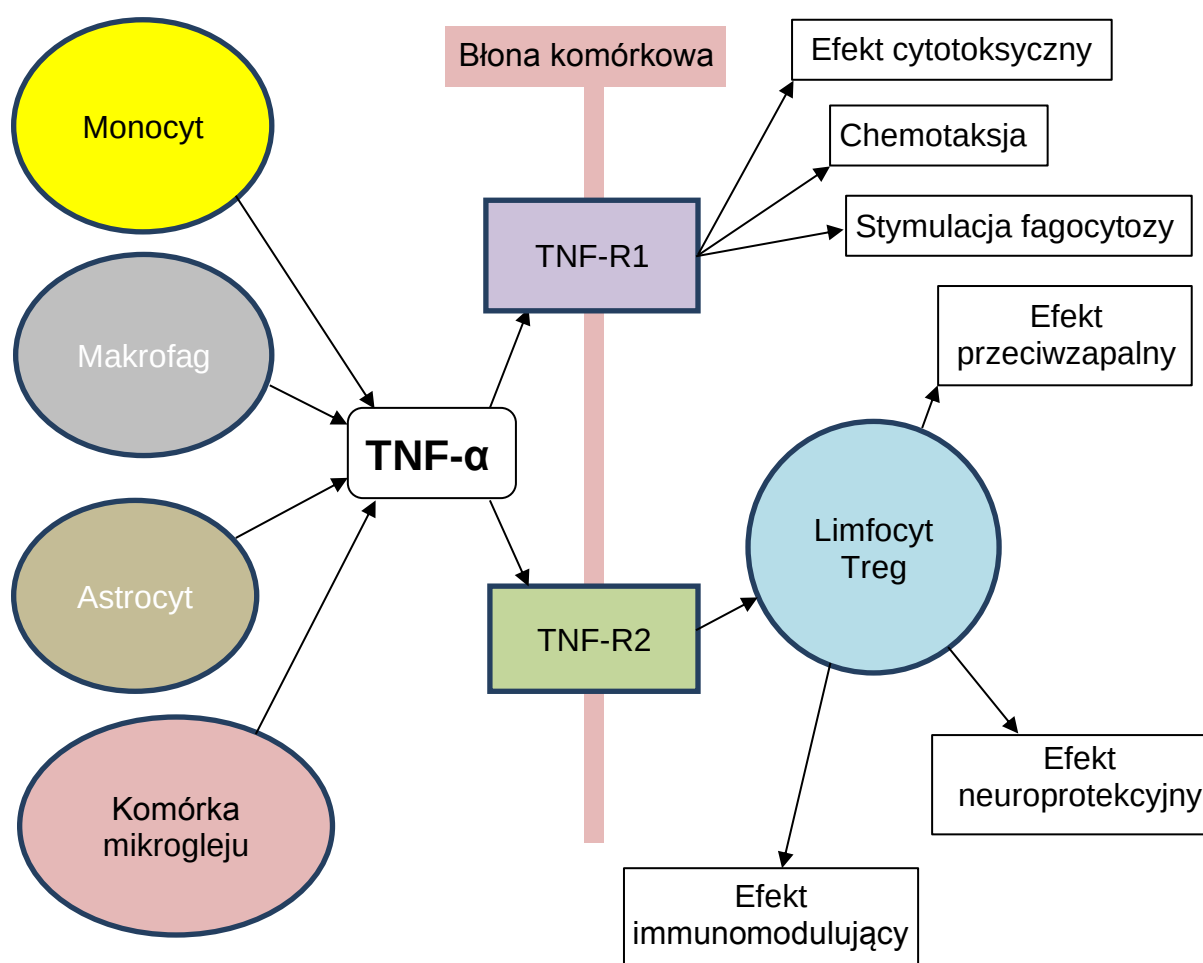
2.2.2. Czynn timer martwicy nowotworów – α

Czynnik martwicy nowotworów – α (ang. tumor necrosis factor – α , TNF- α) jest cytokiną prozapalną należącą do nadrodziny TNFSF (ang. tumor necrosis factor superfamily). Pod względem chemicznym jest to glikoproteina złożona ze 182 aminokwasów. Odkrycia cytokiny dokonano w 1968 r [195]. Ma postać homotrimerów. W organizmie występuje w dwóch postaciach: transbłonowe białko prekursorowe o masie 26 kDa oraz forma rozpuszczalna o masie 17 kDa. Obie formy są aktywne biologicznie [196]. Produkowany jest głównie przez monocyty i makrofagi, natomiast w OUN głównie przez astrocyty i aktywowany mikroglej. Podobnie jak IL-2, działa poprzez receptory błonowe. Rozróżniamy ich dwa rodzaje: TNF-R1 (białko p55) i TNF-R2 (białko p75) [27]. Czynn timer martwicy nowotworów – α jest cytokiną pleiotropową [27]. Jego ważna funkcja to działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe i komórki zakażone patogenami [197]. Doprowadza on do śmierci komórek uruchamiając kaskadę kwasu arachidonowego, co skutkuje tworzeniem wolnych rodników i apoptozą. Jest jedną z ważniejszych cytokin prozapalnych wytwarzanych przez autoreaktywne limfocyty Th1 po przejściu przez BKM [23, 26]. Inna ważna funkcja TNF- α polega na stymulacji fagocytozy. Ma także właściwości chemotaktyczne – przyciąga neutrofile do ognisk zapalnych. Zwiększa produkcję czynników ostrej fazy w wątrobie. Jest wreszcie ważną cytokiną regulującą działanie naturalnych limfocytów Treg. Wykazano, że działanie TNF- α może być związane z ich funkcjonalną niedojrzałością [198]. Okazało się, że TNF- α podtrzymuje funkcję limfocytów Treg działając poprzez receptor TNF-R2. W efekcie, działanie poprzez ten receptor skutkuje efektem przeciwzapalnym, immunomodulującym i neuroprotektynym, co rzadko podkreślane jest przy omawianiu właściwości tej cytokiny. Jest to istotna różnica w porównaniu z działaniem poprzez receptor TNF-R1, który jest zdecydowanie bardziej rozpowszechniony i wiąże się z efektem prozapalnym [199].

Znaczenie TNF- α w SM jest z pewnością duże. Wykazano, że niesprawność i jej progresja w przebiegu tego schorzenia są pozytywnie skorelowane ze stężeniem rozpuszczalnego receptora TNF-R1, natomiast negatywnie ze stężeniem TNF-R2 w surowicy, co potwierdza prozapalny efekt tej cytokiny w SM [199, 200]. Odkryto ponadto, że stężenie TNF- α w surowicy koreluje z ryzykiem rzutu [201].

Przeprowadzono do tej pory wiele badań oceniających wpływ stosowanego leczenia na produkcję TNF- α [202 - 206]. Z uwagi, że cytokina ta cechuje się wielokierunkowym działaniem i zaangażowana jest w proces zapalny w SM, korzystna

byłaby jej terapeutyczna blokada. Badanie kliniczne z 1999 r. oceniało skuteczność i bezpieczeństwo stosowania lenerceptu (białko fuzyjne IgG1 receptora TNF-R1) w terapii SM. Musiało ono jednak zostać przerwane z uwagi na zaostrzenie objawów choroby w grupie leczonej [207]. Opracowanie skutecznego leku blokującego tę cytokinę wymaga dalszych badań.



Rycina 5. Wybrane aspekty sieci TNF-α

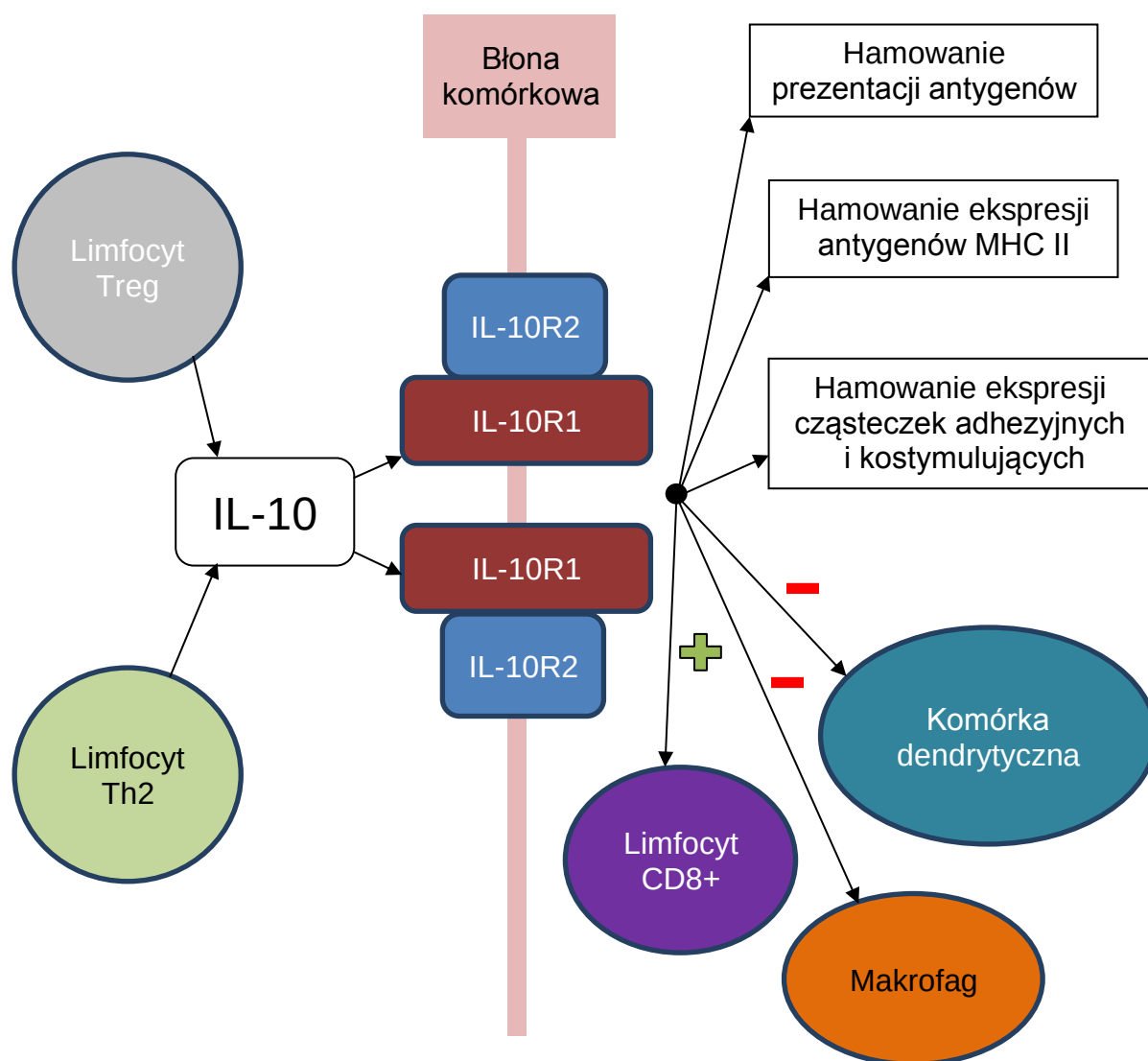
2.2.3. Interleukina 10

Interleukina 10, czyli czynnik hamujący syntezę cytokin (ang. cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF), jest cytokiną plejotropową o właściwościach

przeciwzapalnych, produkowaną przede wszystkim przez limfocyty Treg, Th2, CD8+, B, komórki dendrytyczne i makrofagi [208, 209]. Została odkryta w 1989 r [210]. Jest homodimerem o masie cząsteczkowej 37 kDa. Każda z jej podjednostek składa się ze 178 aminokwasów [211]. Jej receptor należy do rodziny receptorów cytokin typu II i złożony jest z dwóch podjednostek, z których każda składa się z dwóch części: IL-10R1 i IL-10R2 [212]. Ekspresję receptora dla IL-10 wykazują limfocyty T, NK i APCs. Związanie IL-10 z jej receptorem wywołuje kaskadę procesów z udziałem STAT3, kinaz tyrozynowych, cząsteczek JAK1 i Tyk2 [213]. Interleukina 10 hamuje prezentację antygenów, ekspresję antygenów MHC II, cząsteczek kostymulujących (CD80 i CD86) oraz adhezyjnych [214]. Hamuje także różnicowanie i dojrzewanie komórek dendrytycznych, a także wytwarzanie cytokin prozapalnych przez nie i makrofagi. Zwiększa ekspresję immunosupresyjnej cząsteczki B7-H4 na powierzchni komórek dendrytycznych, co zmniejsza aktywację i proliferację limfocytów T CD4+, a także promuje ich różnicowanie w limfocyty Treg [215]. Jest czynnikiem wzrostu limfocytów T CD8+ [213] oraz jedną z podstawowych cytokin wytwarzanych przez limfocyty Treg [198, 216].

Wiele badań zostało poświęconych roli IL-10 w SM. Wiadomo, że w chorobie tej zaburzona jest funkcja limfocytów Treg i działanie IL-10 [217]. Do obniżenia produkcji tej cytokiny dochodzi zarówno w RRMS, jak i w SPMS [218]. Wykazano, że za zmniejszoną jej produkcję w tej chorobie może odpowiadać zmniejszenie ekspresji receptorów TLR9 (ang. toll – like receptor 9) na powierzchni limfocytów B, które ją wytwarzają [219]. Okazało się też, że funkcjonalne polimorfizmy w obrębie genu IL-10 mogą wpływać na wielkość jej produkcji i, co z tym bezpośrednio związane, przebieg SM [220]. Nie znaleziono istotnego związku IL-10 z zaburzeniami funkcji poznawczych w SM [221]. Wykazano, że ekspresja genu IL-10 zwiększana jest u pacjentów pobierających witaminę D₃ [222].

Na produkcję IL-10 wpływa terapia DMDs [172, 223 - 225].



Rycina 6. Wybrane aspekty sieci IL-10

2.2.4. Transformujący czynnik wzrostu – β

Transformujący czynnik wzrostu – β (ang. transforming growth factor – β , TGF- β) jest cytokiną o właściwościach przeciwzapalnych i pleiotropowych, która produkowana jest przez wszystkie linie leukocytów [226]. Jego nazwa znajduje głębokie uzasadnienie z uwagi na zdolność do transformacji komórek nienowotworowych w nowotworowe [227]. Należy do tzw. nadrodziny TGF- β , do której należy także np. aktywina, białko morfogenetyczne kości czy inhibina. U ludzi do tej pory opisano trzy izoformy TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 [228, 229]. Ich ekspresja jest odmienna zarówno pod względem miejsca jak i czasu [227]. Izoformę TGF- β 1

odkryto w 1982 r. [230], TGF- β 2 w 1987 r. [231], natomiast TGF- β 3 w 1988 r. [232]. Zidentyfikowano także izoformę TGF- β 4 i TGF- β 5, jednak do tej pory tylko u odpowiednio ptaków i żab [233]. Wszystkie izoformy są homologami w 70 – 80%. Ich cząsteczki składają się z dwóch łańcuchów zawierających 112 aminokwasów i mają masę około 25 kDa [234]. Uszkodzenie genu TGF- β u myszy skutkuje rozwojem reakcji zapalnej [235]. Jednak oprócz właściwości typowo przeciwzapalnych, kontroluje on proliferację wielu typów komórek w trakcie ich rozwoju. Sygnał przekazuje do komórki za pośrednictwem trzech typów receptorów: TGF- β RI, TGF- β RII i TGF- β RIII. Typy I i II tworzą heterotetrameryczny kompleks złożony z dwóch receptorów typu I i dwóch receptorów typu II [232, 236]. Proces aktywacji TGF- β jest skomplikowany i może być wywołany przez zmianę pH, metaloproteiny, wolne rodniki, trombospondynę-1 czy integryny. Już w 1986 r. odkryto, że TGF- β reguluje proliferację limfocytów T [237]. Hamuje aktywność limfocytów T cytotoksycznych i produkcję cytokin prozapalnych, natomiast zwiększa produkcję cytokin przeciwzapalnych [238, 239]. Stanowi on jedną z najważniejszych cytokin wytwarzanych przez limfocyty Treg [198]. Co ciekawe, stymuluje też dojrzewanie tych komórek z limfocytów CD4+ [240, 241]. Ponadto, zwiększa ekspresję czynnika Foxp3 na powierzchni limfocytów Treg [242]. Jego brak może doprowadzić do zwiększonej apoptozy tych limfocytów [243]. Odkryto też, że TGF- β hamuje różnicowanie limfocytów Th17 [243]. Omawiana cytokina wpływa też na limfocyty B hamując ich proliferację, aktywację i syntezę przeciwciał [245]. Poprzez hamowanie czynnika NF- κ B zmniejsza aktywność aktywowanych makrofagów [246].

Znaczenie TGF- β w SM od wielu lat budzi zainteresowanie. W 2015 r. wykazano, że suplementacja witaminy D₃ u pacjentów z SM zwiększa ekspresję mRNA TGF- β 2, co może wiązać się z immunosupresyjnym działaniem tej witaminy [229]. Co ciekawe, efektu tego nie zaobserwowano w przypadku izoformy TGF- β 1 [222]. Wyniki takie mogą świadczyć o odmiennych funkcjach i roli tych dwóch izoform w patogenezie SM. Meoli i wsp. stwierdzili u pacjentów z SM nieprawidłowości w przekazywaniu sygnału TGF- β , które występują zarówno na etapie ekspresji genów, wiązania cytokiny z jej receptorami jak i wewnątrzkomórkowej drogi sygnałowej [226]. Już w 2001 r. stwierdzono, że genetyczna zmienność w zakresie genu TGF- β 1 nie wpływa w znaczącym stopniu na podatność na SM [247]. Udowodniono zwiększoną produkcję TGF- β 1 przez limfocyty B w przebiegu SM [248].

53

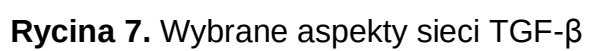
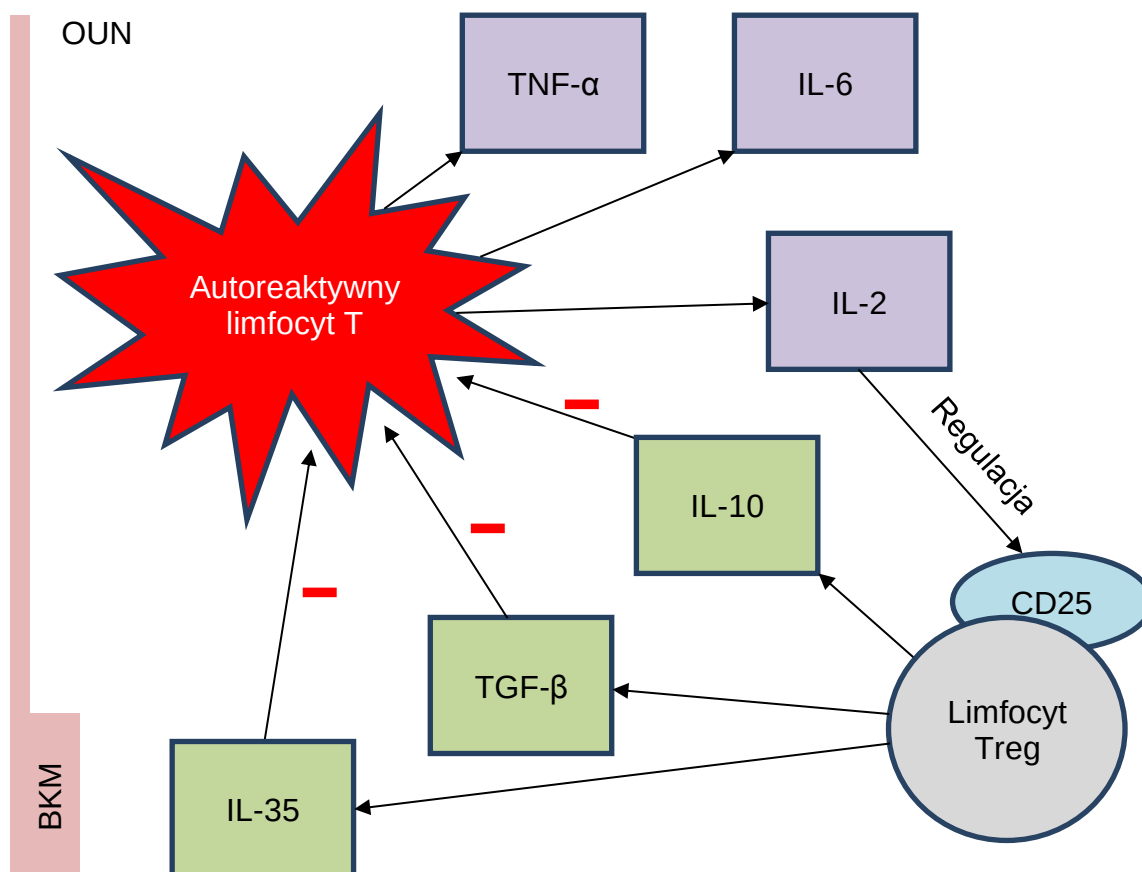


Tabela 4. Zestawienie podstawowych cech IL-2, TNF- α , IL-10 i TGF- β

L.P	Parametr	IL-2	TNF- α	IL-10	TGF- β
1	Rok odkrycia	1976	1968	1989	1982 (TGF- β 1)
2	Budowa	Glikozylowany polipeptyd o strukturze α - helisy, monomer	Glikoproteina złożona ze 182 aminokwasów, homotrimer.	Homodimer (każda z podjednostek składa się ze 178 aminokwasów)	Cząsteczki składają się z dwóch łańcuchów zawierających 112 aminokwasów
3	Masa cząsteczkowa [kDa]	15,5 – 16,0	17,0 albo 26,0 (w zależności od postaci)	37	Okolo 25
4	Pochodzenie	Limfocyty T, komórki dendrytyczne, mikroglej	Monocyty, makrofagi; w OUN mikroglej i astrocyty	Limfocyty Treg, Th2, CD8+, B; komórki dendrytyczne i makrofagi	Wszystkie linie leukocytów
5	Receptor	Złożony z 3 podjednostek: α (CD25), β (CD122) i γ (CD132)	- TNF-R1 (p55): ekspresja w większości tkanek. - TNF-R2 (p75): ekspresja głównie na powierzchni komórek układu immunologicznego.	- Należy do rodziny receptorów cytokin typu II. - Złożony z dwóch podjednostek, z których każda składa się z dwóch części: IL-10R1 i IL-10R2.	Receptory: TGF- β RI, TGF- β RII i TGF- β RIII
6	Stosunek do reakcji zapalnej	Cytokina prozapalna	- Działanie poprzez TNF-R1: efekt prozapalny. - Działanie poprzez receptor TNF-R2: efekt przeciwzapalny, immunomodulujący i neuroprotekcyjny.	Cytokina przeciwzapalna	Cytokina przeciwzapalna

L.P	Parametr	IL-2	TNF- α	IL-10	TGF- β
7	Działanie	• Pobudzanie limfocytów T cytotoksycznych. • Pobudzanie różnicowania limfocytów Th w kierunku limfocytów Th1. • Aktywacja komórek NK. • Regulacja funkcji limfocytów Treg poprzez cząsteczkę CD25	• Działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe i zakażone patogenami. • Stymulacja fagocytozy. • Działanie chemotaktyczne na neutrofile. • Zwiększanie produkcji czynników ostrej fazy w wątrobie. • Regulacja działania naturalnych limfocytów Treg i podtrzymywanie ich funkcji	• Hamowanie prezentacji antygenów. • Hamowanie ekspresji antygenów MHC II cząsteczek kostymulujących (CD80 i CD86) oraz adhezyjnych. • Hamowanie różnicowania i dojrzewania komórek dendrytycznych. • Hamowanie wytwarzania cytokin prozapalnych. • Zwiększanie ekspresji czynnika Foxp3 na powierzchni limfocytów Treg. • Czynniki wzrostu limfocytów T CD8+.	• Hamowanie aktywności limfocytów T • Zwiększanie produkcji cytokin prozapalnych. • Zwiększanie produkcji cytokin przeciwzapalnych. • Stymulacja dojrzewania limfocytów Treg z limfocytów CD4+. • Zwiększanie ekspresji czynnika Foxp3 na powierzchni limfocytów Treg. • Hamowanie różnicowania limfocytów Th17. • Hamowanie proliferacji, aktywacji i syntezy przeciwciał. • Zmniejszanie aktywności aktywowanych makrofagów.

Sieć funkcjonalna limfocytów Treg jest bardzo złożona. Obejmuje ona liczne cytokiny, zarówno wytwarzane przez te komórki jak i na nie wpływające. Sieć ta stanowi swoisty układ niezwykle istotny dla zachowania równowagi immunologicznej i tłumienia patologicznych, wzmożonych reakcji immunologicznych. Do takich reakcji dochodzi w przebiegu wielu chorób autoimmunologicznych, w tym w SM. Rycina 8 przedstawia sieć czynnościową limfocytów Treg w SM.



Rycina 8. Sieć funkcjonalna i rola limfocytów Treg w patogenezie SM

Jak wspomniano, w SM dochodzi do upośledzenia funkcji limfocytów Treg i ich sieci funkcjonalnej [166 - 171], co może mieć istotne znaczenie w patogenezie tej choroby. Dokładny mechanizm tych interakcji nie jest jednak znany. Opublikowano do tej pory wyniki wielu badań eksplorujących tą tematykę, jednak ich liczba w dalszym ciągu jest zbyt mała. Co więcej, lepsze poznanie tych złożonych mechanizmów mogłoby przyczynić się do powstania nowych DMDs mających swój terapeutyczny

punkt uchwytu we wspomnianej sieci. Przykładowo lek taki mógłby wpływać bezpośrednio na limfocyty Treg i zwiększać produkcję wytwarzanych przez nie cytokin przeciwzapalnych.

Z uwagi na ważną rolę cytokin w rozwoju SM, istotną funkcję sieci limfocytów Treg w tłumieniu reakcji zapalnej oraz słabe poznanie immunopatogenezy RRMS we wczesnym okresie choroby, w niniejszej pracy doktorskiej zbadano udział dwóch cytokin prozapalnych i dwóch wytwarzanych przez limfocyty Treg cytokin przeciwzapalnych w immunopatogenezie RRMS w czasie do 1 roku od momentu postawienia diagnozy. Przedstawione wyniki mogą posłużyć opracowaniu nowych, skutecznych już we wczesnym okresie RRMS, DMDs, których punktami uchwytu będą badane cytokiny lub bezpośrednio limfocyty Treg. Ponadto, mogą przyczynić się do odkrycia markerów wczesnego RRMS.

3. Cele pracy

3.1. Cele ogólne

Analiza stężeń w surowicy i PMR we wczesnym okresie (do 1 roku od postawienia diagnozy) RRMS:

- cytokin prozapalnych (IL-2 oraz TNF- α),
- cytokin przeciwzapalnych wytwarzanych przez limfocyty Treg (IL-10 i TGF- β 2).

3.2. Cele szczegółowe

Udzielenie odpowiedzi na poniższe pytania:

1. Czy istnieją statystycznie istotne różnice stężeń badanych cytokin w surowicy i PMR pomiędzy chorymi we wczesnym okresie RRMS w czasie rzutu, w czasie remisji, a pacjentami z grupy kontrolnej?
2. Czy istnieje statystycznie istotna różnica stężeń badanych cytokin w surowicy i PMR w zależności od obecności cech aktywności choroby w MRI w grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja?

3. Czy istnieją statystycznie istotne różnice w zakresie wartości indeksów dla poszczególnych cytokin pomiędzy badanymi grupami?
4. Czy istnieje statystycznie istotna różnica w zakresie indeksów poszczególnych cytokin w zależności od obecności cech aktywności choroby w MRI w grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja?
5. Czy istnieje statystycznie istotna korelacja pomiędzy stężeniami badanych cytokin w surowicy krwi i PMR, a wartościami indeksu IgG?
6. Czy istnieje statystycznie istotna korelacja pomiędzy stężeniami badanych cytokin w surowicy i PMR, a czasem trwania rzutu?
7. Czy istnieje statystycznie istotna korelacja pomiędzy wartościami indeksów dla poszczególnych cytokin, a czasem trwania rzutu?

4. Materiał i metody

Niniejsze badanie naukowe zostało przeprowadzone po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 677/17 z dnia 22.06.2017 r. oraz aneks – uchwała nr 90/19 z dnia 10.01.2019 r.)

4.1. Osoby badane

Do badania włączono łącznie 52 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego w Poznaniu) w latach 2017 – 2019. Każdy z nich, po uprzednim skrupulatnym poinformowaniu o celach i metodyce badania, wyraził pisemną zgodę na udział w badaniu, która została wyrażona na formularzach zatwierdzonych przez ww. komisję bioetyczną. U 32 pacjentów rozpoznano RRMS (18 z nich znajdowało się w czasie rzutu choroby, natomiast 14 w czasie remisji). Chorzy Ci zostali przyjęci do szpitala celem diagnostyki w kierunku SM, która obejmowała

nakłucie łądźwiowe z pobraniem PMR. Pozostali pacjenci przyjęci zostali z różnych wskazań, z których wszystkie wiązały się z koniecznością analizy PMR. U tych chorych wykluczono zapalne choroby OUN, po czym zakwalifikowano ich do grupy kontrolnej.

Spośród pacjentów włączonych do badania wyodrębniono trzy grupy badawcze:

- pacjenci we wczesnym okresie RRMS w czasie rzutu (Grupa RRMS-rzut, n = 18)
 - pacjenci we wczesnym okresie RRMS w czasie remisji (Grupa RRMS-remisja, n = 14)
- grupa kontrolna (n = 20).

4.1.1. Grupa RRMS-rzut

Kryteria włączenia:

- wiek w przedziale 18 - 65 lat
- diagnoza RRMS postawiona na podstawie kryteriów McDonald'a 2017 [112]
- czas od postawienia diagnozy wynoszący najwyżej 1 rok
- do tej pory bez leczenia DMDs
- zaostrzenie objawów trwające co najmniej 24 godziny, bez gorączki, objawów infekcji czy encefalopatii
- obecność ognisk demielinizacyjnych w mózgowiu i / lub rdzeniu kręgowym w badaniu MRI
- wykluczenie innych możliwych rozpoznań
- świadoma, pisemna zgoda chorego na udział w badaniu.

Kryteria wykluczenia:

- terapia immunomodulująca i / lub terapia immunosupresyjna (w tym steroidoterapia) w ciągu 3 miesięcy przed pobraniem krwi, PMR oraz wykonaniem badania MRI
- ciąża
- przeciwwskazania do wykonania badania MRI

- inna choroba autoimmunologiczna
- borelioza
- niedoczynność tarczycy
- kliniczne lub laboratoryjne wykładniki stanu zapalnego
- objawy alergii w ciągu ostatnich trzech miesięcy.

4.1.2. Grupa RRMS-remisja

Kryteria włączenia:

- wiek w przedziale 18 - 65 lat
- diagnoza RRMS postawiona na podstawie kryteriów McDonalda 2017 [112]
- czas od postawienia diagnozy wynoszący najwyżej 1 rok
- do tej pory bez leczenia DMDs
- chorzy w okresie stabilizacji objawów
- obecność ognisk demielinizacyjnych w mózgu i / lub rdzeniu kręgowym w badaniu MRI
- wykluczenie innych możliwych rozpoznań
- świadoma, pisemna zgoda chorego na udział w badaniu.

Kryteria wykluczenia:

- terapia immunomodulująca i / lub terapia immunosupresyjna (w tym steroidoterapia) w ciągu 3 miesięcy przed pobraniem krwi, PMR oraz wykonaniem badania MRI
- ciąża
- przeciwwskazania do wykonania badania MRI
- inna choroba autoimmunologiczna
- borelioza
- niedoczynność tarczycy
- kliniczne lub laboratoryjne wykładniki stanu zapalnego
- objawy alergii w ciągu ostatnich trzech miesięcy.

4.1.3. Grupa kontrolna

Kryteria włączenia:

- wiek w przedziale 18 - 65 lat
- wskazania do nakłucia lędźwiowego
- wykluczenie choroby zapalnej
- świadoma, pisemna zgoda chorego na udział w badaniu.

Kryteria wykluczenia:

- terapia immunomodulująca i / lub terapia immunosupresyjna (w tym steroidoterapia) w ciągu 3 miesięcy przed pobraniem krwi, PMR oraz wykonaniem badania MRI.
- ciąża
- choroba autoimmunologiczna
- borelioza
- niedoczynność tarczycy
- choroba nowotworowa
- kliniczne i / lub laboratoryjne wykładniki infekcji
- objawy alergii w ciągu ostatnich trzech miesięcy.

U 10 pacjentów z grupy kontrolnej (50,0%) nakłucie lędźwiowe z pobraniem PMR wykonano celem diagnostyki bólu głowy, u 8 (40,0%) celem wykluczenia choroby demielinizacyjnej OUN, natomiast u 2 (10,0%) powyższe dwa wskazania do badania PMR współistniały.

Każdy z włączonych do badania pacjentów został poddany skrupulatnemu badaniu neurologicznemu, które obejmowało zebranie wywiadu i badanie fizykalne.

U każdego pacjenta pobrano jednokrotnie krew i PMR zgodnie ze wskazaniami medycznymi.

Krew żylną pobrano w objętości 10 ml (poza objętością użytą do badań rutynowych) do probówki na skrzep. Po około 15 – 30 minutach pobrany materiał odwirowano. Otrzymaną w ten sposób surowicę podzielono na osiem porcji i następnie przechowywano w temperaturze -80°C.

Płyn mózgowo-rdzeniowy pobrano z określonych wskazań medycznych w objętości 3 ml (poza objętością użytą do badań rutynowych), podzielono na osiem porcji i przechowywano w temperaturze -80°C.

Warunki pobierania i przechowywania surowicy i PMR były takie same w przypadku wszystkich pacjentów włączonych do badania.

4.2. Badanie neuroobrazowe

W ramach diagnostyki SM na podstawie kryteriów McDonalda 2017 [112], u pacjentów wykonano badanie MRI głowy i kręgosłupa szyjnego z i bez podania kontrastu przy użyciu skanera 3T. Oceny radiologicznej dokonywał specjalista radiolog. W przypadku pacjentów z grup RRMS-rzut i RRMS-remisja dokonano ponadto oceny obecności cech aktywności choroby w MRI rozumianych jako stwierdzenie wzmacniających się po podaniu kontrastu gadolinowego ognisk w sekwencji T1-zależnej. U dwóch pacjentów z grupy RRMS-remisja nie wykonano badania MRI w trakcie hospitalizacji, ponieważ wykonali oni to badanie w trybie ambulatoryjnym i nie było potrzeby jego powtarzania celem postawienia diagnozy RRMS.

4.3. Badanie immunoenzymatyczne i obliczanie indeksów cytokin

Pomiaru stężeń cytokin w surowicy i PMR dokonano w Zakładzie Neuroimmunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, przy użyciu ilościowego testu immunoenzymatycznego (ang. enzyme – linked immunosorbent assay, ELISA) w wersji kanapkowej (ang. „sandwich” ELISA). Technika ta służy do oceny jakościowej i ilościowej antygenów różnego pochodzenia. Oznaczenia wykonano zgodnie z zaleceniami i protokołem producenta użytych zestawów testów immunoenzymatycznych.

Użyte zestawy:

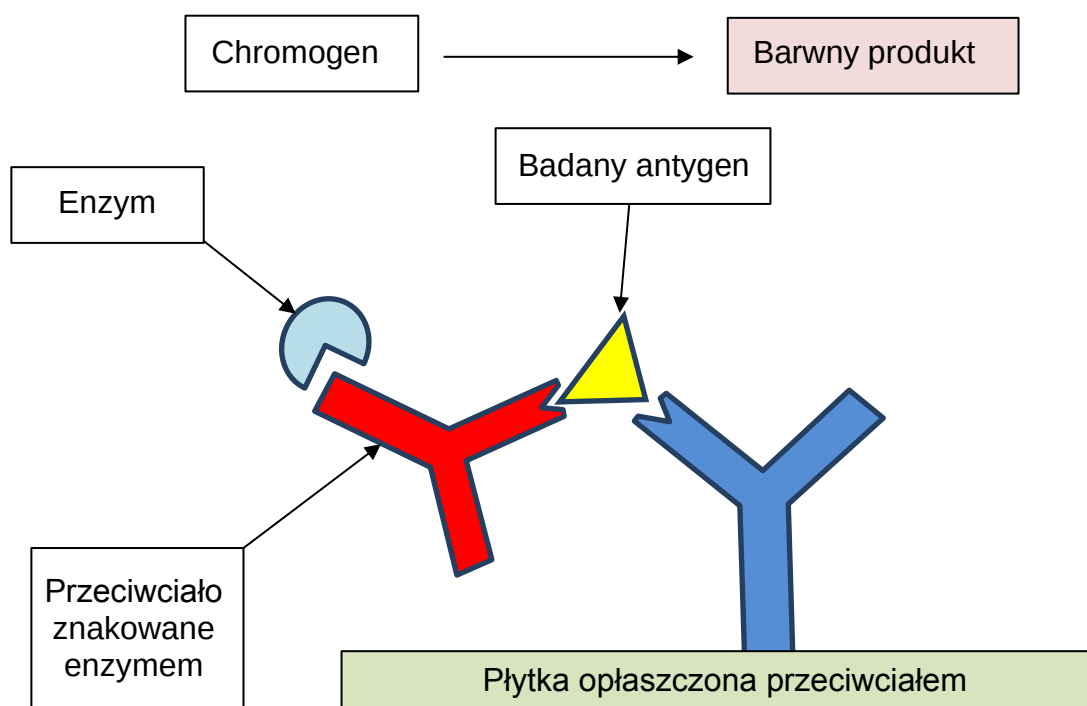
- R&D Systems: Human IL-2 Quantikine HS Elisa Kit
- R&D Systems: Human TNF-α Quantikine HS Elisa
- R&D Systems: Human IL-10 Quantikine HS Elisa Kit

- R&D Systems: Human TGF- β 2 Quantikine Elisa Kit
- R&D Systems: Sample Activation Kit do TGF- β 2.

Wybór zestawów o wysokiej czułości (ang. high sensitivity, HS) poprzedzony został skrupulatnym przeglądem literatury w kierunku zakresu stężeń danych cytokin w surowicy i PMR otrzymywanych w poprzednich tego typu badaniach.

Zestaw dla określonej cytokiny składa się z płytki zawierającej 96 studzienek opłaszczonych unieruchomionymi przeciwciałami rozpoznającymi określone epitopy badanej cząsteczki. Po wprowadzeniu do studzienek badanego materiału, dodaje się do każdej z nich wtórne przeciwciało skierowane przeciw innemu epitopowi badanej cytokiny. Kluczowa jest obecność sprzężonego z tym przeciwciałem enzymu katalizującego przemianę chromogenu do barwnego produktu. Reakcja ta zachodzi po dodaniu substratu (chromogenu). Powstający produkt barwny świadczy o obecności w próbce badanego antygenu, natomiast intensywność zabarwienia (mierzona w kolejnym etapie za pomocą spektrofotometru) o jego stężeniu w badanej próbce.

Schematyczne ujęcie testu ELISA w wersji kanapkowej przedstawia Rycina 9.



Rycina 9. Test ELISA w wersji kanapkowej

Kolejne etapy przeprowadzonego testu przedstawione zostały szczegółowo w punktach poniżej:

- Wyjęcie badanego materiału (surowica i PMR) z zamrażarki (-80°C) do miejsca o temperaturze pokojowej, rozmrożenie i wymieszanie go (unikając pienienia). Wyjęcie standardów kontrolnych z lodówki (4°C) do miejsca o temperaturze pokojowej i wymieszanie ich zawartości unikając pienienia.
- Dodanie do każdej studzienki 100 μl rozcieńczalnika RD 1-9 (IL-2), 50 μl rozcieńczalnika RD 1-40 (TNF- α), 50 μl rozcieńczalnika RD 1-10 (IL-10) lub 100 μl rozcieńczalnika RD 1-17 (TGF- β 2).
- Dodanie materiału badanego i standardów kontrolnych w objętości 100 μl (IL-2, TGF- β 2), 50 μl (TNF- α), 200 μl (IL-10) do studzienek opłaszczonych unieruchomionymi przeciwciałami monoklonalnymi wiążącymi się z określonym epitopem badanego antygenu. Studzienki te w liczbie 96 znajdowały się na specjalnej płytce.
- Po dwóch godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej i trzykrotnym (TGF- β 2), czterokrotnym (IL-2, TNF- α) lub sześciokrotnym (IL-10) płukaniu, dodanie poliklonalnego, biotynylowanego (IL-2, TNF- α), poliklonalnego, sprzężonego z peroksydazą chrzanową (TGF- β 2) lub monoklonalnego, sprzężonego z fosfatazą alkaliczną (IL-10) przeciwciała w objętości 200 μl przeciw określonemu (innemu niż poprzednio) epitopowi badanego antygenu (cytokiny).
- Ponowna inkubacja przez 1 godzinę (IL-2, TNF- α) lub 2 godziny (IL-10, TGF- β 2) i trzykrotne (TGF- β 2), czterokrotne (IL-2, TNF- α) lub sześciokrotne (IL-10) płukanie.
- Dodanie 200 μl polimeru-HRP streptawidyny znakowanej enzymem (IL-2, TNF- α).
- Dodanie 200 μl roztworu substratu (TGF- β 2).
- Inkubacja przez 20 minut (TGF- β 2) lub 30 minut (IL-2, TNF- α) bez dostępu do światła.
- Czterokrotne płukanie (IL-2, TNF- α).
- Dodanie 200 μl (IL-2, TNF- α) lub 50 μl (IL-10) roztworu substratu do każdej studzienki.

- Inkubacja przez 30 minut (IL-2, TNF- α) lub 1 godzinę (IL-10) bez dostępu do światła.
- Dodanie do każdej studzienki 50 μ l roztworu wzmacniacza (IL-10)
- Inkubacja przez 30 minut (IL-10).
- Dodanie do każdej studzienki 50 μ l roztworu kwasu siarkowego w celu zatrzymania reakcji barwnej.
- W ciągu 30 minut od zatrzymania reakcji dokonanie odczytu gęstości optycznej za pomocą spektrofotometru (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Inc). Odczytu dokonywano przy długości fali 450 nm (IL-2, TNF- α , TGF- β 2) lub 490 nm (IL-10) z korekcją długości fali ustawioną na 540 nm (IL-2, TNF- α , TGF- β 2) lub 690 nm (IL-10).
- Do wykreślenia krzywej standardowej i odczytania wartości stężeń próbek badanych użyto programu KC Junior-Biokom. Czulość metody dla IL-2 – 0,042 pg/ml, dla TNF- α – 0,022 pg/ml, dla IL-10 – 0,09 pg/ml, dla TGF- β 2 < 7,0 pg/ml.
- W przypadku TGF- β 2 uzyskane wartości zgodnie z zaleceniem producenta pomnożono przez współczynnik rozcieńczenia 7,8.

Indeksy cytokin obliczono wg wzoru:

$$I_c = \frac{\text{stężenie cytokiny w PMR}}{\text{stężenie cytokiny w surowicy}} \times \frac{\text{stężenie albuminy w surowicy}}{\text{stężenie albuminy w PMR}}$$

gdzie I_c – Indeks cytokiny

4.4. Opracowanie statystyczne

Do analizy statystycznej użyto oprogramowania Dell Inc. (2016). Dell Statistica (data analysis software system), wersja 13. Zgodność z rozkładem normalnym sprawdzana była za pomocą testu Shapiro-Wilka. W celu wykonania analiz porównawczych użyto następujących testów: test dokładny Fishera – Freemana – Haltona, analiza wariancji (ANOVA), test Kruskala – Wallisa, test Scheffe, test Dunna, test t-Studenta oraz test U Manna - Whitneya. Obecność korelacji sprawdzono za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona albo współczynnika korelacji

Spearmana (w zależności od zgodności rozkładów z rozkładem normalnym). W pracy przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$.

5. Wyniki

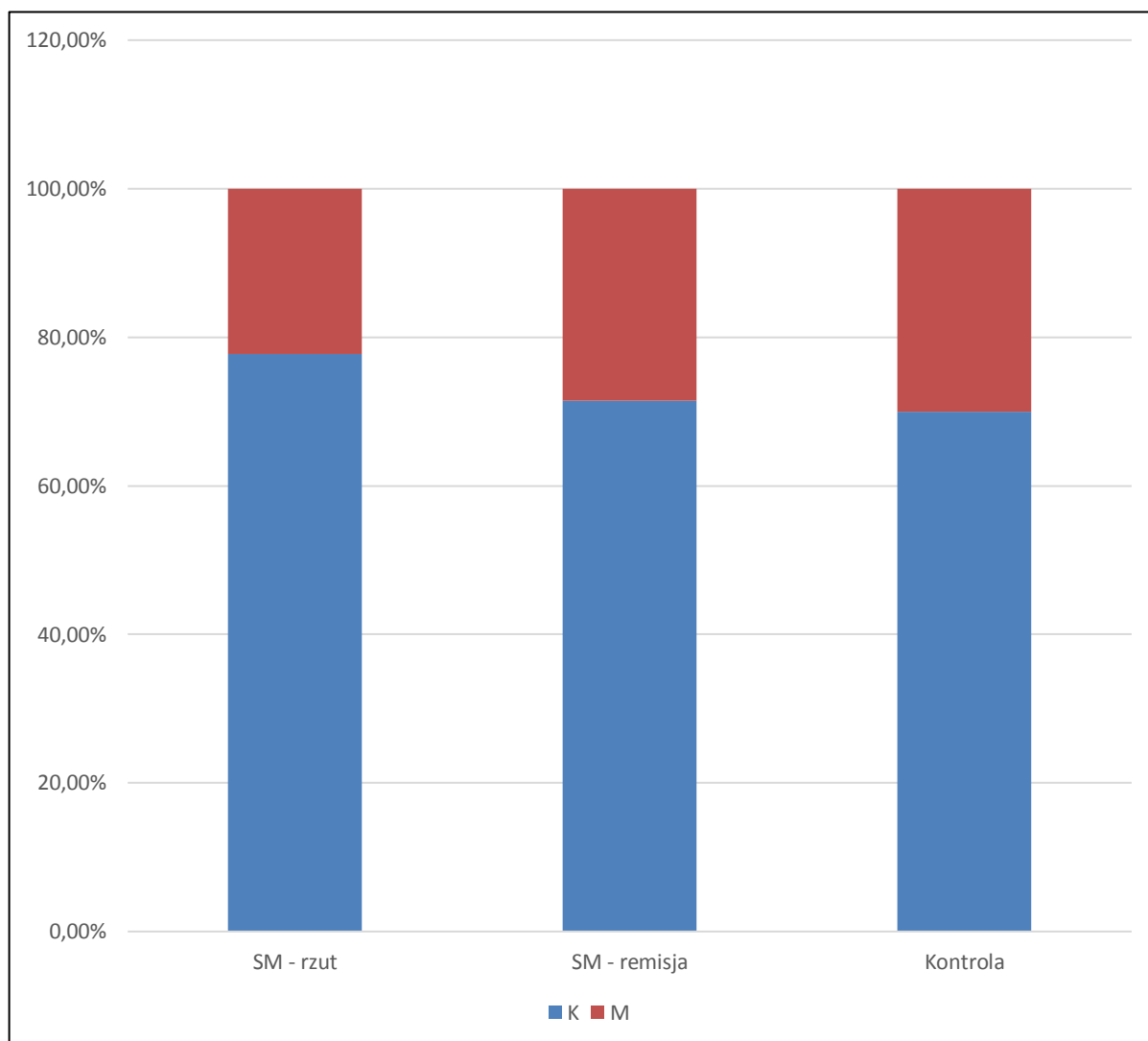
5.1. Charakterystyka badanych grup

Tabela 5. Charakterystyka demograficzna i kliniczna badanych grup

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczebność (% liczebności badanej populacji)	18 (34,6%)	14 (26,9%)	20 (38,5%)
Liczba kobiet (% liczebności danej grupy)	14 (77,8%)	10 (71,4%)	14 (70,0%)
Wiek (średnia $\pm$ odchylenie standardowe [lata])	29,4 $\pm$ 9,3	32,7 $\pm$ 6,6	31,0 $\pm$ 10,5
Czas trwania rzutu (średnia $\pm$ odchylenie standardowe [dni])	7,4 $\pm$ 4,7	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Wartość indeksu IgG (średnia $\pm$ odchylenie standardowe)	0,88 $\pm$ 0,31	0,86 $\pm$ 0,40	0,53 $\pm$ 0,05
Prążki oligoklonalne obecne w PMR (liczba osób i % liczebności danej grupy)	17 (94,4%)	12 (85,7%)	0 (0,0%)
Aktywność w MRI (% liczebności danej grupy)	8 (44,4%)	6 (42,9%)	Nie dotyczy

5.2. Analiza statystyczna struktury płci

Zastosowano test dokładny Fishera – Freemana - Haltona ($p = 0,86$)



K - kobieta, M - mężczyzna

Rycina 10. Struktura płci w badanych grupach

Wniosek: Nie wykazano różnic w zakresie rozkładu płci w badanych grupach.

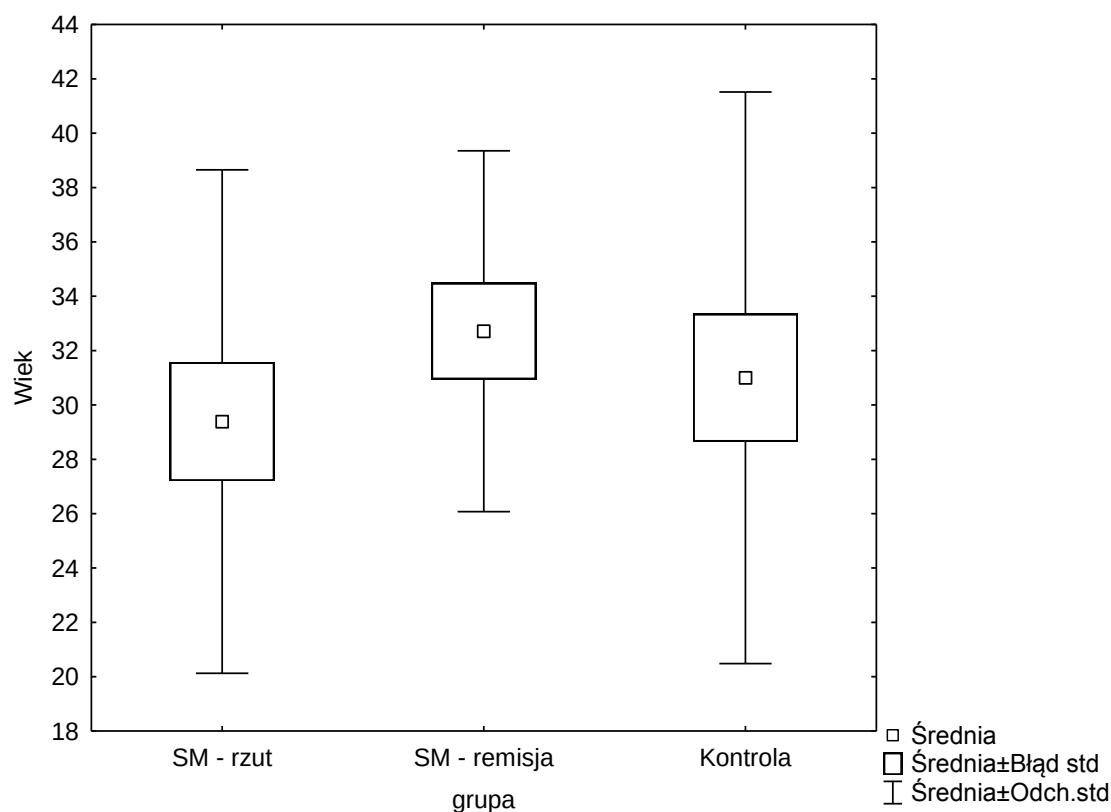
5.3. Analiza statystyczna struktury wieku

Tabela 6. Zestawienie danych dotyczących wieku pacjentów

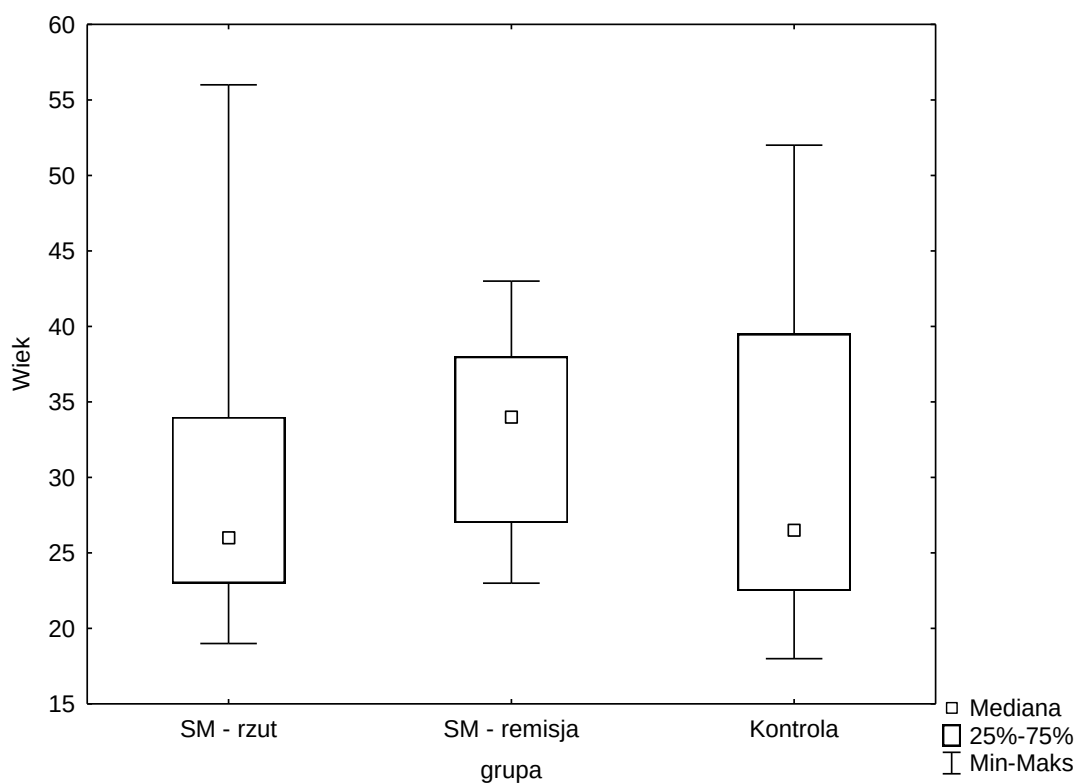
	Grupa RRMS- rzut	Grupa RRMS- remisja	Grupa kontrolna
Średnia ± odchylenie standardowe [lata]	29,4 ± 9,3	32,7 ± 6,6	31,0 ± 10,5
Mediana [lata]	26,0	34,0	26,5
Wartość minimalna [lata]	19,0	23,0	18,0
Wartość maksymalna [lata]	56,0	43,0	52,0
Wartość p (porównanie trzech grup)	0,32*		

* Test Kruskala – Wallisa

Wniosek: Nie wykazano różnic w zakresie rozkładu wieku w badanych grupach.



Rycina 11. Wiek pacjentów w grupach (średnia ± błąd std. ± odch. std.)



Rycina 12. Wiek pacjentów w grupach (mediana $\pm$ 25%-75% $\pm$ min-maks).

5.4. Analiza porównawcza stężeń IL-2

5.4.1. Surowica

Tabela 7. Zestawienie danych dotyczących stężenia IL-2 w surowicy

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczba uzyskanych wyników (% liczebności danej grupy)	3 (16,7)	4 (28,6)	7 (35,0)
Średnia $\pm$ odchylenie standardowe [pg/ml]	0,19 $\pm$ 0,19	0,21 $\pm$ 0,12	0,10 $\pm$ 0,08
Mediana [pg/ml]	0,10	0,20	0,07
Wartość minimalna [pg/ml]	0,07	0,06	0,04
Wartość maksymalna [pg/ml]	0,40	0,36	0,27

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-2 w surowicy było poniżej progu czułości metody ELISA, analiza statystyczna uzyskanych wyników byłaby niemiarodajna.

Charakterystykę pacjentów ze stężeniem IL-2 w surowicy powyżej progu czułości metody ELISA przedstawiono w Załączniku nr 1.

5.4.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy

Stężenie IL-2 w PMR powyżej progu czułości metody ELISA odnotowano u dwóch pacjentów z grupy kontrolnej (10%).

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-2 w PMR było poniżej progu czułości metody ELISA, analiza statystyczna uzyskanych wyników byłaby niemiarodajna.

Charakterystykę pacjentów, u których stężenie IL-2 w PMR było powyżej progu czułości metody ELISA przedstawiono w Załączniku nr 2 – tabela A.

5.5. Analiza porównawcza stężeń TNF- α

5.5.1. Surowica

Tabela 8. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TNF- α w surowicy pomiędzy grupami

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczba uzyskanych wyników (% liczebności danej grupy)	18 (100,0)	14 (100,0)	20 (100,0)
Średnia $\pm$ odchylenie standardowe [pg/ml]	0,69 $\pm$ 0,18	0,70 $\pm$ 0,17	0,80 $\pm$ 0,25
Mediana [pg/ml]	0,66	0,69	0,73
Wartość minimalna [pg/ml]	0,45	0,47	0,41
Wartość maksymalna [pg/ml]	1,15	1,02	1,31
Wartość p (porównanie trzech grup)	0,20*		

* ANOVA

Wniosek: Nie wykazano istotnych różnic w zakresie stężeń TNF- α w surowicy w badanych grupach.

5.5.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy

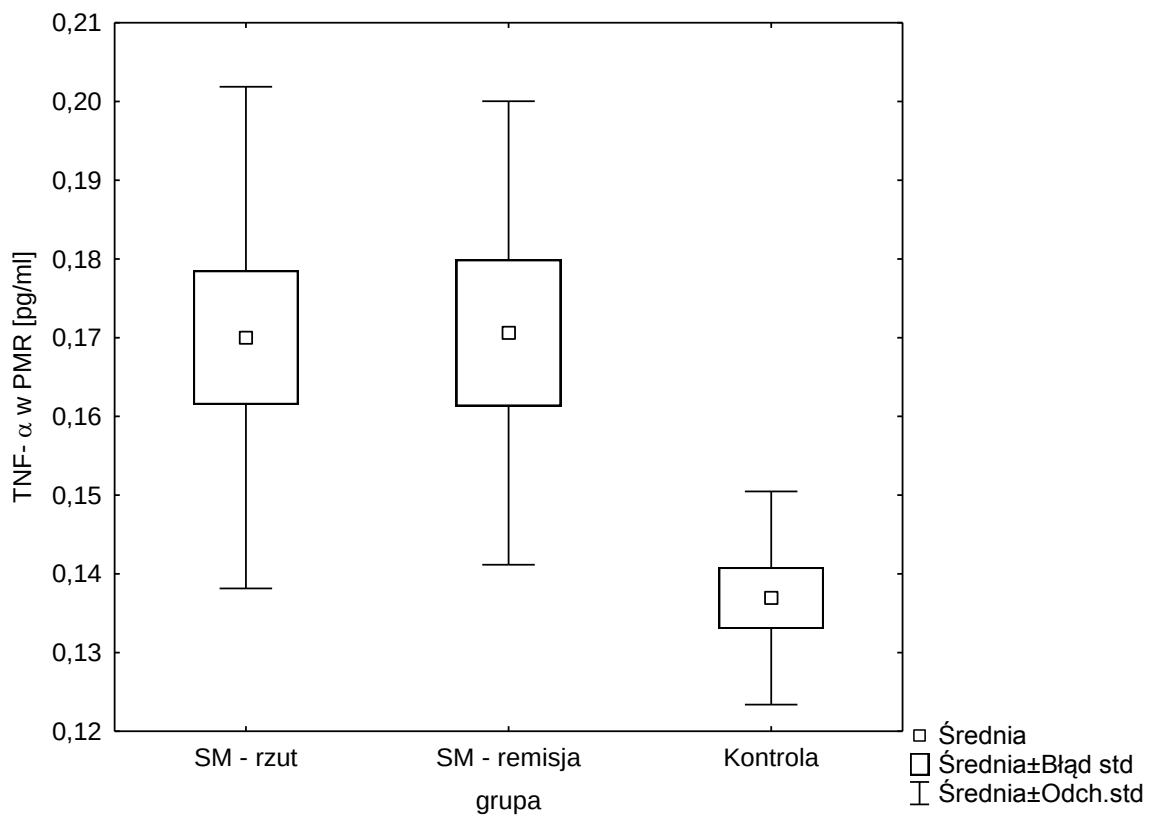
Tabela 9. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TNF- α w PMR pomiędzy grupami

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczba uzyskanych wyników (% liczebności danej grupy)	14 (77,8)	10 (71,4)	12 (60,0)
Średnia $\pm$ odchylenie standardowe [pg/ml]	0,17 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,01
Mediana [pg/ml]	0,16	0,17	0,14
Wartość minimalna [pg/ml]	0,13	0,14	0,12
Wartość maksymalna [pg/ml]	0,23	0,22	0,17
Wartość p (porównanie trzech grup)	<0,01*		
Grupa RRMS-rzut vs.	X	p = 1,0**	p = 0,01**
Grupa RRMS-remisja vs.	p = 1,0**	X	p = 0,02**

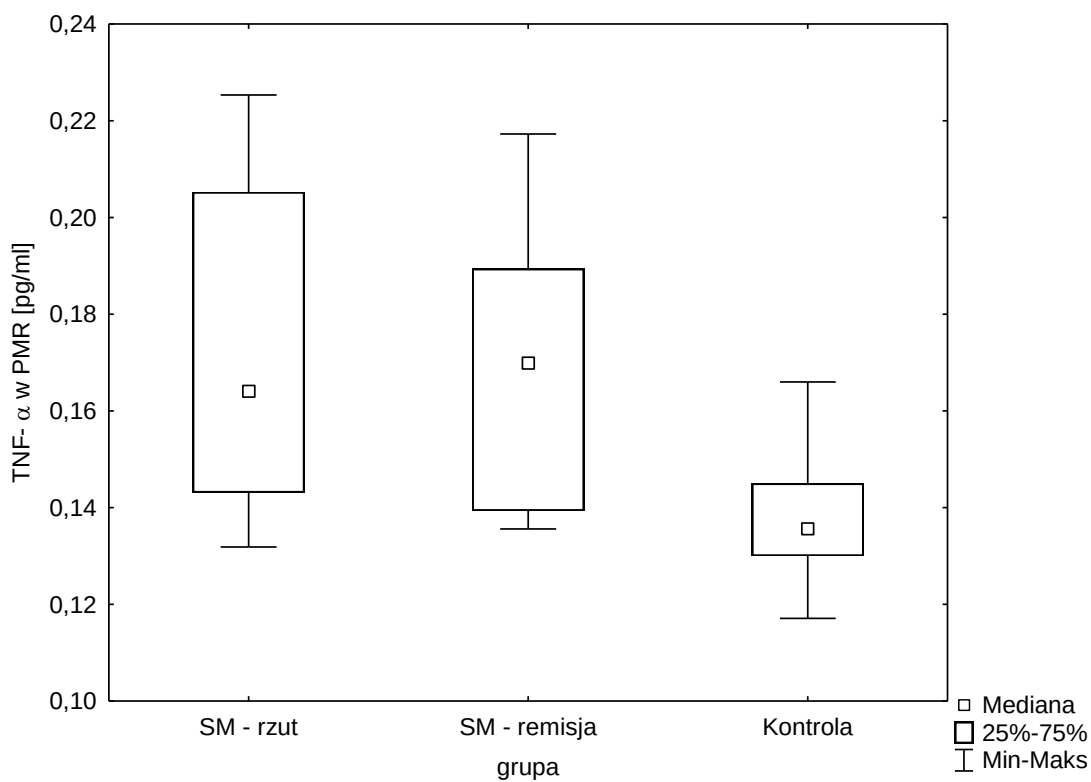
* ANOVA

** Test Scheffe

Wniosek: Wykazano istotnie wyższe stężenia TNF- α w PMR w grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja w porównaniu z grupą kontrolną.



Rycina 13. Stężenie TNF- α w PMR (średnia $\pm$ błąd std. $\pm$ odch. std.)



Rycina 14. Stężenie TNF- α w PMR (mediana $\pm$ 25%-75% $\pm$ min-maks)

5.6. Analiza porównawcza stężeń IL-10

5.6.1. Surowica

Tabela 10. Statystyka opisowa i porównanie stężeń IL-10 w surowicy pomiędzy grupami

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczba uzyskanych wyników (% liczebności danej grupy)	11 (61,1)	8 (57,1)	11 (55,0)
Średnia ± odchylenie standardowe [pg/ml]	0,10 ± 0,06	0,15 ± 0,16	0,22 ± 0,27
Mediana [pg/ml]	0,12	0,11	0,09
Wartość minimalna [pg/ml]	0,001	0,001	0,05
Wartość maksymalna [pg/ml]	0,18	0,53	0,82
Wartość p (porównanie trzech grup)	0,75*		

* Test Kruskala – Wallisa

Wniosek: Nie wykazano istotnych różnic w zakresie stężeń IL-10 w surowicy w badanych grupach.

5.6.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy

Wartość stężenia IL-10 w PMR znajdowała się powyżej progu czułości metody ELISA u trzech pacjentów z grupy RRMS-rzut (16,7%) i jednego pacjenta z grupy RRMS-remisja (7,1%).

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-10 w PMR było poniżej progu czułości metody ELISA, analiza statystyczna uzyskanych wyników byłaby niemiernodajna.

Charakterystykę pacjentów, u których stężenie IL-10 w PMR było powyżej progu czułości metody ELISA przedstawiono w Załączniku nr 2 – tabela B.

5.7. Analiza porównawcza stężeń TGF-β2

5.7.1. Surowica

Tabela 11. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TGF-β2 w surowicy pomiędzy grupami

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczba uzyskanych wyników (% liczebności danej grupy)	14 (77,8)	10 (71,4)	12 (60,0)
Średnia ± odchylenie standardowe [pg/ml]	318,07 ± 91,27	386,65 ± 105,75	374,46 ± 125,95
Mediana [pg/ml]	293,70	375,39	334,20
Wartość minimalna [pg/ml]	222,16	239,43	230,77
Wartość maksymalna [pg/ml]	505,62	579,91	629,08
Wartość p (porównanie trzech grup)	0,17*		

* Test Kruskala – Wallisa

Wniosek: Nie wykazano istotnych różnic w zakresie stężeń TGF-β2 w surowicy w badanych grupach.

5.7.2. Płyn mózgowo-rdzeniowy

Tabela 12. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TGF-β2 w PMR pomiędzy grupami

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczba uzyskanych wyników (% liczebności danej grupy)	14 (77,8)	10 (71,4)	12 (60,0)
Średnia ± odchylenie standardowe [pg/ml]	242,15 ± 119,61	217,00 ± 31,93	310,78 ± 93,33

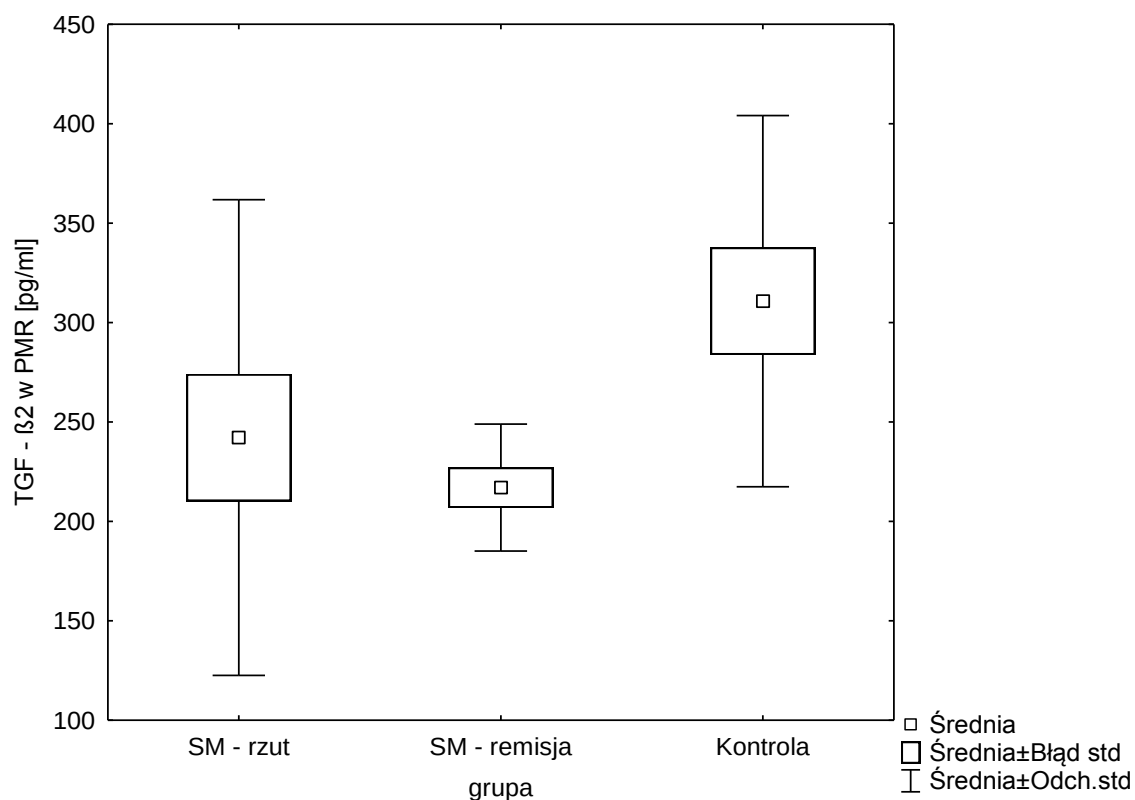
Mediana [pg/ml]	209,33	210,75	274,49
Wartość minimalna [pg/ml]	141,45	177,02	207,91
Wartość maksymalna [pg/ml]	553,92	286,28	467,42
Wartość p (porównanie trzech grup)	0,01*		
Grupa RRMS-rzut vs.	X	p = 1,0**	p = 0,01**
Grupa RRMS-remisja vs.	p = 1,0**	X	p = 0,053** ^a

* Test Kruskala – Wallisa

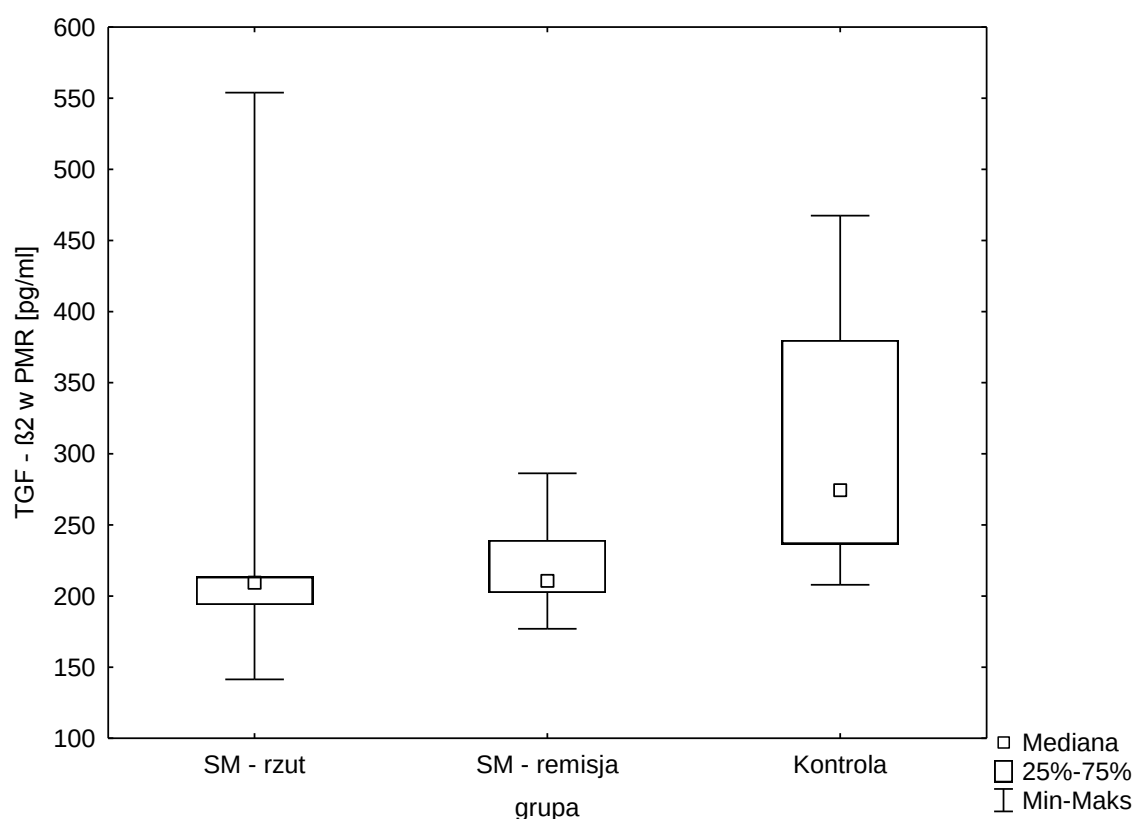
** Test Dunna

^a Wartość p na granicy istotności

Wniosek: Stężenie TGF-β2 w PMR jest istotnie niższe w grupie RRMS-rzut w porównaniu grupą kontrolną.



Rycina 15. Stężenie TGF-β2 w PMR (średnia ± błąd std. ± odch. std.)



Rycina 16. Stężenie TGF-β2 w PMR (mediana ± 25%-75% ± min-maks)

5.8. Analiza porównawcza stężeń IL-2 w zależności od aktywności choroby w MRI

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-2 zarówno w surowicy i w PMR było poniżej progu czułości metody ELISA, analiza statystyczna uzyskanych wyników byłaby niemiarodajna.

Charakterystykę pacjentów, u których stężenie IL-2 w surowicy i PMR było powyżej progu czułości metody ELISA przedstawiono w Załączniku nr 1 i w Załączniku nr 2 – tabela A.

5.9. Analiza porównawcza stężeń TNF- α w zależności od aktywności choroby w MRI

Tabela 13. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TNF- α w zależności od aktywności w MRI

Grupa	Płyn biologiczny	Parametr	Aktywność w MRI - TAK	Aktywność w MRI - NIE	p*
RRMS-rzut	Surowica	Liczba pacjentów	8	10	0,09
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	0,61 $\pm$ 0,10	0,75 $\pm$ 0,21	
		Mediana [pg/ml]	0,62	0,74	
	PMR	Liczba pacjentów	6	8	0,83
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	0,17 $\pm$ 0,03	0,17 $\pm$ 0,03	
		Mediana [pg/ml]	0,62	0,74	
RRMS-remisja	Surowica	Liczba pacjentów	6	6	0,85
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	0,69 $\pm$ 0,11	0,68 $\pm$ 0,20	
		Mediana [pg/ml]	0,71	0,61	
	PMR	Liczba pacjentów	4	4	0,13
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	0,19 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03	
		Mediana [pg/ml]	0,19	0,15	

* Test t-Studenta w modelu zmiennych niezależnych

Wniosek: W grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja nie stwierdzono istotnych różnic stężeń TNF- α w surowicy i PMR w zależności od aktywności choroby w MRI.

5.10. Analiza porównawcza stężeń IL-10 w zależności od aktywności choroby w MRI

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-10 w PMR było poniżej progu czułości metody ELISA, przeprowadzono analizę statystyczną jedynie w zakresie stężeń w surowicy.

Charakterystykę pacjentów, u których stężenie IL-10 w PMR było powyżej progu czułości metody ELISA przedstawiono w Załączniku nr 2 – tabela B.

Tabela 14. Statystyka opisowa i porównanie stężeń IL-10 w zależności od aktywności w MRI

Grupa	Płyn biologiczny	Parametr	Aktywność w MRI - TAK	Aktywność w MRI - NIE	Wartość p*
RRMS-rzut	Surowica	Liczba pacjentów	4	7	0,25
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	0,07 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,06	
		Mediana [pg/ml]	0,08	0,12	
RRMS-remisja	Surowica	Liczba pacjentów	3	3	0,54
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	0,24 $\pm$ 0,25	0,13 $\pm$ 0,05	
		Mediana [pg/ml]	0,14	0,12	

* Test t-Studenta w modelu zmiennych niezależnych

Wniosek: W grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja nie stwierdzono istotnych różnic stężeń IL-10 w surowicy w zależności od aktywności choroby w MRI.

5.11. Analiza porównawcza stężeń TGF- β 2 w zależności od aktywności choroby w MRI

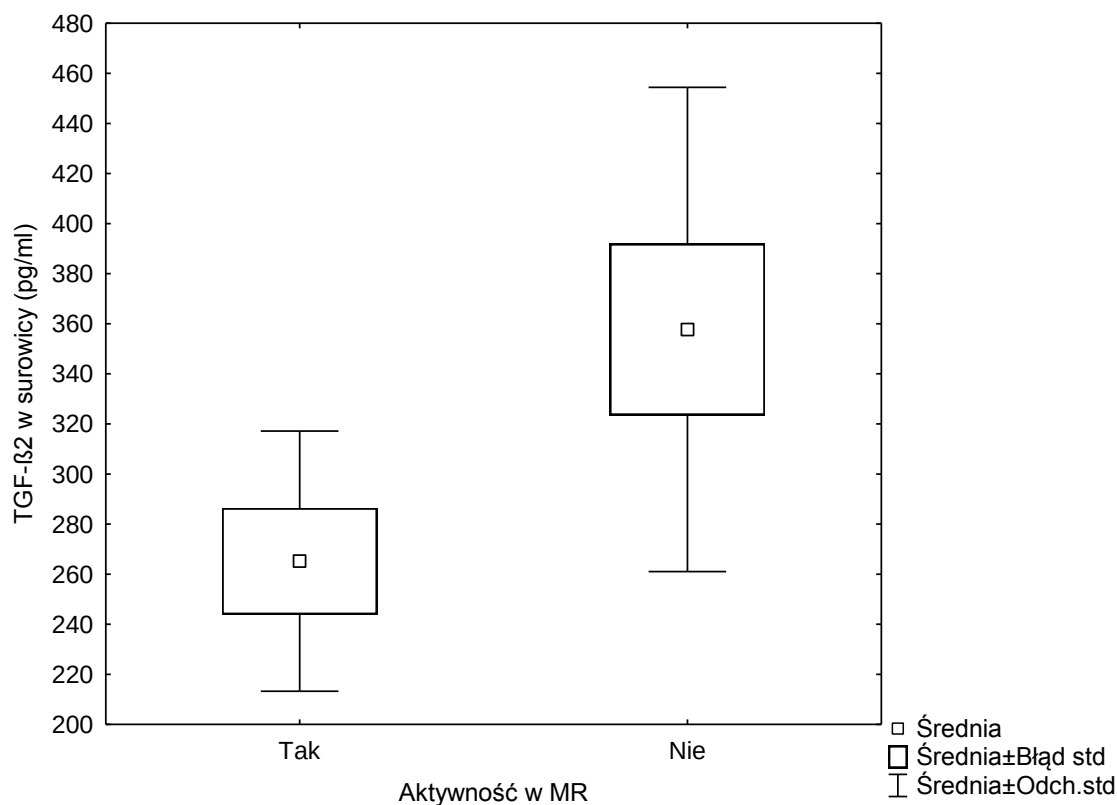
Tabela 15. Statystyka opisowa i porównanie stężeń TGF- β 2 w zależności od aktywności w MRI

Grupa	Płyn biologiczny	Parametr	Aktywność w MRI - TAK	Aktywność w MRI - NIE	Wartość p*
RRMS-rzut	Surowica	Liczba pacjentów	6	8	0,04*
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	265,19 $\pm$ 51,96	357,72 $\pm$ 96,69	
		Mediana [pg/ml]	252,49	328,15	
	PMR	Liczba pacjentów	6	8	0,56**
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	249,63 $\pm$ 114,91	236,55 $\pm$ 130,59	
		Mediana [pg/ml]	210,75	205,08	
RRMS-remisja	Surowica	Liczba pacjentów	4	4	0,75*
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	423,18 $\pm$ 131,33	396,00 $\pm$ 81,30	
		Mediana [pg/ml]	423,58	380,03	
	PMR	Liczba pacjentów	4	4	0,23*
		Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	235,38 $\pm$ 37,33	203,17 $\pm$ 29,99	
		Mediana [pg/ml]	226,51	196,67	

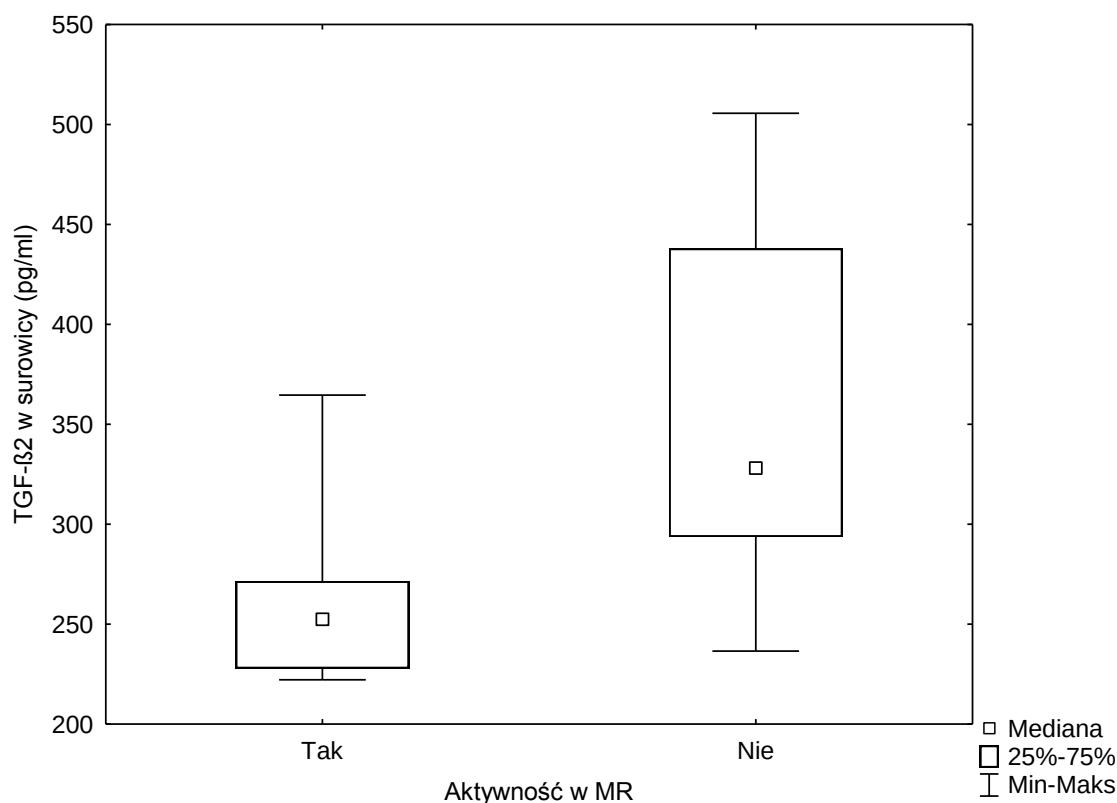
* Test t-Studenta w modelu zmiennych niezależnych

** Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)

Wniosek: W grupie RRMS-rzut stężenia TGF- β 2 w surowicy są istotnie niższe u pacjentów z cechami aktywności choroby w MRI w porównaniu z pozostałymi. Różnicy takiej nie zaobserwowano w PMR oraz w grupie RRMS-remisja.



Rycina 17. Stężenia TGF-β2 w surowicy w grupie RRMS-rzut w zależności od aktywności choroby w MRI (średnia ± błąd std. ± odch. std.)



Rycina 18. Stężenia TGF-β2 w surowicy w grupie RRMS-rzut w zależności od aktywności choroby w MRI (mediana ± 25%-75% ± min-maks)

5.12. Analiza porównawcza wartości indeksu IL-2

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-2 w surowicy i PMR było poniżej progu czułości metody ELISA, analiza statystyczna wartości indeksów IL-2 nie byłaby miarodajna.

Charakterystykę pacjentów, u których stężenie IL-2 w surowicy i PMR było powyżej progu czułości metody ELISA przedstawiono w Załączniku nr 1 i w Załączniku nr 2 – tabela A.

5.13. Analiza porównawcza wartości indeksu TNF- α

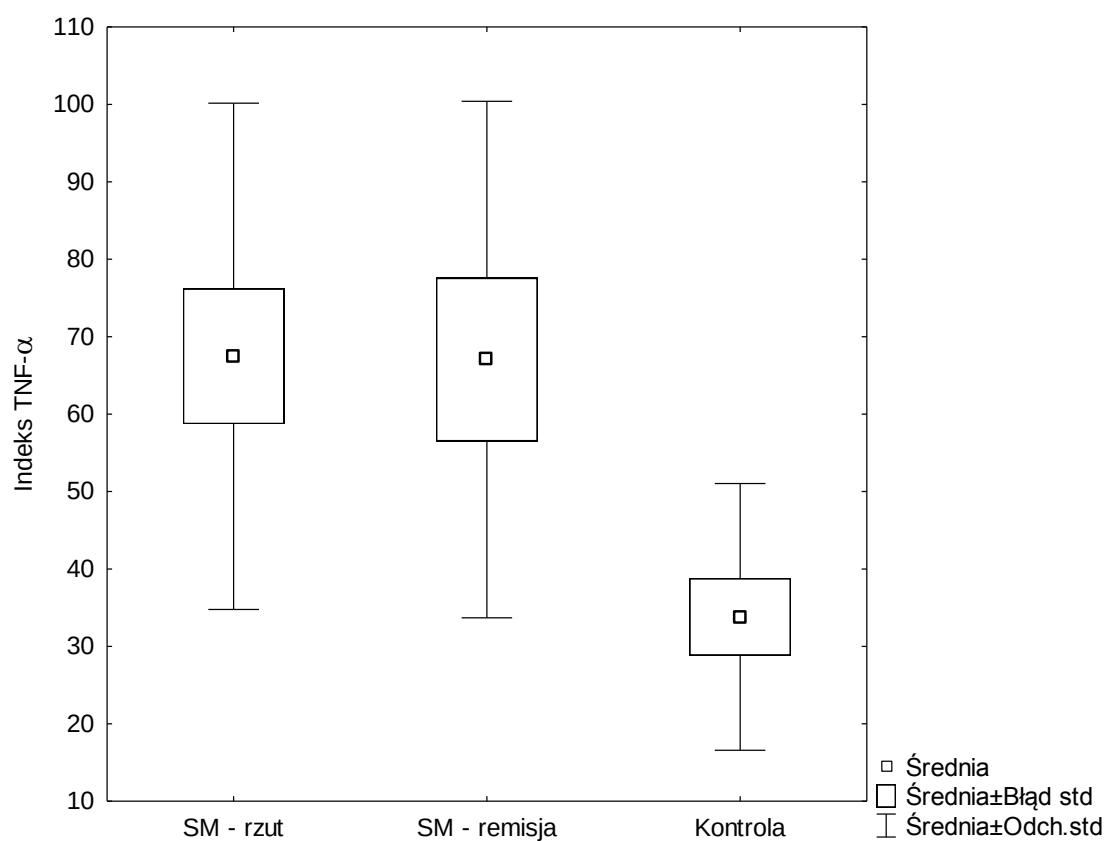
Tabela 16. Statystyka opisowa i porównanie wartości indeksu TNF- α w badanych grupach

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczba uzyskanych wyników (% liczebności danej grupy)	14 (77,8)	10 (71,4)	12 (60,0)
Średnia $\pm$ odchylenie standardowe [pg/ml]	67,46 $\pm$ 32,69	67,04 $\pm$ 33,36	33,81 $\pm$ 17,23
Mediana [pg/ml]	59,12	64,48	31,22
Wartość minimalna [pg/ml]	33,85	24,58	17,31
Wartość maksymalna [pg/ml]	144,06	121,29	80,12
Wartość p (porównanie trzech grup)	< 0,01*		
Grupa RRMS-rzut vs.	X	1,0**	<0,01**
Grupa RRMS-remisja vs.	1,0**	X	0,02**

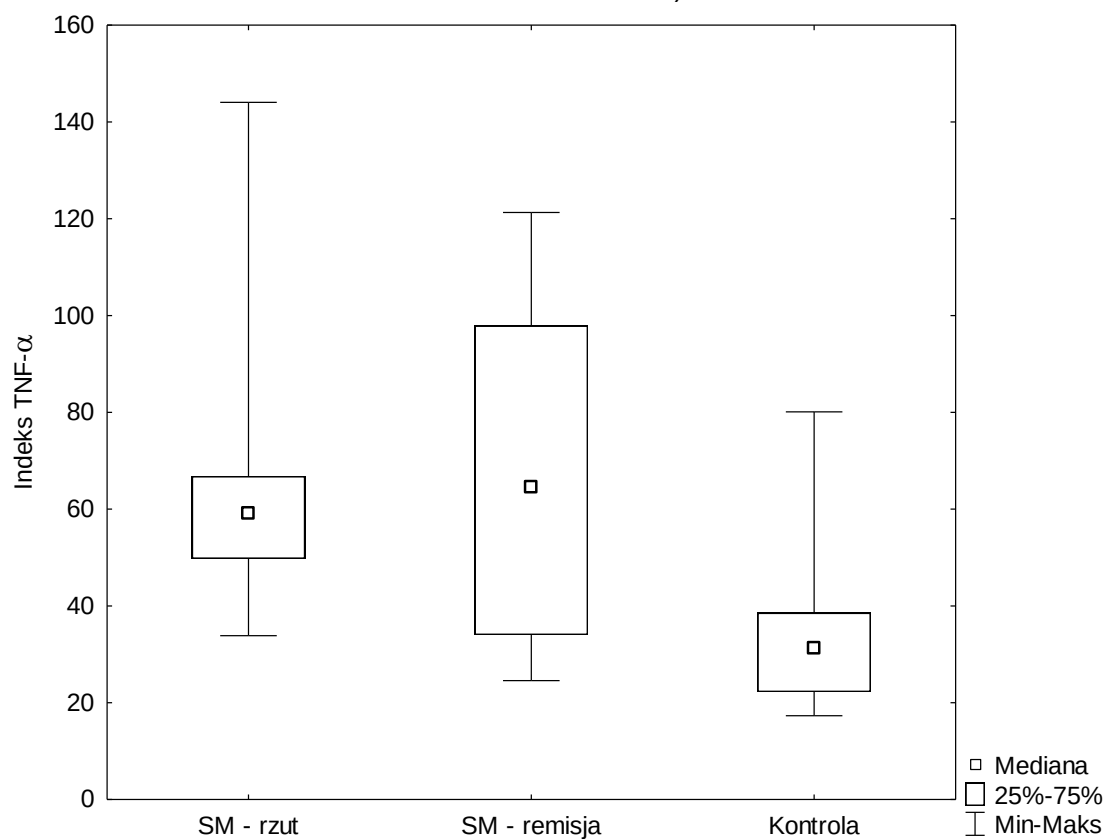
* Test Kruskala – Wallisa

** Test Dunna

Wniosek: Wykazano istotnie wyższe wartości indeksu TNF- α w grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja w porównaniu z grupą kontrolną.



Rycina 19. Wartości indeksów TNF-α w badanych grupach (średnia ± błąd std. ± odch. std.)



Rycina 20. Wartości indeksów TNF-α w badanych grupach (mediana ± 25%-75% ± min-maks)

5.14. Analiza porównawcza wartości indeksu IL-10

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-10 w PMR było poniżej progu czułości metody ELISA, analiza statystyczna wartości indeksów IL-10 nie była możliwa.

Charakterystykę pacjentów, u których stężenie IL-10 w PMR było powyżej progu czułości metody ELISA (co było konieczne do obliczenia indeksu IL-10) przedstawiono w Załączniku nr 2 – tabela B.

5.15. Analiza porównawcza wartości indeksu TGF- β 2

Tabela 17. Statystyka opisowa i porównanie wartości indeksu TGF- β 2 w badanych grupach

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Liczba uzyskanych wyników (% liczebności danej grupy)	14 (77,8)	10 (71,4)	12 (60,0)
Średnia $\pm$ odchylenie standardowe [pg/ml]	248,00 $\pm$ 257,60	185,74 $\pm$ 122,60	182,05 $\pm$ 84,66
Mediana [pg/ml]	169,34	138,83	176,84
Wartość minimalna [pg/ml]	87,13	61,50	81,96
Wartość maksymalna [pg/ml]	1069,53	417,21	365,99
Wartość p (porównanie trzech grup)	0,85*		

* Test Kruskala - Wallisa

Wniosek: Nie stwierdzono istotnych różnic wartości indeksu TGF- β 2 pomiędzy badanymi grupami.

5.16. Analiza porównawcza wartości indeksu IL-2 w zależności od aktywności choroby w MRI

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-2 w surowicy i PMR było poniżej progu czułości metody ELISA, analiza statystyczna wartości indeksów IL-2 nie była możliwa.

Charakterystykę pacjentów, u których stężenie IL-2 w surowicy i PMR było powyżej progu czułości metody ELISA przedstawiono w Załączniku nr 1 i Załączniku nr 2 – tabela A.

5.17. Analiza porównawcza wartości indeksu TNF- α w zależności od aktywności choroby w MRI

Tabela 18. Statystyka opisowa i porównanie wartości indeksu TNF- α w zależności od aktywności w MRI

Grupa	Parametr	Aktywność w MRI - TAK	Aktywność w MRI - NIE	Wartość p
RRMS-rzut	Liczba pacjentów	6	8	0,65*
	Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	74,24 $\pm$ 36,11	62,38 $\pm$ 31,37	
	Mediana [pg/ml]	59,12	56,82	
RRMS-remisja	Liczba pacjentów	4	4	0,74**
	Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	55,02 $\pm$ 33,97	62,86 $\pm$ 30,81	
	Mediana [pg/ml]	42,24	64,48	

* Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)

** Test t-Studenta w modelu zmiennych niezależnych

Wniosek: W grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja nie stwierdzono istotnych różnic wartości indeksu TNF- α w zależności od aktywności choroby w MRI.

5.18. Analiza porównawcza wartości indeksu IL-10 w zależności od aktywności choroby w MRI

Z uwagi, iż w większości przypadków stężenie IL-10 w PMR było poniżej progu czułości metody ELISA, analiza statystyczna wartości indeksów IL-10 nie była możliwa.

Charakterystykę pacjentów, u których stężenie IL-10 w PMR było powyżej progu czułości metody ELISA przedstawiono w Załączniku nr 2 – tabela B.

5.19. Analiza porównawcza wartości indeksu TGF- β 2 w zależności od aktywności choroby w MRI

Tabela 19. Statystyka opisowa i porównanie wartości indeksu TGF- β 2 w zależności od aktywności w MRI

Grupa	Parametr	Aktywność w MRI - TAK	Aktywność w MRI - NIE	Wartość p
RRMS-rzut	Liczba pacjentów	6	8	0,27*
	Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	324,38 $\pm$ 365,91	190,72 $\pm$ 137,30	
	Mediana [pg/ml]	193,47	160,48	
RRMS-remisja	Liczba pacjentów	4	4	0,80**
	Średnia $\pm$ odch. std. [pg/ml]	135,58 $\pm$ 111,90	153,57 $\pm$ 82,41	
	Mediana [pg/ml]	91,14	138,83	

* Test U Manna-Whitneya (z poprawką na ciągłość)

** Test t-Studenta w modelu zmiennych niezależnych

Wniosek: W grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja nie stwierdzono istotnych różnic wartości indeksu TGF- β 2 w zależności od aktywności choroby w MRI.

5.20. Analiza zależności wartości indeksu IgG od stężeń cytokin

Tabela 20. Zestawienie danych dotyczących wartości indeksu IgG w badanych grupach

	Grupa RRMS-rzut	Grupa RRMS-remisja	Grupa kontrolna
Średnia $\pm$ odchylenie standardowe [pg/ml]	0,88 $\pm$ 0,31	0,86 $\pm$ 0,40	0,53 $\pm$ 0,05
Mediana [pg/ml]	0,85	0,74	0,53
Wartość minimalna [pg/ml]	0,50	0,50	0,44
Wartość maksymalna [pg/ml]	1,52	1,99	0,68

Tabela 21. Zależność wartości indeksu IgG od stężeń cytokin w surowicy i PMR w badanych grupach

	RRMS-rzut	RRMS-remisja	Grupa kontrolna
IL-2 w surowicy	X	X	p = 0,74**
IL-2 w PMR	X	X	X
TNF- α w surowicy	p = 0,41*	p = 0,56**	p = 0,70*
TNF- α w PMR	p = 0,97*	p = 0,37**	p = 0,97*
IL-10 w surowicy	p = 0,10*	p = 0,24**	p = 0,42**
IL-10 w PMR	X	X	X
TGF- β w surowicy	p = 0,45**	p = 0,66**	p = 0,10**
TGF- β w PMR	p = 0,58**	p = 0,57**	p = 0,97*

* Analiza za pomocą współczynnika korelacji liniowej Pearsona

** Analiza za pomocą współczynnika korelacji Spearmana

X Niewielka liczba danych

Wniosek: W badanych grupach nie stwierdzono korelacji pomiędzy wartościami indeksu IgG i stężeniami cytokin w surowicy i PMR.

5.21. Analiza korelacji między stężeniami cytokin a czasem trwania rzutu.

Tabela 22. Zestawienie danych dotyczących czasu trwania rzutu SM u badanych pacjentów

Parametr	Wartość [dni]
Średnia ± odchylenie standardowe	7,4 ± 4,7
Mediana	7,0
Wartość minimalna	2,0
Wartość maksymalna	21,0
Błąd standardowy	1,1

Tabela 23. Zależność pomiędzy stężeniami cytokin w surowicy i PMR, a czasem trwania rzutu

	Wartość p*
IL-2 w surowicy	X
IL-2 w PMR	X
TNF-α w surowicy	0,87
TNF-α w PMR	0,74
IL-10 w surowicy	0,76

IL-10 w PMR	X
TGF- β w surowicy	0,96
TGF- β w PMR	0,72

* Analiza za pomocą współczynnika korelacji Spearmana
X Niewielka liczba danych

Wniosek: Nie stwierdza się korelacji pomiędzy stężeniami cytokin w surowicy i PMR w badanych grupach, a czasem trwania rzutu.

5.22. Analiza korelacji pomiędzy wartościami indeksów cytokin a czasem trwania rzutu

Dane dotyczące czasu trwania rzutu zostały zestawione w Tabeli 22.

Tabela 24. Zależność pomiędzy wartościami indeksów cytokin, a czasem trwania rzutu

	Wartość p*
Indeks IL-2	X
Indeks TNF- α	0,29
Indeks IL-10	X
Indeks TGF- β 2	0,29

* Analiza za pomocą współczynnika korelacji Spearmana
X Niewielka liczba danych

Wniosek: Nie stwierdza się korelacji pomiędzy wartościami indeksów cytokin, a czasem trwania rzutu.

5.23. Podsumowanie wyników

- Stężenia TNF- α w PMR w grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja są istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej.
- Stężenia TGF- β 2 w PMR w grupie RRMS-rzut są istotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną.
- Nie wykazano istotnych różnic w zakresie stężeń cytokin w surowicy pomiędzy badanymi grupami
- W grupie RRMS-rzut stężenia TGF- β 2 w surowicy są istotnie niższe u pacjentów z cechami aktywności choroby w MRI w porównaniu z pozostałymi.
- Wykazano istotnie wyższe wartości indeksu TNF- α w grupach RRMS-rzut i RRMS-remisja w porównaniu z grupą kontrolną
- Obecność cech aktywności choroby w MRI nie wpływa na wartości indeksów cytokin
- Nie stwierdzono korelacji między stężeniami cytokin a wartościami indeksu IgG
- Nie stwierdzono korelacji między stężeniami/indeksami cytokin a czasem trwania rzutu

6. Dyskusja

6.1. Znaczenie biomedyczne

Stwardnienie rozsiane jest chorobą o niewątpliwie dużym znaczeniu społecznym, ponieważ stanowi istotną, nieurazową przyczynę niesprawności osób młodych. Niestety patogeneza schorzenia w dalszym ciągu nie jest do końca poznana, a obecna wiedza na jej temat często ma postać jedynie teorii naukowych, które mogą zostać potwierdzone, jak też obalone. Chociaż SM jest w obecnych czasach chorobą nieuleczalną, aktualnie stosowane DMDs wykazują pewną skuteczność kliniczno-radiologiczną, przez co do pewnego stopnia umożliwiają jej kontrolę i stwarzają nadzieję na opracowanie w przyszłości bardziej skutecznego leczenia, a nawet na wyleczenie tego schorzenia. Powyższe fakty uzasadniają dalsze kosztowne badania nad poznaniem patogenezы choroby i co z tym bezpośrednio związane, opracowaniem

skutecznego leczenia przyczynowego. Warto podkreślić, że na szczególną uwagę zasługuje patogeneza wczesnego okresu SM. Dotychczas została ona poznana jedynie w niewielkim stopniu. Gdyby możliwe stało się zatrzymanie postępu choroby w jej wczesnym okresie, skala jej dotkliwych następstw i uszkodzenia OUN z pewnością byłaby mniejsza. Zwłaszcza wgląd w immunopatogenezę wczesnego okresu choroby daje możliwość opracowania leków, których punkt uchwytu będzie dotyczył właśnie tego okresu schorzenia i będą one w nim szczególnie skuteczne. Co więcej, stwarza to szansę odkrycia markerów wczesnego RRMS.

Niniejsza rozprawa koncentruje się na próbie lepszego poznania immunopatogenezy wczesnego okresu najczęstszej (rzutowo-remisyjnej) postaci SM. Z uwagi na fakt, że jest to schorzenie, w którego rozwoju znaczną rolę odgrywa nieprawidłowa odpowiedź układu immunologicznego i liczne cytokiny, w pracy tej starano się poznać działanie i rolę określonych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych we wczesnym okresie wspomnianej postaci SM, poprzez analizę ich stężeń w płynach ustrojowych osób cierpiących na to schorzenie. Z uwagi na podkreślaną ostatnio ważną rolę limfocytów Treg w wielu prawidłowych i patologicznych reakcjach układu immunologicznego (także w przebiegu SM) [160 - 171], spośród cytokin przeciwzapalnych, wybrano te, które są przez te komórki wytwarzane i bezpośrednio związane z ich funkcją. Dzięki temu wyniki tej dysertacji zapewniają pośredni wgląd w rolę limfocytów Treg we wczesnym okresie RRMS. Jej zasadnicza wartość polega jednak na ocenie wybranych cytokin i limfocytów Treg jako potencjalnych punktów uchwytu DMDs we wczesnym okresie choroby, jak również markerów tego okresu schorzenia.

Przedstawione cytokiny należą do najważniejszych i najczęściej badanych substancji regulujących procesy zapalne zachodzące w przebiegu SM oraz innych chorób autoimmunologicznych. Co więcej, związane są one ściśle z funkcją limfocytów Treg, co rzuca również pośrednie światło na funkcję i biologię tych komórek.

6.2. Przegląd dotychczasowych badań

Nie jest zaskoczeniem, że w literaturze można znaleźć liczne publikacje dotyczące pomiaru stężeń cytokin w surowicy i / lub PMR pacjentów z SM. Celem wszystkich tego typu prac jest lepsze poznanie immunopatogenezy SM.

W 1989 r. przeprowadzono badanie, w którym autorzy podjęli próbę oznaczenia stężeń m.in. IL-2 w surowicy i PMR pacjentów podzielonych na 3 grupy: chorujących na SM, zakażonych wirusem HIV-1 oraz osób zdrowych. W liczącej 50 osób grupie rozpoznano SM na podstawie kryteriów Posera [250]. Nie określono jednak, ile wynosił średni czas od postawienia diagnozy. Pacjenci nie byli leczeni immunosupresyjnie w ciągu co najmniej 6 miesięcy przed włączeniem do badania. U 36 chorych rozpoznano RRMS w czasie rzutu, natomiast u pozostałych 14 pacjentów stwierdzono postać przewlekłą postępującą z wykładnikami aktywności choroby w postaci narastającej niesprawności. Pozostałe grupy liczyły po 30 osób. W surowicy wykazano istotnie wyższe stężenie IL-2, jednak w PMR było ono powyżej progu czułości metody ELISA zaledwie u 11 (22,2%) pacjentów z SM [251].

W japońskim badaniu z 1992 r. autorzy podjęli próbę oznaczenia stężeń interleukiny 2 w surowicy i PMR pacjentów z RRMS [252]. Grupa pacjentów z SM liczyła 20 osób. U niektórych SM zostało rozpoznane kilka lat wcześniej, tak więc w grupie badanej znajdowali się zarówno pacjenci we wczesnym okresie choroby, jak również w bardziej zaawansowanych. Wśród pacjentów włączonych do projektu znajdowały się osoby zarówno w czasie rzutu jak i remisji. W surowicy wykazano wyższe stężenie IL-2 u pacjentów z SM w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast nie stwierdzono istotnych różnic w jej stężeniach u pacjentów w czasie rzutu w porównaniu z osobami w czasie remisji. Z kolei w PMR stwierdzono najwyższe stężenie IL-2 u pacjentów z SM w czasie rzutu, a najniższe u pacjentów z grupy kontrolnej. Naturalnie cytowane badanie różni się od niniejszej rozprawy w zakresie kryteriów rozpoznania SM.

Ott i wsp. badali w 1993 stężenie IL-2 w surowicy i PMR u 31 pacjentów z SM rozpoznanych na podstawie kryteriów Posera [250]. Wśród nich znajdowało się 26 osób z RRMS i 5 z postacią postępującą choroby [253]. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe. Żaden z pacjentów nie był leczony DMDs. Średni czas trwania SM włączonych do badania osób wynosił 3,8 lat. Pacjenci z RRMS znajdowali się w czasie rzutu. Średni czas trwania rzutu wynosił 30 dni. Nie znaleziono istotnych różnic w zakresie osoczowych stężeń IL-2 pomiędzy grupą RRMS a grupą kontrolną. Jedną z potencjalnych przyczyn tego zjawiska jest wg autorów zbyt długi średni czas rzutu przyjęty w badaniu (30 dni), który może odzwierciedlać okres zarówno rzutu jak i następującej po nim remisji. Stężenia tej cytokiny w PMR były poniżej progu czułości metody ELISA. Wyniki badania skłoniły autorów do wniosku, że pomiar stężenia IL-2

w surowicy nie jest przydatny w ocenie aktywności choroby u pacjentów z RRMS. Co ciekawe, znaleziono pozytywny związek pomiędzy stężeniem IL-2 w surowicy oraz czasem trwania rzutu.

Trzy lata później badano stężenia IL-10, TNF- α i TGF- β 2 w surowicy pacjentów z SM [254]. Chorobę rozpoznawano na podstawie kryteriów McDonalda i Halliday'a z 1977 r. [255]. Grupa pacjentów chorujących na SM liczyła łącznie 41 osób. Była ona niejednorodna, gdyż obejmowała zarówno pacjentów z RRMS w czasie rzutu (12 osób), RRMS w czasie remisji (11 osób), SPMS (15 osób) i PPMS (3 osoby). Średni czas trwania choroby wynosił 9,2 lat. Pacjenci nie byli leczeni DMDs. Stwierdzono, że stężenie IL-10 w surowicy maleje u pacjentów z SM w porównaniu do grupy kontrolnej, szczególnie w postaciach postępujących. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w stężeniach tej cytokiny pomiędzy poszczególnymi grupami SM. Próba oznaczenia w surowicy stężeń dwóch pozostałych cytokin nie powiodła się.

Z kolei w badaniu z 1997 r. badano osoczowe stężenia m.in. IL-2 i TNF- α u 40 pacjentów chorujących na RRMS i 20 osób zdrowych [256]. Nie znaleziono istotnych różnic w zakresie stężeń IL-2 pomiędzy badanymi grupami, natomiast stężenie TNF- α było istotnie wyższe w czasie rzutu choroby.

W tym samym roku podjęto próbę pomiaru stężeń TNF- α w PMR pacjentów z SM [257]. Stwardnienie rozsiane rozpoznawano na podstawie kryteriów Posera [250]. Grupa chorych liczyła 70 osób i zawierała także osoby chorujące na postaci postępujące SM. Średni czas trwania choroby wynosił 4 lata. U włączonych pacjentów nie stosowano terapii immunosupresyjnej przez co najmniej 3 miesiące przed pobraniem PMR. Grupa pacjentów, w której oznaczano stężenie TNF- α zawierała 17 pacjentów z RRMS (11 w czasie rzutu, 6 w czasie remisji). Stężenie TNF- α było powyżej progu czułości metody ELISA u 60% pacjentów z aktywnym SM, 29% osób z grupy kontrolnej, natomiast próba ta nie powiodła się u żadnego pacjenta z SM nieaktywnym. Nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy średnim stężeniem tej cytokiny w PMR pacjentów z SM i z grupy kontrolnej.

Równie ciekawych danych dostarczyło badanie z 1998 r [258]. Autorzy badali stężenie TGF- β 1 w surowicy pacjentów chorujących na RRMS (55 pacjentów) oraz SPMS (15 pacjentów). Choroba rozpoznawana była na podstawie kryteriów Posera [250]. Włączeni do grupy RRMS pacjenci chorowali już kilka lat. Stwierdzono wzrost stężenia badanej cytokiny w surowicy w obu grupach pacjentów z SM, zwłaszcza

u pacjentów w czasie rzutu choroby. Autorzy nie sprawdzili jednak takiej zależności w przypadku PMR.

Także w 1998 r. przeprowadzono inne ciekawe badanie, w którym oceniano stężenia m.in. TNF- α , IL-10 i TGF- β w surowicy i PMR u 29 pacjentów chorujących na RRMS [259]. Określono którzy z nich byli w czasie rzutu, a którzy w czasie remisji. Stwardnienie rozsiane rozpoznawano stosując kryteria Poser'a [250]. Średni czas trwania choroby wynosił 4,9 lat. W grupie kontrolnej stężenia TNF- α i IL-10 w PMR były poniżej progu czułości metody ELISA. Stwierdzono wyższe stężenia IL-10 w PMR pacjentów w czasie remisji, podczas gdy stężenie TNF- α zwiększone było w PMR u osób w czasie rzutu. Ponadto, stwierdzono wyższe stężenie TGF- β w PMR pacjentów w czasie rzutu w porównaniu z osobami z pozostałych dwóch grup. Zależności takich nie obserwowano w surowicy w przypadku każdej z ww. cytokin. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem cytokin w PMR a czasem trwania choroby, stopniem niesprawności, stężeniem IgG, indeksem IgG i liczbą komórek w PMR.

Z pewnością ciekawych wyników dostarczyło badanie opublikowane w 2002 r. w „Cytokine”, w którym autorzy podjęli próbę pomiaru stężeń m.in. TNF- α w surowicy i PMR pacjentów chorujących na SM oraz w grupie osób, które nie chorowały na schorzenia zapalne OUN [260]. Liczebność badanych grup była zbliżona do tej w niniejszej pracy. Włączeni do badania pacjenci z SM prezentowali postać rzutowo-remisyjną choroby. Żaden z nich nie był leczony DMDs. Nie określono jednak jak długo chorowali. Stężenie TNF- α w surowicy znajdowało się powyżej progu czułości metody ELISA zaledwie u 20% pacjentów. W PMR próba ta zakończyła się niepowodzeniem we wszystkich przypadkach. Istotnymi różnicami w porównaniu z niniejszą pracą jest niedoprecyzowanie czy pacjenci znajdowali się w czasie rzutu czy remisji, oraz wg których kryteriów rozpoznawano SM. Z uwagi na rok opublikowania tego badania wiadomo jednak, że kryteria te były odmienne niż w badaniu będącym przedmiotem niniejszej dysertacji.

Frisullo i wsp. przeprowadzili w 2008 r. ciekawe badanie, w którym badali stężenie m.in. IL-10 w surowicy pacjentów z CIS (15 osób), RRMS (21 osób), SPMS (19 osób) i w grupie kontrolnej osób zdrowych (20 osób) [261]. Stwardnienie rozsiane rozpoznawane było na podstawie kryteriów McDonalda z 2005 r [262]. Pacjenci z grupy CIS i RRMS nie byli leczeni DMDs ani steroidami. Średni czas trwania objawów u pacjentów z CIS wynosił 15,55 miesiąca, u pacjentów z RRMS 45,71 miesiąca i 187,71 miesiąca u osób z SPMS. Stwierdzono, że stężenie IL-10 jest

wyższe u pacjentów z CIS i RRMS w porównaniu z osobami chorującymi na SPMS i grupą kontrolną. Co ciekawe, pacjenci z RRMS w czasie rzutu wykazywali wyższe stężenie tej cytokiny w surowicy niż pacjenci w czasie remisji.

W 2014 r. Uysal i wsp. przeprowadzili badanie, w którym badali stężenie TNF- α w surowicy pacjentów z CIS (10 osób), RRMS (37 osób) i SPMS (12 osób) oraz w grupie kontrolnej (29 osób) [263]. W badaniu tym wykazali podwyższone stężenie TNF- α w surowicy pacjentów z grupy CIS, RRMS i SPMS w stosunku do grupy kontrolnej osób zdrowych. Nie wiadomo jednak czy pacjenci z grupy RRMS znajdowali się w czasie rzutu czy remisji. Nie wiemy też jak długo chorowały osoby z grupy CIS, RRMS i SPMS oraz których kryteriów użyto do postawienia diagnoz CIS, RRMS i SPMS. Należy też zwrócić uwagę, że liczebność grup CIS i SPMS była niewielka.

W innym badaniu z 2014 r. Pasquali i wsp. podjęli próbę pomiaru stężeń licznych cytokin, w tym IL-2, IL-10, TNF- α i TGF- β 1, w surowicy pacjentów chorujących na RRMS oraz SPMS [264]. Liczebność badanych grup była podobna jak w pracy będącej przedmiotem niniejszej rozprawy. Jednak w odróżnieniu od niniejszego badania nie mierzono stężeń cytokin w PMR. Wykazano niższe stężenie TGF- β 1 u pacjentów z RRMS w porównaniu z SPMS, co może wynikać z działania przeciwzapalnego tej cytokiny. Nie znaleziono podobnych różnic w przypadku pozostałych z wymienionych cytokin. Do badania włączono jednak także pacjentów leczonych DMDs. Należy też wyraźnie podkreślić, że kryterium włączenia nie był wczesny okres SM. Średni czas trwania schorzenia w grupie RRMS wynosił 8,7 lat, a w grupie SPMS 14,6 lat. Ponadto, diagnoza SM stawiana była na podstawie kryteriów McDonalda 2010 [265].

W jednej z nowszych polskich prac badano stężenie TNF- α w surowicy u 92 pacjentów z RRMS w czasie remisji oraz u 30 osób zdrowych [266]. Rozpoznanie SM stawiane było na podstawie kryteriów McDonalda z 2005 r [262]. Średni czas trwania choroby wynosił 5,7 lat. Zaskakujący jest fakt, że uzyskano niższe stężenie TNF- α w grupie pacjentów RRMS w czasie remisji niż w grupie kontrolnej.

W badaniu z 2017 r. autorzy oznaczali stężenia różnych cytokin (w tym IL-10 i TGF- β) w surowicy pacjentów z CIS (21 osób), RRMS (34 osoby), SPMS (11 osób), PPMS (17 osób) oraz w grupie kontrolnej (17 osób) [267]. Stwardnienie rozsiane rozpoznawane było na podstawie kryteriów McDonalda z 2005 r [262]. Nie określono ilu pacjentów z grupy RRMS znajdowało się w czasie rzutu, a ile w czasie remisji. Średni czas trwania choroby wynosił 0,7 roku u pacjentów z CIS, 4,7 lat u pacjentów z RRMS, 11,7 lat u pacjentów z SPMS oraz 15,2 lat u pacjentów z PPMS.

Stwierdzono, że stężenie IL-10 było najniższe w grupie PPMS i nie wykazywało istotnych różnic w pozostałych grupach. Natomiast stężenia TGF- β były podobne we wszystkich badanych grupach. Należy jednak wyraźnie podkreślić fakt, że u niektórych pacjentów wartości stężeń dwóch wspomnianych cytokin były poniżej progu wykrywalności. Nie badano stężeń cytokin w PMR.

W jednym z nowszych badań autorzy podjęli tematykę stężeń w surowicy pacjentów z SM m.in. TNF- α i IL-10 [268]. Nie badano wspomnianych stężeń w PMR. Do badania zostało włączonych 159 pacjentów z RRMS w czasie remisji oraz 86 zdrowych osób tworzących grupę kontrolną. Wykazano wzrost stężenia TNF- α i spadek stężenia IL-10 u pacjentów z SM w porównaniu z grupą kontrolną. W przeciwieństwie do niniejszej pracy SM rozpoznawano na podstawie kryteriów McDonald'a z 2010 roku [265]. Najistotniejszą jednak różnicą jest włączenie do cytowanego badania pacjentów leczonych DMDs przez co najmniej 6 miesięcy. Średni czas trwania choroby u włączonych pacjentów wynosił aż 10,6 lat.

Na uwagę zasługuje fakt, że nieliczni autorzy podjęli do tej pory tematykę korelacji stężeń badanych w niniejszej dysertacji cytokin z cechami aktywności choroby w MRI. Takie badanie zostało przeprowadzone w 2003 r. i wykazano w nim, że w PMR pacjentów chorujących na RRMS stężenie IL-10 maleje w przypadku obecności takich cech w MRI [269]. Z kolei Kraus i wsp. nie wykazali takiej korelacji w surowicy [270].

6.3. Analiza porównawcza dotychczasowych badań

Jak można zauważyć, przeprowadzono do tej pory wiele badań o tematyce i metodologii zbliżonej do pracy przedstawionej w niniejszej rozprawie doktorskiej, co świadczy o niewątpliwym zainteresowaniu tematem i jego istotności w poznawaniu immunopatogenezy SM. Jednak jednocześnie nasuwa się wniosek, że badania te różnią się zarówno między sobą, jak też w porównaniu z pracą będącą przedmiotem tej rozprawy kilkoma ważnymi cechami. Innymi słowy, są one niejednorodne.

Przykładową cechą różniącą jest liczebność grup badanych. Wiele z wymienionych wyżej badań cechuje się liczebnością grup zbliżoną do projektu,

któremu poświęcono tą dysertację [252, 254, 257, 259-261, 263, 264, 266]. W niektórych liczebność ta jest jednak większa [251, 252, 256, 258, 265, 267].

Należy również wyraźnie podkreślić fakt, że w skład grup pacjentów z SM w niektórych badaniach wchodzi zarówno pacjenci z RRMS jak też postaciami postępującymi, co czyni te grupy niejednorodnymi [251, 253, 254, 257, 258, 261, 263, 266].

Liczebność pacjentów z SM w przedstawionych pracach rzadko przekracza 50 osób, zwłaszcza w przypadkach, gdy stężenia badanych cytokin mierzono także w PMR. Przeglądając literaturę można wysnuć ogólny wniosek, że liczba badań, w których stężenia cytokin bada się także w PMR jest zdecydowanie mniejsza od tych, gdzie oznacza się je jedynie w surowicy. Wiąże się to z faktem, że aby dany projekt został zaaprobowany przez lokalną komisję bioetyczną, nakłucie łędźwiowe może zostać wykonane jedynie w sytuacji obecności ściśle zdefiniowanych wskazań medycznych. Znacznie ogranicza to liczebność pacjentów, których można włączyć do takiego badania.

Inną cechą różniącą jest średni czas trwania choroby. W wymienionych powyżej pracach zawiera się on w przedziale od 15,6 miesiąca do 10,6 lat [251 – 267], natomiast w niniejszym badaniu wynosi on maksymalnie 1 rok od postawienia diagnozy SM.

W wymienionych badaniach zastosowano różne kryteria rozpoznania SM, wg których diagnozowano tą chorobę. Jest to kluczowe, ponieważ poszczególne wersje kryteriów, które obowiązywały na przestrzeni lat, różnią się czułością i swoistością rozpoznawania SM i CIS. Przykładowo, niektórzy pacjenci, u których na podstawie kryteriów z 2017 r. [112] rozpoznano SM, wg wcześniejszych kryteriów zakwalifikowani zostaliby do grupy CIS. Z kolei wiele pacjentów, u których rozpoznano wg wcześniejszych kryteriów CIS, spełnia wg najnowszych kryteriów [112] warunki rozpoznania SM i postawiono u nich rozpoznanie wczesnego SM. Fakt ten wynika ze znacznie wyższej czułości kryteriów McDonalda z 2017 r. [112] w porównaniu z wersjami wcześniejszymi. W tej pracy zastosowano najbardziej aktualne kryteria McDonalda z 2017 r. [112], co było konieczne z uwagi na ich obecne obowiązywanie w procesie diagnostycznym SM na całym świecie. Wymienione powyżej badania bazowały natomiast na kryteriach McDonalda i Halliday'a z 1977 r. [254, 255], Posera z 1983 r. [250, 251, 253, 257 - 259], McDonalda z 2005 r. [261, 262, 266, 267] i McDonalda z 2010 r. [264, 265, 268].

Warto nadmienić też, że wiele z przedstawionych projektów opiera się na pomiarach stężeń cytokin wyłącznie w surowicy [254, 256, 258, 261, 263, 264, 266 - 268]. Wynika to z możliwości wykonywania nakłucia lędźwiowego jedynie w przypadku istnienia ściśle określonych wskazań medycznych. Fakt ten znacznie ogranicza możliwości przeprowadzania różnego rodzaju dużych projektów naukowych opartych na badaniu PMR. Z tego względu badacze niejednokrotnie stoją przed niełatwym wyborem polegającym na przeprowadzeniu badania na dużej grupie chorych opartego na pomiarze stężeń cytokin jedynie w surowicy, albo opartego na badaniu zarówno surowicy jak PMR, ale na małej grupie pacjentów.

Inna istotna cecha różnicująca to włączenie do badania także pacjentów leczonych DMDs. Leczenie to znacznie wpływa na uzyskiwane wyniki stężeń cytokin w surowicy i PMR, ponieważ jego celem jest immunomodulacja. Niniejszy projekt uwzględnia jedynie osoby, które nigdy nie były poddane takiej terapii. Niektóre ze wspomnianych prac prowadzone były jednak także z uwzględnieniem takich chorych [264, 268].

Wymienione prace różnią się także w zakresie badanej izoformy TGF- β . Ponieważ w większości badań mierzy się stężenie TGF- β 1 [258, 264], celem pracy będącej przedmiotem tej rozprawy było zbadanie roli w immunopatogenezie SM drugiej z izoform tej cytokiny – TGF- β 2. Rolę tej izoformy TGF- β badali też Salmaggi A. i wsp. w 1996 r. [254]. Niektórzy autorzy nie określili której z izoform stężenie badali w surowicy i / lub PMR [259, 267].

Wreszcie trzeba też wspomnieć, że wyniki wszystkich omawianych badań oraz niniejszego różnią się, niekiedy nawet znacząco. Szczególnie wielu autorów zainteresowała rola IL-2 w immunopatogenezie SM. W tym badaniu próba pomiaru jej stężeń zakończyła się w znacznym stopniu niepowodzeniem w każdej z grup zarówno w surowicy oraz w PMR. Dotyczy to zwłaszcza pomiarów w PMR. Podobną obserwację poczynili też inni autorzy [253]. Niemniej jednak wielu badaczy uzyskało wiarygodne, ciekawe wyniki. Trzeba jednak przyznać, że są one dość niejednorodne, czasami sprzeczne. Dla przykładu, zaobserwowano wyższe stężenia IL-2 w surowicy osób z SM w porównaniu z osobami zdrowymi [251, 252]. Z drugiej jednak strony, w innych pracach nie potwierdzono tych różnic [253, 256]. Warto nadmienić, że w cytowanym badaniu japońskim z 1992 r. zmierzono stężenia IL-2 także w PMR i stwierdzono, że są one wyższe w porównaniu z osobami zdrowymi [252]. W przeciwieństwie do IL-2, TNF- α cechuje się znacznie wyższą oznaczalnością

zarówno w surowicy oraz w PMR. W niniejszym badaniu, nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach tej cytokiny w surowicy pomiędzy poszczególnymi grupami. Z kolei w PMR zaobserwowano istotnie wyższe jej stężenia zarówno w grupie RRMS-rzut i RRMS-remisja w porównaniu z grupą kontrolną. Także w przypadku tej cytokiny prozapalnej wyniki uzyskane przez różnych badaczy cechują się pewną różnorodnością. Niektórzy z nich wykazali wzrost jej stężenia w surowicy pacjentów z SM [256, 263, 268]. Inne badania tego nie potwierdziły [259], a niektóre dostarczyły wręcz przeciwnych wyników wykazując, że stężenie TNF- α w surowicy pacjentów z RRMS w czasie remisji jest niższe niż u osób zdrowych [266]. Z kolei Carrieri i wsp. wykazali wzrost stężenia tej cytokiny w PMR u pacjentów z RRMS w czasie rzutu [259]. Trzeba mieć świadomość, że tak odmienne wyniki uzyskane przez różnych autorów mogą też wynikać z zupełnie przeciwnego działania tej cytokiny w zależności od tego z którym ze swoich receptorów się łączy [199]. Zwraca również uwagę fakt, że w jak wielu przypadkach jej stężenie znajdowało się poniżej progu czułości metody ELISA. Ponownie zjawisko to dotyczy w większym stopniu PMR. W tym badaniu uzyskano wynik w surowicy u wszystkich pacjentów, natomiast w PMR u większości z nich. W wielu pracach wartości stężeń TNF- α w surowicy i / lub PMR były u znacznej części włączonych pacjentów niższe od progu oznaczalności testu ELISA [254, 257, 259, 260]. Próba pomiaru stężeń IL-10 w niniejszej pracy zakończyła się w wielu przypadkach niepowodzeniem. Dotyczy to zarówno surowicy jak PMR. Wiele jednak badań przyniosło ciekawe i jednocześnie sprzeczne wyniki. Z uwagi na przeciwzapalny charakter tej cytokiny można byłoby się spodziewać spadku jej stężenia w płynach ustrojowych u pacjentów z SM. Tymczasem wykazano zarówno jego spadek [254, 268], stabilne stężenie [259, 264, 267] jak i jego wzrost [261] w surowicy pacjentów z SM. Ponadto, Frisullo i wsp. wykazali wyższe jej osoczowe stężenia u pacjentów z RRMS w czasie rzutu niż u pacjentów w czasie remisji, co jest wynikiem niewątpliwie zaskakującym i nietypowym dla cytokin przeciwzapalnych [261]. Arellano i wsp. wykazali brak istotnych różnic w zakresie osoczowych stężeń IL-10 pomiędzy pacjentami z RRMS i grupą kontrolną, natomiast stężenie to było istotnie niższe u pacjentów z PPMS [267]. W PMR wykazano w jednym badaniu podwyższone stężenia IL-10 u pacjentów z RRMS w czasie remisji, natomiast w grupie kontrolnej były one poniżej progu czułości metody ELISA [259]. Niejednoznaczne wyniki badań oceniających stężenie TGF- β wynikają m.in. z faktu badania różnych izoform. W pracy będącej przedmiotem tej dysertacji stwierdzono istotny spadek stężenia TGF- β 2

w PMR w grupie RRMS-rzut w porównaniu z grupą kontrolną. Także w przypadku tej cytokiny odnotowywane są niepowodzenia w pomiarze jej stężenia w płynach ustrojowych [254]. Niektórzy autorzy wykazują wyższe stężenie TGF- β w surowicy pacjentów z SM [258], podczas, gdy inni tego nie potwierdzają [259, 267]. Niewiele jest badań oceniających stężenia TGF- β w PMR. W jednym z nich stwierdzono, że dochodzi do wzrostu jego stężenia w PMR u pacjentów z RRMS w czasie rzutu [259], co jest wynikiem niespodziewanym biorąc pod uwagę przeciwzapalny charakter tego czynnika. Może to świadczyć o jego złożonej i wielokierunkowej roli w immunopatogenezie SM. W tej pracy nie znaleziono korelacji pomiędzy stężeniami badanych cytokin w surowicy i PMR, a wartościami indeksu IgG czy czasem trwania rzutu. Niewielu autorów poszukiwało do tej pory takich zależności. Do podobnych wniosków doszli Carrieri i wsp [259]. Nie badali oni jednak IL-2. Zrobili to natomiast Ott i wsp. potwierdzając brak zależności pomiędzy jej stężeniami w surowicy a czasem trwania rzutu [253]. Podsumowując, można stwierdzić, że wyniki badań stężeń cytokin w surowicy i PMR u pacjentów z SM cechują się niejednoznacznością, a nierzadko nawet sprzecznością. Z pewnością fakt ten wynika z wielu powodów. Powyżej przedstawiono jak bardzo różnorodne są to badania pod względem takich cech jak liczebność badanych grup, średni czas trwania choroby, stosowane kryteria rozpoznania SM, badanie stężenia cytokin także w PMR, włączenie do badania również pacjentów leczonych DMDs czy badana izoforma TGF- β . Należy też pamiętać, że zestawy ELISA różnią się czułością w zależności od producenta. Z pewnością ww. różnice mają znaczny wpływ na uzyskiwane wyniki. Co więcej, poddają one w wątpliwość zasadność i metodologiczną poprawność porównywania wyników ww. prac ze sobą.

6.4. Pojęcie „wczesny okres choroby” w odniesieniu do RRMS

Do tej pory nie zdefiniowano w literaturze pojęcia „wczesny okres” SM, w tym również jej postaci rzutowo-remisyjnej. W dotychczasowych badaniach był on ustalany umownie, a jego zakres wynosi od 6 miesięcy do 10 lat trwania choroby [271, 272]. Co więcej, niektórzy autorzy przyjmują za jego początek wystąpienie pierwszych objawów sugerujących chorobę (nawet jeśli nie można jeszcze na tak wczesnym etapie rozpoznać SM), czyli etap CIS [273], natomiast inni zakładają, że okres ten rozpoczyna się od momentu postawienia diagnozy SM [274]. W literaturze można także znaleźć

prace dotyczące wczesnego okresu SM, w których autorzy nie podają definicji tego okresu [275, 276]. Tak więc nie osiągnięto w tej sprawie porozumienia, co powoduje, że wyniki różnych badań mogą nie być porównywalne. W niniejszej pracy jako „wczesny okres RRMS” przyjęto czas do roku od postawienia diagnozy choroby. Jest to kryterium restrykcyjne, co zapewnia możliwość wykorzystania uzyskanych wyników do precyzyjnego sformułowania wniosków odnoszących się do ściśle zdefiniowanego, krótkiego okresu, w którym nieprawidłowa reakcja układu immunologicznego ma charakter wyłącznie zapoczątkowujący kaskadę procesów mających miejsce w późniejszych okresach SM. Włączenie do badania pacjentów kilka lat po rozpoznaniu u nich SM uniemożliwiłoby poznanie immunopatogenezy okresu wczesnego schorzenia. Z drugiej strony, przedstawione kryterium uniemożliwia włączenie do badania pacjentów prezentujących już pewne objawy sugerujące SM, którzy jednak nie spełniają jeszcze kryteriów McDonalda 2017 [112] rozpoznania tego schorzenia. Jest to istotna zaleta zastosowanej w niniejszej pracy definicji okresu wczesnego RRMS, ponieważ gwarantowany jest udział w badaniu jedynie pacjentów, u których nie ma wątpliwości co do rozpoznania tej choroby. Wiadomo, że na etapie CIS też zachodzą różnorodne, nieprawidłowe procesy immunopatogenetyczne, jednak mogą się one różnić od tych zachodzących w SM. Możliwość włączenia do badania także pacjentów na etapie CIS wprowadziłaby nieścisłości, co uniemożliwiłoby przedstawienie rzetelnych i miarodajnych wniosków. Podsumowując, definicja „wczesnego okresu RRMS” zastosowana w tym badaniu przedstawia zbalansowany punkt widzenia, który ma na celu wykluczenie pacjentów na etapie CIS (czyli (jeszcze) bez rozpoznania SM) oraz tych, którzy chorują już długo i zachodzące u nich procesy immunologiczne mają odmienny charakter w porównaniu z zaburzeniami okresu wczesnego. Ta ścisła i restrykcyjna definicja okresu wczesnego choroby stanowi niewątpliwie walor przedstawionego projektu.

6.5. Uwagi dotyczące czasu trwania rzutu

Kolejnym ważnym zagadnieniem jest maksymalny czas trwania zaostrzenia objawów SM, by mogło ono zostać uznane za rzut choroby. Do tej pory ustalono, że nasilenie dotychczasowych obiektywnych objawów SM lub pojawienie się nowych można nazywać rzutem choroby jedynie w sytuacji, gdy pojawia się ono w sposób ostry lub podostry, trwa co najmniej 24 godziny, nie towarzyszy mu gorączka, infekcja

ani encefalopatia. Nie określono jednak do tej pory górnej granicy czasowej trwania rzutu. Ma to znaczenie istotne, ponieważ taka granica umożliwiałaby umowne odróżnienie rzutu SM od progresji jego objawów i stopniowego, nieuchronnego pogorszenia sprawności chorego, które jest naturalną cechą choroby. W badaniu z 1992 r. mediana czasu trwania zaostrzenia objawów wynosi aż 4 tygodnie [277]. Autorzy podkreślają jednak, że w przypadku uznania tak długiego okresu zaostrzenia za rzut choroby, wyniki odzwierciedlają również okres remisji następujący po okresie rzutu. Powoduje to trudności interpretacyjne. Do tego samego wniosku doszli też Ott i wsp [253]. Aby uniknąć takiego niepożądanego wpływu na wyniki, w badaniu będącym przedmiotem tej rozprawy maksymalny czas trwania rzutu to 21 dni. Niestety większość autorów nie podaje tego parametru w odniesieniu do ich badań. Powoduje to trudności w porównywaniu uzyskanych wyników i ich właściwej interpretacji.

6.6. Znaczenie przyjętych kryteriów rozpoznania SM

Praca oparta jest na kryteriach McDonalda 2017, czyli najnowszej i, co najważniejsze, aktualnie obowiązującej ich wersji [112]. Z uwagi, że kryteria te obowiązują od niedawna, w literaturze praktycznie wszystkie podobne badania oparte są na innych, wcześniejszych kryteriach. Ma to niebanalne znaczenie, ponieważ wcześniejsze wersje kryteriów rozpoznania SM znacznie różnią się czułością i swoistością rozpoznawania tego schorzenia. Tym, co cechuje najnowszą ich wersję (z 2017 r.) [112] jest niewątpliwie względnie wysoka czułość, kosztem niższej swoistości w porównaniu z wersją z 2010 r [265]. Kryteria z 2017 r. umożliwiają zatem niejednokrotnie rozpoznanie choroby na etapie, który wg poprzedniej wersji byłby określony mianem CIS. Dlatego obecnie mamy do czynienia ze spadkiem liczby rozpoznań CIS na korzyść SM. Włączeni do niniejszego badania pacjenci z rozpoznaniem wg kryteriów z 2017 r. SM reprezentują wczesny okres choroby i należy wyraźnie podkreślić, że niektórzy z nich spełniają kryteria rozpoznania choroby wyłącznie wg kryteriów z 2017 r, natomiast wg poprzedniej ich wersji należałoby u nich rozpoznać CIS. Widać zatem jak wielkie znaczenie ma fakt, że przedstawiany projekt oparty jest na aktualnie obowiązujących kryteriach. Można wręcz stwierdzić, że jego wyniki są nieporównywalne z wynikami podobnych badań, lecz opartych na innych kryteriach rozpoznania SM. Nie przeprowadzono do tej pory podobnych badań opartych na kryteriach z 2017 r.

6.7. Niepowodzenia dotyczące pomiaru stężeń cytokin

Niewątpliwie zwraca uwagę fakt, iż u niektórych pacjentów nie uzyskano wyników stężeń cytokin w surowicy i / lub PMR. Bezpośrednią przyczyną tego zjawiska są wartości stężeń cytokin poniżej progu wykrywalności za pomocą testu ELISA. Dotyczy to każdej z badanych cytokin, w największym stopniu jednak IL-2. Problem ten może mieć kilka przyczyn i jest szeroko rozpowszechniony oraz dobrze znany w literaturze [253, 254, 257, 259, 260]. Jedną z potencjalnych przyczyn jest znaczna nietrwałość cytokin i ich skłonność do rozpadu pomimo skrupulatnego przestrzegania zasad przechowywania materiału. Co więcej, cytokiny są substancjami o charakterze parakrynnym lub autokrynnym i są wiązane przez receptory o dużym powinowactwie niemal natychmiast po uwolnieniu, co skutkuje krótkim okresem półtrwania w płynach biologicznych. Nie bez znaczenia jest też właściwa kalibracja wykorzystywanej aparatury. Zestawy ELISA różnią się czułością w zależności od producenta, ponadto niekiedy pochodzą one z niezaufanych źródeł i ich laboratoryjna wiarygodność jest znacznie niższa. Vladić i wsp. sugerują, że ich niepowodzenie w oznaczeniu stężenia TNF- α w surowicy u 80% pacjentów i u wszystkich pacjentów w PMR mogło wynikać ze zmniejszenia uwalniania jego formy rozpuszczalnej lub z „ucieczką” jego cząsteczek od przeciwciał monoklonalnych podczas pomiaru stężenia metodą ELISA, co mogłoby wynikać z blokowania ich epitopów, kiedy łączą się z rozpuszczalnymi formami ich receptorów [260]. Zjawiska te zostały wcześniej opisane przez Martino i wsp. [278]. Z uwagi na ww. potencjalne trudności w pomiarze stężeń cytokin metodą ELISA w płynach ustrojowych, badania tego typu powinno się przeprowadzać na dużych grupach pacjentów. Bardzo ciekawą pracę poświęconą trudnościom w pomiarze stężeń IL-2 w surowicy i w PMR metodą ELISA opublikowali w 1998 r. Sivieri i wsp [279]. W celu uzyskania wiarygodnych wyników należy wg tych autorów zwrócić szczególną uwagę na kilka decydujących czynników. Pierwszym z nich jest czas wykonania nakłucia lędźwiowego (np. okres rzutu / remisji). Kolejnym jest precyzyjny dobór pacjentów do badania. Zwraca się też uwagę na prawidłową technikę wykonania nakłucia lędźwiowego i przechowywania PMR. Wreszcie ostatnią istotną kwestią jest właściwa standaryzacja i wykonanie testu ELISA. Nie wolno też zapomnieć o upewnieniu się, że zestawy ELISA transportowane były w odpowiednich warunkach. Autorzy potwierdzają też poczynioną w niniejszej dysertacji obserwację, że dotychczasowe badania oceniające stężenie IL-2 w surowicy i PMR pacjentów z SM cechują się niejednorodnymi i często sprzecznymi wynikami, co z pewnością

w dużej mierze wynika z ww. trudności, którym należy sprostać w celu uzyskania wiarygodnych wyników metodą ELISA. Zwracają też uwagę, że stężenia IL-2 zarówno w surowicy i PMR często znajdują się poniżej progu czułości metody ELISA.

6.8. Dobór pacjentów do grup RRMS-rzut i RRMS-remisja

W niniejszym badaniu w skład grupy RRMS-rzut i RRMS-remisja wchodzi odmienni pacjenci. Innymi słowy, nie bada się stężenia cytokin w płynach biologicznych u tych samych pacjentów w czasie rzutu i remisji, lecz u innych, niezależnych osób. Wiadomo, że z punktu widzenia uzyskania najbardziej wiarygodnych wyników korzystniejsze byłoby to pierwsze rozwiązanie metodologiczne. Otóż każdy człowiek cechuje się osobliwym, charakterystycznym dla siebie profilem uwalniania cytokin, na który dodatkowo mogą wpływać czynniki egzogenne bądź endogenne. Nie można nawet wykluczyć faktu, że dany pacjent w czasie rzutu będzie cechował się podobnym profilem cytokin jak inna osoba w czasie remisji. Niemniej jednak, rozwiązanie takie jest niemożliwe z etycznego punktu widzenia. Wiązałoby się bowiem z koniecznością wykonania nakłucia łędźwiowego w każdego chorującego na SM pacjenta zarówno w czasie rzutu i remisji. Procedurę tą wykonać można jedynie w przypadku istnienia ściśle określonych wskazań medycznych. Wskazania do powtórnego nakłucia łędźwiowego u pacjenta z rozpoznaniem SM spotykane są w praktyce klinicznej bardzo rzadko. Z tego względu taka metodologia badania nie zostałaby zaakceptowana przez komisję bioetyczną. Przeglądając literaturę można dostrzec, że inni autorzy również mieli tą świadomość i zastosowali metodologię identyczną jak w niniejszej pracy [257 - 260, 261, 280, 281]. Alternatywnie, można zaplanować badanie, w którym ci sami pacjenci będą badani w czasie rzutu i remisji, jednak pod warunkiem, że badanym płynem biologicznym nie będzie PMR.

6.9. Interpretacja wyników

Interpretacja uzyskanych wyników z pewnością nie jest zadaniem łatwym, gdyż wpłynęło na nie wiele wspomnianych w rozdziale 6.3 czynników.

Po pierwsze, w przedstawionej pracy bada się pacjentów we wczesnym okresie od czasu rozpoznania SM. Jest to cecha różniąca to badanie od wielu wspomnianych

w rozdziale 6.2. Wyniki świadczą o tym, że istotnie nieprawidłowa reakcja zapalna będąca odpowiedzią nieswoistą układu immunologicznego zachodzi już we wczesnym okresie patogenezy RRMS. Jest to reakcja, która przebiega ze zwiększeniem w PMR stężenia prozapalnego TNF- α i zmniejszeniem stężenia przeciwzapalnego TGF- β 2. Istotnie wyższe wartości indeksu TNF- α w obu grupach pacjentów z RRMS w porównaniu z grupą kontrolną stanowią potwierdzenie, że przyczyną wspomnianego wzrostu stężenia tej cytokiny w PMR we wczesnym okresie RRMS jest jej intratekalna synteza. Zmniejszenie w PMR stężenia TGF- β 2 pacjentów we wczesnym RRMS pozwala przypuszczać, że część komórkowa odpowiedzi immunologicznej odgrywa również pewną rolę na tym etapie, gdyż cytokina ta jest wytwarzana przez limfocyty Treg. Z kolei istotny spadek jej stężenia w surowicy w grupie RRMS-rzut u pacjentów ze wzmacniającymi się po podaniu środka kontrastowego ogniskami w MRI sugeruje zmniejszenie liczby/aktywności tych komórek w okresach aktywności choroby także we krwi obwodowej. Są to jednak wnioski pośrednie, ponieważ udziału odpowiedzi komórkowej nie można wykazać korzystając wyłącznie z metody ELISA. Uzyskane wyniki przemawiają za celowością kontynuowania badań o tej tematyce, które oparte będą na dużych grupach pacjentów i technikach badawczych takich jak cytometria przepływowa, łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) oraz hybrydyzacja *in situ*. Wnioski z nich płynące mogą posłużyć do opracowania nowych DMDs skutecznych we wczesnym okresie choroby, jak również markerów tego okresu schorzenia.

Po drugie, w niniejszej pracy stosuje się kryteria McDonalda 2017 [112], których wysoka czułość w rozpoznawaniu SM jest szeroko dyskutowana na światowych konferencjach poświęconych tej chorobie. Istnieją bowiem wątpliwości czy kryteria te nie są nadmiernie czułe i nie pozwalają rozpoznać choroby na etapach, w których nasilenie nieprawidłowej reakcji immunologicznej jest jeszcze niewielkie. Wg kryteriów McDonalda z 2010 r. [265] niektórzy spośród pacjentów włączonych do badania spełnialiby jedynie kryteria CIS, a nie SM. Tymczasem ci sami pacjenci włączeni są do grupy RRMS-rzut, gdyż na podstawie aktualnie obowiązujących kryteriów McDonalda 2017 należy rozpoznać u nich SM. Fakt ten przyczynia się do włączenia do projektu pacjentów na wczesnym etapie immunopatogenezy SM, co może uzasadniać uzyskane wyniki.

Po trzecie, liczebność grup w przedstawionej pracy jest stosunkowo nieduża. Wynika ona z krótkiego okresu zbierania materiału, restrykcyjnych kryteriów

kwalifikacji pacjentów do badania, oraz z faktu, że kryteria McDonalda 2017 [112] w chwili rozpoczęcia badania były stosowane od niedawna. Po zwiększeniu liczebności badanych grup wyniki oraz wnioski płynące z niego mogłyby być nieco inne. Dobrym tego przykładem jest otrzymana wartość p na granicy istotności w przypadku analizy różnicy stężeń TGF- β 2 w PMR w grupie RRMS-remisja i w grupie kontrolnej. Jest bardzo prawdopodobne, że po zwiększeniu liczebności grup badanych wartość p byłaby istotna, podobnie jak w przypadku porównania grup RRMS-rzut i grupy kontrolnej. Ponadto, w przypadku większych grup możliwe byłoby przeprowadzenie innych przydatnych analiz, jak np. porównanie wartości stężeń cytokin i ich indeksów w zależności od obecności prążków oligoklonalnych w PMR w danej grupie badawczej.

6.10. Zalety i ograniczenia badania

Badanie będące przedmiotem niniejszej rozprawy jest potrzebne i rzuca światło na bardzo ważny i do tej pory mało poznany temat, jakim jest immunopatogeneza wczesnego okresu RRMS. Poznanie jej może w przyszłości umożliwić opracowanie DMDs skutecznych we wczesnym okresie choroby i zapobiegających jej rozwojowi. Ponadto, wnioski płynące z badania mogą przyczynić się do powstania nowych markerów wczesnego okresu RRMS, np. mierzone w PMR stężenie TNF- α czy TGF- β 2. Należy też nadmienić, że praca ta dostarcza pewnych wniosków dotyczących roli cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych, oraz pośrednio limfocytów Treg w tym ważnym okresie immunopatogenezy SM. Ważną jej zaletą jest zastosowanie ścisłego, restrykcyjnego kryterium czasowego wczesnego okresu SM, które, jak wspomniano, nie zostało do tej pory zdefiniowane w literaturze i cechuje się znaczną rozbieżnością. Zapobiega ono włączeniu do projektu pacjentów chorujących już długo oraz tych, którzy prezentują już pewne objawy, jednak nie spełniają jeszcze kryteriów rozpoznania SM. Do tej pory przeprowadzono mało badań oceniających stężenia cytokin w płynach ustrojowych pacjentów w tak wczesnym okresie tego schorzenia. Innym ważnym atutem jest oparcie na najnowszych, aktualnie obowiązujących kryteriach rozpoznania SM, czyli kryteriach McDonalda 2017 [112]. Nie ma w literaturze badań podobnych do tego i również opartych na najnowszych kryteriach rozpoznania choroby. Biorąc pod uwagę jak wiele te kryteria zmieniły w procesie diagnostycznym SM i jak zwiększyła się po ich wdrożeniu liczba rozpoznań SM,

wnioski płynące z badań uwzględniających ich wcześniejsze wersje są nieaktualne. Prezentowane badanie jest jednym z nielicznych badających zależność stężeń omawianych cytokin w surowicy i PMR od cech aktywności RRMS w MRI [269, 270]. Praca wyróżnia się też precyzyjnym doбором badanych cytokin i oceną ich indeksów. Dobór cytokin powiązany jest z rolą limfocytów Treg, których udział w patogenezie choroby jest obecnie przedmiotem szerokich dyskusji. Dzięki temu badanie będące przedmiotem niniejszej dysertacji otwiera drzwi dla następnych projektów z wykorzystaniem kolejnych technik badawczych.

Przedstawione badanie ma też kilka ograniczeń. Jednym z nich jest stosunkowo niewielka liczebność badanych grup, co dokładnie omówiono w rozdziale 6.9. Ponadto, niektóre pomiary wykazują wartości stężeń poniżej progu oznaczalności metody ELISA. Wynika to ze wspomnianych w rozdziale 6.7 trudności związanych z samą techniką ELISA oraz z faktu znacznej nietrwałości cytokin. W badaniu uzyskano jedynie pośrednie wnioski dotyczące odpowiedzi komórkowej (limfocyty Treg) we wczesnym okresie RRMS. Planowane są dalsze badania z użyciem cytometrii przepływowej, PCR oraz hybrydyzacji *in situ*.

7. Wnioski końcowe

- Nieswoista odpowiedź układu immunologicznego w postaci nieprawidłowej reakcji zapalnej zachodzi już we wczesnym okresie patogenezy RRMS. Obejmuje ona intratekalną produkcję prozapalnego TNF- α i zmniejszenie wytwarzania przeciwzapalnego TGF- β 2.
- Część komórkowa odpowiedzi immunologicznej (limfocyty Treg) również wydaje się odgrywać rolę w patogenezie wczesnego RRMS zarówno w PMR i krwi obwodowej, zwłaszcza w okresach aktywności choroby.
- Uzyskane wyniki przemawiają za celowością kontynuowania badań o tej tematyce, które oparte będą na dużych grupach pacjentów i technikach badawczych takich jak cytometria przepływowa, PCR oraz hybrydyzacja *in situ*. Wnioski z nich płynące mogą posłużyć do opracowania nowych DMDs skutecznych we wczesnym okresie choroby, jak również markerów tego okresu schorzenia.

Streszczenie w języku polskim

Tytuł: Analiza stężeń wybranych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych w surowicy i płynie mózgowo - rdzeniowym we wczesnym okresie postaci rzutowo-remisyjnej stwardnienia rozsianego

Stwardnienie rozsiane (łac. sclerosis multiplex, SM) jest przewlekłą, zapalno-demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Na jej patogenezę składa się nieprawidłowa reakcja układu immunologicznego oraz neurodegeneracja. Znaczącą rolę w regulacji procesu zapalnego w przebiegu SM odgrywają cytokiny. Szczególnie słabo poznanym zagadnieniem jest immunopatogeneza wczesnego okresu schorzenia. Poza tym coraz częściej podkreśla się i bada rolę limfocytów T regulatorowych (Treg) i wytwarzanych przez nie cytokin w immunopatogenezie SM. W dotychczasowych badaniach mierzono stężenia cytokin w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) w różnych postaciach i okresach choroby. Brakuje jednak takich danych w odniesieniu do wczesnego okresu postaci rzutowo-remisyjnej SM (ang. relapsing – remitting multiple sclerosis, RRMS) i kryteriów McDonalda 2017.

Celem pracy była analiza stężeń w surowicy i PMR cytokin prozapalnych (IL-2 oraz TNF- α) oraz przeciwzapalnych wytwarzanych przez limfocyty Treg (IL-10 i TGF- β 2) we wczesnym okresie RRMS na podstawie kryteriów McDonalda 2017.

Badanie uwzględniało trzy grupy pacjentów: osoby we wczesnym okresie RRMS w czasie rzutu ($n = 18$), osoby we wczesnym okresie RRMS w czasie remisji ($n = 14$) oraz grupę kontrolną składającą się z osób, u których wykluczono choroby zapalne układu nerwowego ($n = 20$). Rozpoznanie SM stawiano w oparciu o kryteria McDonalda 2017 w okresie do 1 roku przed włączeniem do badania. U każdego pacjenta przeprowadzono badanie neurologiczne, neuroobrazowe z oceną aktywności choroby oraz pobrano krew i PMR zgodnie ze wskazaniami medycznymi. Badane próbki przechowywane były w temperaturze -80°C . Pomiaru stężeń cytokin dokonano za pomocą testu ELISA (ang. enzyme – linked immunosorbent assay) w wersji kanapkowej. Obliczono indeksy poszczególnych cytokin.

Stężenia TNF- α w PMR zarówno w czasie rzutu i remisji były istotnie wyższe w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej ($p < 0,01$). Stężenia TGF- β 2 w PMR

w czasie rzutu były istotnie niższe w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej ($p = 0,01$). Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w zakresie stężeń cytokin w surowicy. W grupie RRMS-rzut stwierdzono istotnie niższe stężenia TGF- β 2 w surowicy u pacjentów z cechami aktywności choroby w badaniu neuroobrazowym. Wartości indeksów TNF- α były istotnie wyższe w grupie RRMS-rzut. Stężenia badanych cząsteczek w surowicy i PMR nie korelowały z wartościami indeksu IgG i czasem trwania rzutu w badanych grupach. Stężenia IL-2 w surowicy i PMR, oraz IL-10 w PMR były w większości przypadków poniżej progu czułości metody ELISA.

Badanie pozwala przypuszczać, że nieprawidłowa reakcja zapalna zachodzi już we wczesnym okresie patogenezy RRMS. Wiąże się ona z intratekalną syntezą prozapalnego TNF- α i zmniejszeniem produkcji przeciwzapalnego TGF- β 2. Ważną rolę wydaje się też odgrywać odpowiedź komórkowa, a dokładnie limfocyty Treg. Istnieje zapotrzebowanie na badania oparte na dużych grupach, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR) oraz hybrydyzacji *in situ*.

Streszczenie w języku angielskim

Title: The analysis of serum and cerebrospinal fluid concentrations of selected proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in early relapsing – remitting multiple sclerosis

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, demyelinating disorder of the central nervous system (CNS). Its pathogenesis includes inappropriate immune response and neurodegeneration. The severity of inflammation is regulated by cytokines. Particularly the immunopathogenesis of early MS is an insufficiently understood topic. What is more, the role of T regulatory (Treg) cells and associated cytokines is one of the most widely discussed topics regarding the immunopathogenesis of MS. To date, cytokines concentrations have been assessed in serum and cerebrospinal fluid (CSF) in various forms and phases of the disease. However, such data regarding early relapsing – remitting multiple sclerosis (RRMS) and the 2017 McDonald criteria are lacking.

The aim of the study was the analysis of serum and CSF concentrations of proinflammatory (IL-2 and TNF- α) and anti-inflammatory cytokines produced by Treg cells (IL-10 and TGF- β 2) in early RRMS according to the 2017 McDonald criteria.

The study included 3 groups: early RRMS patients during relapse (n = 18), early RRMS patients during remission (n = 14) and control group comprised of individuals without any neuroinflammatory disorders. The MS diagnosis was established according to the 2017 McDonald criteria within a year before the enrollment to the study. In each patient the neurological examination, blood and CSF collection as well as neuroimaging with the disease activity assessment were performed. The material was stored in -80°C. The measurement of cytokines levels was performed using the enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) method (sandwich version). The cytokines indexes were calculated.

Significantly higher CSF concentrations of TNF- α in both RRMS – relapse and RRMS – remission group were found compared with controls (p < 0,01). The CSF levels of TGF- β 2 in the RRMS – relapse group were significantly lower compared with the control group (p = 0,01). No significant differences in cytokines serum levels were seen. In the RRMS – relapse group the serum TGF- β 2 levels were significantly lower in patients with active disease in neuroimaging. The values of TNF- α index were

significantly higher in the RRMS – relapse group. Serum as well as CSF cytokines levels did not correlate with IgG index values and the relapse duration. Serum as well as CSF levels of IL-2 and CSF IL-10 concentrations were below the ELISA sensitivity threshold in majority of cases.

Our study allows to suspect that an inappropriate inflammatory response occurs in early RRMS. It includes the intrathecal synthesis of proinflammatory TNF- α and decrease in anti-inflammatory TGF- β 2 release. The cellular component of this response (especially Treg cells) also seems to play a significant role. There is a strong need for further studies based on large groups, using flow cytometry, polymerase chain reaction (PCR) and *in situ* hybridization.

Podziękowania

- ❖ Dziękuję Paniom mgr Marlenie Wójcickiej oraz Elżbiecie Kaufman-Szukalskiej z Zakładu Neuroimmunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu za pomoc w przeprowadzeniu pomiaru stężeń cytokin metodą ELISA.
- ❖ Dziękuję Pani dr n. med. Lucynie Kramer z Katedry i Zakładu Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu za pomoc w opracowaniu statystycznym.

Piśmiennictwo

1. Smith KJ, McDonald WI. The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999;354:1649-73.
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2002;359:1221-31.
3. Maeder R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurol. Scandinav.* 1979;60:189-92.
4. Murray TJ. Multiple Sclerosis: The History of a Disease. New York 2005, Demos Health.
5. Vulpian EFA. Note sur la sclérose en plaques de la moelle épinière. *Union Méd.* 1866;30:459-65, 475-82, 541-48.
6. Charcot JM. Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hôp Civils Milit. Paris,* 1868;41:554-58.
7. Charcot JM. Lectures on the Diseases on the Nervous System Delivered at La Salpêtrière. London, New Sydenham Society, 1877.
8. Rindfleisch E. Histologische detail zu der grauen degeneration von gehirn and rückenmark. *Virchow Arch. Path. Anat. Physiol.* 1863;26:474-83.
9. Ribbert H. Ueber multiple sclerosis des gehirns und rückenmarks. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 1882;90:243-60.
10. Moxon W. Eight cases of insular sclerosis of the brain and spinal cord. *Guy Hospital Reports* 1875;20:437-78.
11. Hamilton AM. Nervous Diseases: Their Description and Treatment London: J&A Churchill, 1878, ss. 346-51.
12. Marie P. La sclérose en plaques et maladies infectieuses. *La Progress Medicale* 1884;12:287-89.
13. Marie P. Lectures on Diseases of the Spinal Cord. M. Lubbock, tłum. London: New Sydenham Society, 1895;153, ss. 134-36.
14. Dawson JD. The histology of disseminated sclerosis. *Rev. Neurol. Psychiat.* 1917-1918;15:47-166; 369-417; 16, 287-307.
15. Brickner R. Studies of the pathogenesis of multiple sclerosis, II. Evidence of the presence of an abnormal lipase in the blood in multiple sclerosis. *Bull. Neurol. Inst. NY* 1931;1:105.

16. Putnam TJ. Studies in multiple sclerosis. *Arch. Neurol. Psych.* 1936;35:1289–308.
17. Rivers TM, Schwentker F. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J. Exp. Med.* 1935;61:698–702.
18. Doyle FH, Gore JC, Pennock JM, Bydder GM, Orr JS, Steiner RE, Young IR, Burl M, Clow H, Gilderdale DJ, Bailes DR, Walters PE. Imaging of the brain by nuclear magnetic resonance. *Lancet.* 1981;2:53–7.
19. Grossman RI, Gonzalez-Scarano F, Atlas SW, Galetta S, Silberberg DH. Multiple sclerosis: gadolinium enhancement in MR imaging. *Radiology.* 1986;161:721–25.
20. Bury J. Diseases of the Nervous System. Manchester: Manchester University Press, 1912.
21. Kalinowska-Łyszczarz A, Losy J. Leczenie immunologiczne. W: Losy J [red.]. Stwardnienie rozsiane. Wyd. 2. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2019, ss. 65–81.
22. Fabian MT, Krieger SC, Lublin FD. Multiple Sclerosis and Other Inflammatory Demyelinating Diseases of the Central Nervous System. W: Daroff R, Jankovic J, Mazziotta J, Pomeroy S [red.]. *Bradley's Neurology in Clinical Practice.* Elsevier, 2015, ss. 1159 – 86.e4.
23. Chitnis T, Khoury SJ. Neuroimmunology. W: Daroff R, Jankovic J, Mazziotta J, Pomeroy S [red.]. *Bradley's Neurology in Clinical Practice.* Elsevier, 2015, ss. 676 – 95.e4.
24. Conlon P, Oksenberg JR, Zhang J, Steinman L. The immunobiology of multiple sclerosis: an autoimmune disease of the central nervous system. *Neurobiol Dis.* 1999;6:149-66.
25. Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C. Multiple sclerosis. *Immunol Rev.* 2005;204:208-31.
26. Wekerle H, Lassmann H. The immunology of inflammatory demyelinating disease. W: Compston A, McDonald I, Noseworthy J, Lassmann H, Miller D, Smith K, Wekerle H, Confavreux C [red.]. *McAlpine's Multiple Sclerosis.* Wyd. 4. Churchill Livingstone Elsevier; 2006, ss. 491-555.
27. Emmer A, Staeger MS, Kornhuber ME. The retrovirus / superantigen hypothesis of multiple sclerosis. *Cell Mol Neurobiol.* 2014;34:1087-96.

28. Li YF, Zhang SX, Ma XW, Xue YL, Gao C, Li XY. Levels of peripheral Th17 cells and serum Th17-related cytokines in patients with multiple sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;18:20-5.
29. Dhaeze T, Tremblay L, Lachance C, Peelen E, Zandee S, Grasmuck C, Bourbonnière L, Larouche S, Ayrignac X, Rébillard RM, Poirier J, Lahav B, Duquette P, Girard M, Moumdjian R, Bouthillier A, Larochelle C, Prat A. CD70 defines a subset of proinflammatory and CNS-pathogenic TH1/TH17 lymphocytes and is overexpressed in multiple sclerosis. *Cell Mol Immunol*. 2019;16:652-65.
30. Seidkhani-Nahal A, Noori-Zadeh A, Bakhtiyari S, Khosravi A. Frequency of CD8+ regulatory T cells in the multiple sclerosis patients: a systematic review and meta-analysis. *Acta Neurol Belg*. 2019;119:61-8.
31. Thi Cuc B, Pohar J, Fillatreau S. Understanding regulatory B cells in autoimmune diseases: the case of multiple sclerosis. *Curr Opin Immunol*. 2019;61:26-32.
32. Correale J, Marrodan M, Ysraelit MC. Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in Progressive Multiple Sclerosis. *Biomedicines*. 2019;7. pii: E14.
33. Catz I, Warren KG. Intrathecal synthesis of autoantibodies to myelin basic protein in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*. 1986;13:21-4.
34. Boziki M, Lagoudaki R, Melo P, Kanidou F, Bakirtzis C, Nikolaidis I, Grigoriadou E, Afrantou T, Tatsi T, Matsi S, Grigoriadis N. Induction of apoptosis in CD4(+) T-cells is linked with optimal treatment response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with Glatiramer acetate. *J Neurol Sci*. 2019;401:43-50.
35. Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Severa M, Coccia EM. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol*. 2016;94:886-94.
36. Zhang X, Tao Y, Chopra M, Dujmovic-Basuroski I, Jin J, Tang Y, Drulovic J, Markovic-Plese S. IL-11 Induces Th17 Cell Responses in Patients with Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J Immunol*. 2015;194:5139-49.
37. Kuhle J, Barro C, Disanto G, Mathias A, Soneson C, Bonnier G, Yaldizli Ö, Regeniter A, Derfuss T, Canales M, Schlupe M, Du Pasquier R, Krueger G,

- Granziera C. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler*. 2016;22:1550-9.
38. Martínez-Yélamos A, Saiz A, Bas J, Hernandez JJ, Graus F, Arbizu T. Tau protein in cerebrospinal fluid: a possible marker of poor outcome in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2004;363:14-7.
39. Wang HY, Matsui M, Araya S, Onai N, Matsushima K, Saida T. Chemokine receptors associated with immunity within and outside the central nervous system in early relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2002;133:184-92.
40. Rot U, Sandelius Å, Emeršič A, Zetterberg H, Blennow K. Cerebrospinal fluid GAP-43 in early multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2018;4:2055217318792931.
41. Singh AK, Novakova L, Axelsson M, Malmeström C, Zetterberg H, Lycke J, Cardell SL. High Interferon- γ Uniquely in V δ 1 T Cells Correlates with Markers of Inflammation and Axonal Damage in Early Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2017;8:260.
42. Rivas JR, Ireland SJ, Chkheidze R, Rounds WH, Lim J, Johnson J, Ramirez DM, Ligocki AJ, Chen D, Guzman AA, Woodhall M, Wilson PC, Meffre E, White C 3rd, Greenberg BM, Waters P, Cowell LG, Stowe AM, Monson NL. Peripheral VH4+ plasmablasts demonstrate autoreactive B cell expansion toward brain antigens in early multiple sclerosis patients. *Acta Neuropathol*. 2017;133:43-60.
43. Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, Bass AD, Wynn DR, Margolin DH, Lake SL, Moran S, Palmer J, Smith MS, Compston DA. Alemtuzumab versus interferon β -1a in early relapsing-remitting multiple sclerosis: post-hoc and subset analyses of clinical efficacy outcomes. *Lancet Neurol*. 2011;10:338-48.
44. Remington GM, Treadaway K, Frohman T, Salter A, Stüve O, Racke MK, Hawker K, Agosta F, Sormani MP, Filippi M, Frohman EM. A one-year prospective, randomized, placebo-controlled, quadruple-blinded, phase II safety pilot trial of combination therapy with interferon beta-1a and mycophenolate mofetil in early relapsing-remitting multiple sclerosis (TIME MS). *Ther Adv Neurol Disord*. 2010;3:3-13.

45. Preziosa P, Pagani E, Mesaros S, Riccitelli GC, Dackovic J, Drulovic J, Filippi M, Rocca MA. Progression of regional atrophy in the left hemisphere contributes to clinical and cognitive deterioration in multiple sclerosis: A 5-year study. *Hum Brain Mapp.* 2017;38:5648-65.
46. Popescu BF, Lucchinetti CF. Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2012;12:11.
47. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 2004;55:458-68.
48. Sadatipour BT, Greer JM, Pender MP. Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1998;44:980-3.
49. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gatringer T, Barro C, Kappos L, Comabella M, Fazekas F, Petzold A, Blennow K, Zetterberg H, Kuhle J. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018;14:577-89.
50. Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet.* 2007;39:969-76.
51. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One.* 2010;5. pii: e12496.
52. Jakimovski D, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Bergsland N, Ramasamy DP, Carl E, Dwyer MG, Zivadinov R. Higher EBV response is associated with more severe gray matter and lesion pathology in relapsing multiple sclerosis patients: A case-controlled magnetization transfer ratio study. *Mult Scler.* 2019:1352458519828667.
53. Parratt J, Tavendale R, O'Riordan J, Parratt D, Swinger R. Chlamydia pneumoniae-specific serum immune complexes in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008;14:292-9.
54. Dong-Si T, Weber J, Liu YB, Buhmann C, Bauer H, Bendl C, Schnitzler P, Grond-Ginsbach C, Grau AJ. Increased prevalence of and gene transcription by Chlamydia pneumoniae in cerebrospinal fluid of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol.* 2004;251:542-7.

55. Sadeghi J, Alizadeh N, Ahangar Oskouei M, Laghusi D, Savadi Oskouei D, Nikanfar M, Seyyed Mousavi MN. Frequency of superantigen encoding genes of *Staphylococcus aureus* isolates collected from multiple sclerosis (MS) patients and nasal carriers. *Microb Pathog*. 2019;127:316-9.
56. Ebers GC. Genetics and multiple sclerosis: an overview. *Ann Neurol*. 1994;36 Suppl:S12-4.
57. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12877-82.
58. Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, Lincoln RR, Swerdlin A, Mignot E, Lin L, Goodin D, Erlich HA, Schmidt S, Thomson G, Reich DE, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet*. 2004;74:160-7.
59. Zuvich RL, McCauley JL, Oksenberg JR, Sawcer SJ, De Jager PL; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Aubin C, Cross AH, Piccio L, Aggarwal NT, Evans D, Hafler DA, Compston A, Hauser SL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetic variation in the IL7RA / IL7 pathway increases multiple sclerosis susceptibility. *Hum Genet*. 2010;127:525-35.
60. Castro K, Casaccia P. Epigenetic modifications in brain and immune cells of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2018;24:69-74.
61. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:182-91.
62. Goodin DS. The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:231-66.
63. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*. 1989;112:133-46.
64. Alter M, Leibowitz U, Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch Neurol*. 1966;15:234-7.
65. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*. 1995;47:425-48.
66. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adiutori R, Bianchi L, Topping J, Bestwick JP, Meier UC, Marta M, Dalla Costa G, Runia T, Evdoshenko E, Lazareva N,

- Thouvenot E, Iaffaldano P, Drenzo V, Khademi M, Piehl F, Comabella M, Sombekke M, Killestein J, Hegen H, Rauch S, D'Alfonso S, Alvarez-Cermeño JC, Kleinová P, Horáková D, Roesler R, Lauda F, Llufríu S, Avsar T, Uygunoglu U, Altintas A, Saip S, Menge T, Rajda C, Bergamaschi R, Moll N, Khalil M, Marignier R, Dujmovic I, Larsson H, Malmstrom C, Scarpini E, Fenoglio C, Wergeland S, Laroni A, Annibali V, Romano S, Martínez AD, Carra A, Salvetti M, Uccelli A, Torkildsen Ø, Myhr KM, Galimberti D, Rejdak K, Lycke J, Frederiksen JL, Drulovic J, Confavreux C, Brassat D, Enzinger C, Fuchs S, Bosca I, Pelletier J, Picard C, Colombo E, Franciotta D, Derfuss T, Lindberg R, Yaldizli Ö, Vécsei L, Kieseier BC, Hartung HP, Villoslada P, Siva A, Saiz A, Tumani H, Havrdová E, Villar LM, Leone M, Barizzone N, Deisenhammer F, Teunissen C, Montalban X, Tintoré M, Olsson T, Trojano M, Lehmann S, Castelnovo G, Lapin S, Hintzen R, Kappos L, Furlan R, Martinelli V, Comi G, Ramagopalan SV, Giovannoni G. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler*. 2015;21:1013-24.
67. Shaheen HA, Sayed SS, Daker LI, AbdelAziz HE, Taha MA. Does vitamin D deficiency predict early conversion of clinically isolated syndrome? *Int J Neurosci*. 2018;128:946-51.
68. Soilu-Hänninen M, Airas L, Mononen I, Heikkilä A, Viljanen M, Hänninen A. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2005;11:266-71.
69. Pierrot-Deseilligny C, Rivaud-Péchoux S, Clerson P, de Paz R, Souberbielle JC. Relationship between 25-OH-D serum level and relapse rate in multiple sclerosis patients before and after vitamin D supplementation. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012;5:187-98.
70. Derakhshandi H, Etemadifar M, Feizi A, Abtahi SH, Minagar A, Abtahi MA, Abtahi ZA, Dehghani A, Sajjadi S, Tabrizi N. Preventive effect of vitamin D3 supplementation on conversion of optic neuritis to clinically definite multiple sclerosis: a double blind, randomized, placebo-controlled pilot clinical trial. *Acta Neurol Belg*. 2013;113:257-63.
71. Lu M, Taylor BV, Körner H. Genomic Effects of the Vitamin D Receptor: Potentially the Link between Vitamin D, Immune Cells, and Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9:477.

72. Manouchehrinia A, Tench CR, Maxted J, Bibani RH, Britton J, Constantinescu CS. Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain*. 2013;136:2298-304.
73. Di Pauli F, Reindl M, Ehling R, Schautzer F, Gneiss C, Lutterotti A, O'Reilly E, Munger K, Deisenhammer F, Ascherio A, Berger T. Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008;14:1026-30.
74. Arianoglu A, Shugaiv E, Tüzün E, Eraksoy M. Impact of cigarette smoking on conversion from clinically isolated syndrome to clinically definite multiple sclerosis. *Int J Neurosci*. 2013;123:476-9.
75. van der Vurst de Vries RM, Mescheriakova JY, Runia TF, Siepmann TAM, Wokke BHA, Samijn JPA, Hintzen RQ. Smoking at time of CIS increases the risk of clinically definite multiple sclerosis. *J Neurol*. 2018;265:1010-5.
76. Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Hashmi K, Abdelrahman N, Stosic M, Dwyer M, Hussein S, Durfee J, Ramanathan M. Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;73:504-10.
77. Marabita F, Almgren M, Sjöholm LK, Kular L, Liu Y, James T, Kiss NB, Feinberg AP, Olsson T, Kockum I, Alfredsson L, Ekström TJ, Jagodic M. Smoking induces DNA methylation changes in Multiple Sclerosis patients with exposure-response relationship. *Sci Rep*. 2017;7:14589.
78. Hedström AK, Katsoulis M, Hössjer O, Bomfim IL, Oturai A, Sondergaard HB, Sellebjerg F, Ullum H, Thørner LW, Gustavsen MW, Harbo HF, Obradovic D, Gianfrancesco MA, Barcellos LF, Schaefer CA, Hillert J, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L. The interaction between smoking and HLA genes in multiple sclerosis: replication and refinement. *Eur J Epidemiol*. 2017;32:909-19.
79. Graetz C, Gröger A, Luessi F, Salmen A, Zöller D, Schultz J, Siller N, Fleischer V, Bellenberg B, Berthele A, Biberacher V, Havla J, Hecker M, Hohlfeld R, Infante-Duarte C, Kirschke JS, Kümpfel T, Linker R, Paul F, Pfeuffer S, Sämman P, Toenges G, Weber F, Zettl UK, Jahn-Eimermacher A, Antony G, Groppa S, Wiendl H, Hemmer B, Mühlau M, Lukas C, Gold R, Lill CM, Zipp F. Association of smoking but not HLA-DRB1*15:01, APOE or body mass index with brain atrophy in early multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2019;25:661-8.

80. Hedström AK, Sundqvist E, Bäärnhielm M, Nordin N, Hillert J, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134:653-64.
81. Wang Z, Xie J, Wu C, Xiao G. Correlation Between Smoking and Passive Smoking with Multiple Sclerosis and the Underlying Molecular Mechanisms. *Med Sci Monit*. 2019;25:893-902.
82. Munger KL, Bentzen J, Laursen B, Stenager E, Koch-Henriksen N, Sørensen TI, Baker JL. Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Mult Scler*. 2013;19:1323-9.
83. Munger KL, Chitnis T, Ascherio A. Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology*. 2009;73:1543-50.
84. Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Buttari F, Gilio L, Simonelli I, Carbone F, Micillo T, De Rosa V, Sica F, Furlan R, Finardi A, Fantozzi R, Storto M, Bellantonio P, Pirollo P, Di Lemme S, Musella A, Mandolesi G, Centonze D, Matarese G. Obesity worsens central inflammation and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2019;1352458519853473.
85. Huppke B, Ellenberger D, Hummel H, Stark W, Röbl M, Gärtner J, Huppke P. Association of Obesity With Multiple Sclerosis Risk and Response to First-line Disease Modifying Drugs in Children. *JAMA Neurol*. 2019.
86. Huitema MJD, Schenk GJ. Insights into the Mechanisms That May Clarify Obesity as a Risk Factor for Multiple Sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018;18:18.
87. Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, Yanovski JA. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:1196-9.
88. Gianfrancesco MA, Barcellos LF. Obesity and Multiple Sclerosis Susceptibility: A Review. *J Neurol Neuromedicine*. 2016;1:1-5.
89. Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, Quintana FJ, Correale J. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86:26-31.
90. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature*. 2013;496:513-7.

91. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013;496:518-22.
92. Brownlee WJ, Solanky B, Prados F, Yiannakas M, Da Mota P, Riemer F, Cardoso MJ, Ourselin S, Golay X, Gandini Wheeler-Kingshott C, Ciccarelli O. Cortical grey matter sodium accumulation is associated with disability and secondary progressive disease course in relapse-onset multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90:755-60.
93. Cortese M, Yuan C, Chitnis T, Ascherio A, Munger KL. No association between dietary sodium intake and the risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 2017;89:1322-9.
94. Fitzgerald KC, Munger KL, Hartung HP, Freedman MS, Montalbán X, Edan G, Wicklein EM, Radue EW, Kappos L, Pohl C, Ascherio A; BENEFIT Study Group. Sodium intake and multiple sclerosis activity and progression in BENEFIT. *Ann Neurol*. 2017;82:20-9.
95. McDonald J, Graves J, Waldman A, Lotze T, Schreiner T, Belman A, Greenberg B, Weinstock-Guttman B, Aen G, Tillema JM, Hart J, Lulu S, Ness J, Harris Y, Rubin J, Candee M, Krupp LB, Gorman M, Benson L, Rodriguez M, Chitnis T, Mar S, Barcellos LF, Laraia B, Rose J, Roalstad S, Simmons T, Casper TC, Waubant E. A case-control study of dietary salt intake in pediatric-onset multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2016;6:87-92.
96. Nourbakhsh B, Graves J, Casper TC, Lulu S, Waldman A, Belman A, Greenberg B, Weinstock-Guttman B, Aen G, Tillema JM, Hart J, Ness J, Rubin J, Krupp L, Gorman M, Benson L, Rodriguez M, Chitnis T, Rose J, Barcellos L, Waubant E; Network of Pediatric Multiple Sclerosis Centers. Dietary salt intake and time to relapse in paediatric multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87:1350-3.
97. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 2006;129:606-16.
98. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343:1430-8.
99. Eriksson M, Andersen O, Runmarker B. Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2003;9:260-74.

100. Maciejek Z, Wawrzyniak S. Objawy kliniczne i przebieg choroby. W: Losy J [red.]. Stwardnienie rozsiane. Wyd. 2. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2019, ss. 65–81.
101. Kalincik T, Vivek V, Jokubaitis V, Lechner-Scott J, Trojano M, Izquierdo G, Lugaresi A, Grand'maison F, Hupperts R, Oreja-Guevara C, Bergamaschi R, Iuliano G, Alroughani R, Van Pesch V, Amato MP, Slee M, Verheul F, Fernandez-Bolanos R, Fiol M, Spitaleri DL, Cristiano E, Gray O, Cabrera-Gomez JA, Shaygannejad V, Herbert J, Vucic S, Needham M, Petkovska-Boskova T, Sirbu CA, Duquette P, Girard M, Grammond P, Boz C, Giuliani G, Rio ME, Barnett M, Flechter S, Moore F, Singhal B, Bacile EA, Saladino ML, Shaw C, Skromne E, Poehlau D, Vella N, Spelman T, Liew D, Kilpatrick TJ, Butzkueven H; MSBase Study Group. Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain*. 2013;136:3609-17.
102. Kapica-Topczewska K, Broła W, Fudala M, Tarasiuk J, Chorazy M, Snarska K, Kochanowicz J, Kulakowska A. Prevalence of multiple sclerosis in Poland. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;21:51-5.
103. Broła W, Sobolewski P, Flaga S, Fudala M, Jantarski K. Increasing prevalence and incidence of multiple sclerosis in Poland. *Neurol Neurochir Pol*. 2017;51:82-5.
104. Broła W, Sobolewski P, Flaga S, Fudala M, Szczuchniak W, Stoiński J, Rosołowska A, Wójcik J, Kapica-Topczewska K, Ryglewicz D. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in central Poland, 2010-2014. *BMC Neurol*. 2016;16:134.
105. Potemkowski A. An epidemiologic survey of multiple sclerosis in the Szczecin province in Poland. *Przegl Epidemiol*. 2001;55:331-41.
106. Compston A. Risk factors for multiple sclerosis: race or place? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990;53:821-3.
107. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2002;104:182-91.
108. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol*. 2005;4:281-8.

109. Muto M, Mori M, Sato Y, Uzawa A, Masuda S, Uchida T, Kuwabara S. Current symptomatology in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Eur J Neurol*. 2015;22:299-304.
110. McDonald I, Compston A. The symptoms and signs of multiple sclerosis. W: Compston A, McDonald I, Noseworthy J, Lassmann H, Miller D, Smith K, Wekerle H, Confavreux C [red.]. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Wyd. 4. Churchill Livingstone Elsevier; 2006, ss. 287-346.
111. Miller D, McDonald Ian, Smith K. The diagnosis of multiple sclerosis. W: Compston A, McDonald I, Noseworthy J, Lassmann H, Miller D, Smith K, Wekerle H, Confavreux C, [red.]. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Wyd. 4. Churchill Livingstone Elsevier; 2006, ss. 347-88.
112. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17:162-73.
113. Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2002;346:158-64.
114. Hagemeyer J, Heininen-Brown M, Gabelic T, Guttuso T Jr, Silvestri N, Lichter D, Fugoso LE, Bergsland N, Carl E, Geurts JJ, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R6. Phase white matter signal abnormalities in patients with clinically isolated syndrome and other neurologic disorders. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014;35:1916-23.
115. O'Riordan JI, Losseff NA, Phatouros C, Thompson AJ, Moseley IF, MacManus DG, McDonald WI, Miller DH. Asymptomatic spinal cord lesions in clinically isolated optic nerve, brain stem, and spinal cord syndromes suggestive of demyelination. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;64:353-7.
116. Gass A, Moseley IF, Barker GJ, Jones S, MacManus D, McDonald WI, Miller DH. Lesion discrimination in optic neuritis using high-resolution fat-suppressed fast spin-echo MRI. *Neuroradiology*. 1996;38:317-21.

117. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, Rovira A, Sastre-Garriga J, Tintorè M, Frederiksen JL, Gasperini C, Palace J, Reich DS, Banwell B, Montalban X, Barkhof F; MAGNIMS Study Group. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol.* 2016;15:292-303.
118. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2011;365:2188-97.
119. Filippi M, Rocca MA, Calabrese M, Sormani MP, Rinaldi F, Perini P, Comi G, Gallo P. Intracortical lesions: relevance for new MRI diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;75:1988-94.
120. Calabrese M, De Stefano N, Atzori M, Bernardi V, Mattisi I, Barachino L, Morra A, Rinaldi L, Romualdi C, Perini P, Battistin L, Gallo P. Detection of cortical inflammatory lesions by double inversion recovery magnetic resonance imaging in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2007;64:1416-22.
121. Audoin B, Zaaraoui W, Reuter F, Rico A, Malikova I, Confort-Gouny S, Cozzone PJ, Pelletier J, Ranjeva JP. Atrophy mainly affects the limbic system and the deep grey matter at the first stage of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010;81:690-5.
122. Fisher E, Rudick RA, Cutter G, Baier M, Miller D, Weinstock-Guttman B, Mass MK, Dougherty DS, Simonian NA. Relationship between brain atrophy and disability: an 8-year follow-up study of multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2000;6:373-7.
123. Arrambide G, Rovira A, Sastre-Garriga J, Tur C, Castilló J, Río J, Vidal-Jordana A, Galán I, Rodríguez-Acevedo B, Midaglia L, Nos C, Mulero P, Arévalo MJ, Comabella M, Huerga E, Auger C, Montalban X, Tintore M. Spinal cord lesions: A modest contributor to diagnosis in clinically isolated syndromes but a relevant prognostic factor. *Mult Scler.* 2018;24:301-12.
124. Brownlee WJ. Do spinal cord lesions matter in patients with clinically isolated syndrome and early MS? *Mult Scler.* 2018;24:430-1.
125. Sombekke MH, Wattjes MP, Balk LJ, Nielsen JM, Vrenken H, Uitdehaag BM, Polman CH, Barkhof F. Spinal cord lesions in patients with clinically isolated

- syndrome: a powerful tool in diagnosis and prognosis. *Neurology*. 2013;80:69-75.
126. Losy J, Mehta PD, Wisniewski HM. Identification of IgG subclasses' oligoclonal bands in multiple sclerosis CSF. *Acta Neurol Scand*. 1990;82:4-8.
 127. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84:909-14.
 128. Gabelić T, Radmilović M, Posavec V, Skvorc A, Bošković M, Adamec I, Milivojević I, Barun B, Habek M. Differences in oligoclonal bands and visual evoked potentials in patients with radiologically and clinically isolated syndrome. *Acta Neurol Belg*. 2013;113:13-7.
 129. Rot U, Mesec A. Clinical, MRI, CSF and electrophysiological findings in different stages of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2006;108:271-4.
 130. Pérez-Rico C, Ayuso-Peralta L, Rubio-Pérez L, Roldán-Díaz I, Arévalo-Serrano J, Jiménez-Jurado D, Blanco R. Evaluation of visual, structural and functional factors that predict the development of multiple sclerosis in clinically isolated syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:6127-31.
 131. Lecler A, El Sanharawi I, El Methni J, Gout O, Koskas P, Savatovsky J. Improving Detection of Multiple Sclerosis Lesions in the Posterior Fossa Using an Optimized 3D-FLAIR Sequence at 3T. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2019;40:1170-6.
 132. Maranzano J, Dadar M, Rudko DA, De Nigris D, Elliott C, Gati JS, Morrow SA, Menon RS, Collins DL, Arnold DL, Narayanan S. Comparison of Multiple Sclerosis Cortical Lesion Types Detected by Multicontrast 3T and 7T MRI. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2019;40:1162-9.
 133. Wattjes MP, Harzheim M, Lutterbey GG, Hojati F, Simon B, Schmidt S, Schild HH, Barkhof F. Does high field MRI allow an earlier diagnosis of multiple sclerosis? *J Neurol*. 2008;255:1159-63.
 134. Losy J, Bartosik-Psujek H, Członkowska A, Kurowska K, Maciejek Z, Mirowska-Guzel D, Potemkowski A, Ryglewicz D, Stępień A. Leczenie stwardnienia rozsianego. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Neurologicznego. *Pol. Przegl. Neurol* 2016;12:80-95.

135. Bartosik-Psujek H. Diagnostyka. W: Losy J [red.]. Stwardnienie rozsiane. Wyd. 2. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2019, ss. 83-96.
136. Barnes D, Hughes RA, Morris RW, Wade-Jones O, Brown P, Britton T, Francis DA, Perkin GD, Rudge P, Swash M, Katifi H, Farmer S, Frankel J. Randomised trial of oral and intravenous methylprednisolone in acute relapses of multiple sclerosis. *Lancet*. 1997;349:902-6.
137. Miller DM, Weinstock-Guttman B, Béthoux F, Lee JC, Beck G, Block V, Durelli L, LaMantia L, Barnes D, Sellebjerg F, Rudick RA. A meta-analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations. *Mult Scler*. 2000;6:267-73.
138. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, Simonian NA, Slasor PJ, Sandrock AW. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343:898-904.
139. Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS / MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1993;43:662-7.
140. Filippi M, Wolinsky JS, Comi G; CORAL Study Group. Effects of oral glatiramer acetate on clinical and MRI-monitored disease activity in patients with relapsing multiple sclerosis: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Neurol*. 2006;5:213-20.
141. Chen H, Assmann JC, Krenz A, Rahman M, Grimm M, Karsten CM, Köhl J, Offermanns S, Wettschureck N, Schwaninger M. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. *J Clin Invest*. 2014;124:2188-92.
142. Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord*. 2015;8:20-30.
143. Oh J, O'Connor PW. Teriflunomide for the treatment of multiple sclerosis. *Semin Neurol*. 2013;33:45-55.
144. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, Willmer-Hulme AJ, Dalton CM, Miszkiel KA, O'Connor PW; International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial Group. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2003;348:15-23.

145. Barbin L, Rousseau C, Jousset N, Casey R, Debouverie M, Vukusic S, De Sèze J, Brassat D, Wiertlewski S, Brochet B, Pelletier J, Vermersch P, Edan G, Lebrun-Frenay C, Clavelou P, Thouvenot E, Camdessanché JP, Tourbah A, Stankoff B, Al Khedr A, Cabre P, Papeix C, Berger E, Heinzlef O, Debroucker T, Moreau T, Gout O, Bourre B, Créange A, Labauge P, Magy L, Defer G, Foucher Y, Laplaud DA; CFSEP and OFSEP groups. Comparative efficacy of fingolimod vs natalizumab: a French multicenter observational study. *Neurology*. 2016;86:771-8.
146. Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ. Lysophospholipids-receptor revelations. *Science*. 2001;294:1875-8.
147. Lasek-Bal A, Bartoszek K, Steposz A, Puz P, Bal W, Kazibutowska Z. Efficacy and safety of mitoxantrone use in primary and secondary progressive multiple sclerosis - study site experience based on the therapy of 104 patients. *Int J Neurosci*. 2017;127:859-63.
148. Ferrajoli A, O'Brien S, Keating MJ. Alemtuzumab: a novel monoclonal antibody. *Expert Opin Biol Ther*. 2001;1:1059-65.
149. Cook S, Vermersch P, Comi G, Giovannoni G, Rammohan K, Rieckmann P, Sørensen PS, Hamlett A, Miret M, Weiner J, Vigiotta V, Musch B, Greenberg SJ; CLARITY Study Group. Safety and tolerability of cladribine tablets in multiple sclerosis: the CLARITY (CLAdRIbine Tablets treating multiple sclerosis orally) study. *Mult Scler*. 2011;17:578-93.
150. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, Yin M, Leppert D, Glanzman R, Tinbergen J, Hauser SL. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2011;378:1779-87.
151. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299:1057-61.
152. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155:1151-64.
153. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010;140:845-58.

154. Putheti P, Pettersson A, Soderstrom M, Link H, Huang YM. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol.* 2004;24:155-61.
155. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001;167:1245-53.
156. Lu L, Cantor H. Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* 2008;5:401-6.
157. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schughart L, Schmidt CA, Andreesen R, Mackensen A. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8-double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2005;105:2828-35.
158. Suzuki H, Zhou YW, Kato M, Mak TW, Nakashima I. Normal regulatory alpha / beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med.* 1999;190:1561-72.
159. Monteiro A, Cruto C, Rosado P, Martinho A, Rosado L, Fonseca M, Paiva A. Characterization of circulating gamma-delta T cells in relapsing vs remission multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2018;318:65-71.
160. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 2004;21:589-601.
161. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol.* 2010;185:1993-8.
162. Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, Lupp C, Klein M, Radsak MP, Schmitt E, Bopp T, Schild H. Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol.* 2010;265:91-6.
163. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008;322:271-5.
164. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 2008;180:5916-26.

165. Delgoffe GM, Woo SR, Turnis ME, Gravano DM, Guy C, Overacre AE, Bettini ML, Vogel P, Finkelstein D, Bonnevier J, Workman CJ, Vignali DA. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature*. 2013;501:252-6.
166. Álvarez-Sánchez N, Cruz-Chamorro I, Díaz-Sánchez M, Lardone PJ, Guerrero JM, Carrillo-Vico A. Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients. *Sci Rep*. 2019;9:2302.
167. Eliseeva DD, Zavalishin IA, Bykovskaia SN. Clinical significance of T-regulatory cells in multiple sclerosis. *Zh Nevrol Psikiatr Im S S Korsakova*. 2012;112:29-33.
168. Bjerg L, Brosbøl-Ravnborg A, Tørring C, Dige A, Bundgaard B, Petersen T, Höllsberg P. Altered frequency of T regulatory cells is associated with disability status in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2012;249:76-82.
169. Dhaeze T, Peelen E, Hombrouck A, Peeters L, Van Wijmeersch B, Lemkens N, Lemkens P, Somers V, Lucas S, Broux B, Stinissen P, Hellings N. Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *J Immunol*. 2015;195:832-40.
170. Dalla Libera D, Di Mitri D, Bergami A, Centonze D, Gasperini C, Grasso MG, Galgani S, Martinelli V, Comi G, Avolio C, Martino G, Borsellino G, Sallusto F, Battistini L, Furlan R. T regulatory cells are markers of disease activity in multiple sclerosis patients. *PLoS One*. 2011;6:e21386.
171. Li YF, Zhang SX, Ma XW, Xue YL, Gao C, Li XY, Xu AD. The proportion of peripheral regulatory T cells in patients with Multiple Sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;28:75-80.
172. Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25^{high} T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;144:125-31.
173. Ebrahimimonfared M, Ganji A, Zahedi S, Nourbakhsh P, Ghasami K, Mosayebi G. Characterization of Regulatory T-Cells in Multiple Sclerosis Patients Treated with Interferon Beta-1a. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2018;17:113-8.
174. Schlöder J, Berges C, Luessi F, Jonuleit H. Dimethyl Fumarate Therapy Significantly Improves the Responsiveness of T Cells in Multiple Sclerosis

Patients for Immunoregulation by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18:pii: E271.

175. Trinschek B, Luessi F, Gross CC, Wiendl H, Jonuleit H. Interferon-Beta Therapy of Multiple Sclerosis Patients Improves the Responsiveness of T Cells for Immune Suppression by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16:16330-46.
176. Shariati M, Shaygannejad V, Abbasirad F, Hosseininasab F, Kazemi M, Mirmosayyeb O, Esmaeil N. Silymarin Restores Regulatory T Cells (Tregs) Function in Multiple Sclerosis (MS) Patients In Vitro. *Inflammation.* 2019;42:1203-14.
177. Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: Biology, Design and Application. *Trends Immunol.* 2015;36:763-77.
178. Nowicki A. Interleukina 2 w leczeniu nowotworów, W: Podolak-Dawidziak M, Jędrzejczak W, red.: Cytokiny. Zastosowanie kliniczne, Wrocław 1997, ss. 177-83.
179. Lan RY, Selmi C, Gershwin ME. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *J Autoimmun.* 2008;31:7-12.
180. Hilkens CM, Vermeulen H, van Neerven RJ, Snijdwint FG, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. *Eur J Immunol.* 1995;25:59-63.
181. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med.* 2002;196:851-7.
182. D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol.* 2005;6:1152-9.
183. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004;34:2480-8.
184. Lan RY, Selmi C, Gershwin ME. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *J Autoimmun.* 2008;31:7-12.
185. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188:287-96.

186. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25⁺ T cells by CD4+Foxp3⁺ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol.* 2007;179:3578-87.
187. Hofman FM, von Hanwehr RI, Dinarello CA, Mizel SB, Hinton D, Merrill JE. Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol.* 1986;136:3239-45.
188. Tournier-Lasserre E, Lyoncaen O, Rouillet E, Bach MA. IL-2 receptor and HLA class II antigens on cerebrospinal fluid cells of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Clin Exp Immunol.* 1987;67:581-6.
189. Shi N, Kawano Y, Matsuoka T, Mei F, Ishizu T, Ohyagi Y, Kira J. Increase of CD4+TNF{alpha}+IL-2-T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2009;15:120-3.
190. Philippé J, Debruyne J, Leroux-Roels G, Willems A, Dereuck J. In vitro TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma production as markers of relapses in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 1996;98:286-90.
191. Nicoletti F, Di Marco R, Patti F, Zacccone P, L'Episcopo MR, Reggio E, Xiang M, Nicoletti A, Reggio A. Short-term treatment of relapsing remitting multiple sclerosis patients with interferon (IFN)-beta1B transiently increases the blood levels of interleukin (IL)-6, IL-10 and IFN-gamma without significantly modifying those of IL-1beta, IL-2, IL-4 and tumour necrosis factor-alpha. *Cytokine.* 2000;12:682-7.
192. Espejo C, Brieva L, Ruggiero G, Río J, Montalban X, Martínez-Cáceres EM. IFN-beta treatment modulates the CD28 / CTLA-4-mediated pathway for IL-2 production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2004;10:630-5.
193. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Rünzi A, Kuhlmann T, Posevitz-Fejfar A, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Herich S, Held K, Konjević M, Hartwig M, Dornmair K, Hohlfeld R, Ziemssen T, Klotz L, Meuth SG, Wiendl H. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E2973-82.
194. Rolf L, Muris AH, Theunissen R, Hupperts R, Damoiseaux J, Smolders J. Vitamin D3 supplementation and the IL-2/IL-2R pathway in multiple sclerosis: Attenuation of progressive disturbances? *J Neuroimmunol.* 2018;314:50-7.

195. Kolb WP, Granger GA. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;61:1250-5.
196. Burger D, Lou J, Dayer JM, Grau GE. Both soluble and membrane-associated TNF activate brain microvascular endothelium: relevance to multiple sclerosis. *Mol Psychiatry*. 1997;2:113-6.
197. Kornbluth RS, Edgington TS. Tumor necrosis factor production by human monocytes is a regulated event: induction of TNF-alpha-mediated cellular cytotoxicity by endotoxin. *J Immunol* 1986;137:2585-91.
198. Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol* 2009;65:239-48.
199. Pegoretti V, Baron W, Laman JD, Eisel ULM. Selective Modulation of TNF-TNFRs Signaling: Insights for Multiple Sclerosis Treatment. *Front Immunol*. 2018;9:925.
200. Ribeiro CM, Oliveira SR, Alfieri DF, Flauzino T, Kaimen-Maciel DR, Simão ANC, Maes M, Reiche EMV. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and its soluble receptors are associated with disability, disability progression and clinical forms of multiple sclerosis. *Inflamm Res*. 2019;68:1049-59.
201. Simpson S Jr, Stewart N, van der Mei I, Otahal P, Charlesworth J, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T, Pittas F, Gies P, Taylor B. Stimulated PBMC-produced IFN- γ and TNF- α are associated with altered relapse risk in multiple sclerosis: results from a prospective cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86:200-7.
202. Pitzalis C, Sharrack B, Gray IA, Lee A, Hughes RA. Comparison of the effects of oral versus intravenous methylprednisolone regimens on peripheral blood T lymphocyte adhesion molecule expression, T cell subsets distribution and TNF alpha concentrations in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1997;74:62-8.
203. Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang YM, Kivisäkk P, Link H. Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)- and IL-10-secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN-beta) treatment. *Clin Exp Immunol*. 2000;120:147-53.
204. Gbadamosi J, Buhmann C, Tessmer W, Moench A, Haag F, Heesen C. Effects of mitoxantrone on multiple sclerosis patients' lymphocyte subpopulations and production of immunoglobulin, TNF-alpha and IL-10. *Eur Neurol*. 2003;49:137-41.

205. Fiedler SE, George JD, Love HN, Kim E, Spain R, Bourdette D, Salinthon S. Analysis of IL-6, IL-1 β and TNF- α production in monocytes isolated from multiple sclerosis patients treated with disease modifying drugs. *J Syst Integr Neurosci*. 2017;3.
206. Trenova AG, Slavov GS, Manova MG, Draganaova-Filipova MN, Mateva NG, Miteva LD, Stanilova SA. Alterations in serum levels of IL-17 in contrast to TNF- α correspond to disease-modifying treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77:283-8.
207. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group, The University of British Columbia MS / MRI Analysis Group. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS / MRI Analysis Group. *Neurology*. 1999;53:457-65.
208. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:391-7.
209. Allan SE, Broady R, Gregori S, Himmel ME, Locke N, Roncarolo MG, Bacchetta R, Levings MK. CD4⁺ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev*. 2008;223:391-421.
210. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170:2081-95.
211. Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure*. 1995;3:591-601.
212. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res*. 1999;19:563-73.
213. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008;226:205-18.
214. Buelens C, Willems F, Delvaux A, Piérard G, Delville JP, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1995;25:2668-72.

215. He C, Qiao H, Jiang H, Sun X. The inhibitory role of b7-h4 in antitumor immunity: association with cancer progression and survival. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:695834.
216. Zandee SEJ, O'Connor RA, Mair I, Leech MD, Williams A, Anderton SM. IL-10-producing, ST2-expressing Foxp3⁺ T cells in multiple sclerosis brain lesions. *Immunol Cell Biol*. 2017;95:484-90.
217. Martinez-Forero I, Garcia-Munoz R, Martinez-Pasamar S, Inoges S, Lopez-Diaz de Cerio A, Palacios R, Sepulcre J, Moreno B, Gonzalez Z, Fernandez-Diez B, Melero I, Bendandi M, Villoslada P. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2008;38:576-86.
218. Soldan SS, Alvarez Retuerto AI, Sicotte NL, Voskuhl RR. Dysregulation of IL-10 and IL-12p40 in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2004;146:209-15.
219. Hirotani M, Niino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Yabe I, Hamada S, Tajima Y, Sasaki H. Decreased IL-10 production mediated by Toll-like receptor 9 in B cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010;221:95-100.
220. Luomala M, Lehtimäki T, Huhtala H, Ukkonen M, Koivula T, Hurme M, Elovaara I. Promoter polymorphism of IL-10 and severity of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2003;108:396-400.
221. 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;88:1106-12.
222. Farsani ZS, Behmanesh M, Sahraian MA. Interleukin-10 but not transforming growth factor- β 1 gene expression is up-regulated by vitamin D treatment in multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci*. 2015;350:18-23.
223. Blumenfeld S, Staun-Ram E, Miller A. Fingolimod therapy modulates circulating B cell composition, increases B regulatory subsets and production of IL-10 and TGF β in patients with Multiple Sclerosis. *J Autoimmun*. 2016;70:40-51.
224. Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Evangelopoulos ME, Kararizou E, Koutsis G, Zoga M, Dimitrakopoulos A, Tsoutsou A, Sfingos C. Effect of treatment with methylprednisolone on the serum levels of IL-12, IL-10 and CCL2 chemokine in patients with multiple sclerosis in relapse. *Clin Neurol Neurosurg*. 2008;110:992-6.

225. Huang YM, Adikari S, Båve U, Sanna A, Alm G. Multiple sclerosis: interferon-beta induces CD123(+)BDCA2- dendritic cells that produce IL-6 and IL-10 and have no enhanced type I interferon production. *J Neuroimmunol.* 2005;158:204-12.
226. Meoli EM, Oh U, Grant CW, Jacobson S. TGF- β signaling is altered in the peripheral blood of subjects with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2011;230:164-8.
227. Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA, Sporn MB. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Fed Proc.* 1983;42:2621-6.
228. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12:325-38.
229. Shirvani-Farsani Z, Behmanesh M, Mohammadi SM, Naser Moghadasi A. Vitamin D levels in multiple sclerosis patients: Association with TGF- β 2, TGF- β RI, and TGF- β RII expression. *Life Sci.* 2015;134:63-7.
230. Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79:5312-6.
231. Seyedin SM, Segarini PR, Rosen DM, Thompson AY, Bentz H, Graycar J. Cartilage-inducing factor-B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1987;262:1946-9.
232. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ, Moses HL, Chen EY. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J.* 1988;7:3737-43.
233. Roberts AB, Kim SJ, Noma T, Glick AB, Lafyatis R, Lechleider R, Jakowlew SB, Geiser A, O'Reilly MA, Danielpour D et al. Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression. *Ciba Found Symp.* 1991;157:7-15.
234. Stepień-Wyrobiec O, Hrycek A, Wyrobiec G. Transforming growth factor beta (TGF-beta): its structure, function, and role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008;62:688-93.
235. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvint D, Annunziata N, Doetschman T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992;359:693-9.
236. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:616-30.

237. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*. 1986;163:1037-50.
238. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA Jr. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1987;166:991-8.
239. Huss DJ, Winger RC, Cox GM, Guerau-de-Arellano M, Yang Y, Racke MK, Lovett-Racke AE. TGF- β signaling via Smad4 drives IL-10 production in effector Th1 cells and reduces T-cell trafficking in EAE. *Eur J Immunol*. 2011;41:2987-96.
240. Eisenstein EM, Williams CB. The T(reg) / Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatr Res*. 2009;65:26R-31R.
241. Lee PW, Severin ME, Lovett-Racke AE. TGF- β regulation of encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2017;47:446-53.
242. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. 2008;134:392-404.
243. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 2010;32:642-53.
244. Lee PW, Yang Y, Racke MK, Lovett-Racke AE. Analysis of TGF- β 1 and TGF- β 3 as regulators of encephalitogenic Th17 cells: Implications for multiple sclerosis. *Brain Behav Immun*. 2015;46:44-9.
245. Roes J, Choi BK, Cazac BB. Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7241-6.
246. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest*. 2005;115:66-75.
247. Weinshenker BG, Hebrink D, Kantarci OH, Schaefer-Klein J, Atkinson E, Schaid D, McMurray CM. Genetic variation in the transforming growth factor beta1 gene in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2001;120:138-45.

248. McWilliam O, Sellebjerg F, Marquart HV, von Essen MR. B cells from patients with multiple sclerosis have a pathogenic phenotype and increased LT α and TGF β 1 response. *J Neuroimmunol.* 2018;324:157-64.
249. Zilkha-Falb R, Gurevich M, Hayardeny L, Achiron A. The role of laquinimod in modulation of the immune response in relapsing-remitting multiple sclerosis: Lessons from gene expression signatures. *J Neuroimmunol.* 2015;283:11-6.
250. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol.* 1983;13:227-31.
251. Gallo P, Piccinno MG, Pagni S, Argentiero V, Giometto B, Bozza F, Tavalato B. Immune activation in multiple sclerosis: study of IL-2, sIL-2R, and gamma-IFN levels in serum and cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci.* 1989;92:9-15.
252. Tomioka R, Hamaguchi K, Ohno R, Hosokawa T, Kaneko A, Tsuji T, Kurihara K. Elevated interleukin 2 levels in serum and cerebrospinal fluid of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;650:347-50.
253. Ott M, Demisch L, Engelhardt W, Fischer PA. Interleukin-2, soluble interleukin-2-receptor, neopterin, L-tryptophan and beta 2-microglobulin levels in CSF and serum of patients with relapsing-remitting or chronic-progressive multiple sclerosis. *J Neurol.* 1993;241:108-14.
254. Salmaggi A, Dufour A, Eoli M, Corsini E, La Mantia L, Massa G, Nespolo A, Milanese C. Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: further evidence for decreased systemic immunosuppression? *J Neurol.* 1996;243:13-7.
255. McDonald WI, Halliday AM. Diagnosis and classification of multiple sclerosis. *Br Med Bull.* 1977;33:4-9.
256. Hautecoeur P, Forzy G, Gallois P, Demirbilek V, Feugas O. Variations of IL2, IL6, TNF alpha plasmatic levels in relapsing remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg.* 1997;97:240-3.
257. Drulović J, Mostarica-Stojković M, Lević Z, Stojšavljević N, Pravica V, Mesáros S. Interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 1997;147:145-50.
258. Nicoletti F, Di Marco R, Patti F, Reggio E, Nicoletti A, Zaccane P, Stivala F, Meroni PL, Reggio A. Blood levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-

- beta1) are elevated in both relapsing remitting and chronic progressive multiple sclerosis (MS) patients and are further augmented by treatment with interferon-beta 1b (IFN-beta1b). *Clin Exp Immunol*. 1998;113:96-9.
259. Carrieri PB, Provitera V, De Rosa T, Tartaglia G, Gorga F, Perrella O. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1998;20:373-82.
 260. Vlakić A, Horvat G, Vukadin S, Sucić Z, Simaga S. Cerebrospinal fluid and serum protein levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) interleukin-6 (IL-6) and soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R gp80) in multiple sclerosis patients. *Cytokine*. 2002;20:86-9.
 261. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti A, Caggiula M, Mirabella M, Tonalì PA, Batocchi AP. IL17 and IFNgamma production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine*. 2008;44:22-5.
 262. 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;58:840-6.
 263. Uysal S, Meriç Yılmaz F, Boğdaycioğlu N, Mungan Öztürk S, Ak F. Increased serum levels of some inflammatory markers in patients with multiple sclerosis. *Minerva Med*. 2014;105:229-35.
 264. Pasquali L, Lucchesi C, Pecori C, Metelli MR, Pellegrini S, Iudice A, Bonuccelli U. A clinical and laboratory study evaluating the profile of cytokine levels in relapsing remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2015;278:53-9.
 265. 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.
 266. Witkowska AM, Socha K, Kochanowicz J, Karpińska E, Jakoniuk M, Zujko ME, Wilkiel M, Borawska MH, Mariak Z. Serum Levels of Biomarkers of Immune Activation and Associations With Neurological Impairment in Relapsing-

- Relapsing Multiple Sclerosis Patients During Remission. *Biol Res Nurs*. 2016;18:113-9.
267. Arellano G, Acuña E, Reyes LI, Ottum PA, De Sarno P, Villarroel L, Ciampi E, Uribe-San Martín R, Cárcamo C, Naves R. Th1 and Th17 Cells and Associated Cytokines Discriminate among Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis Phenotypes. *Front Immunol*. 2017;8:753.
 268. Trenova AG, Slavov GS, Draganova-Filipova MN, Mateva NG, Manova MG, Miteva LD, Stanilova SA. Circulating levels of interleukin-17A, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-18, interleukin-10, and cognitive performance of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Res*. 2018;40:153-9.
 269. Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Vaghi L, Castellazzi M, Marzola A, Govoni V, Paolino E, Tola MR, Granieri E, Baricordi OR. Presence of detectable levels of soluble HLA-G molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble HLA-I and IL-10 concentrations and MRI findings. *J Neuroimmunol*. 2003;142:149-58.
 270. Kraus J, Kuehne BS, Tofighi J, Frielinghaus P, Stolz E, Blaes F, Laske C, Engelhardt B, Traupe H, Kaps M, Oschmann P. Serum cytokine levels do not correlate with disease activity and severity assessed by brain MRI in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2002;105:300-8.
 271. Deloire MS, Salort E, Bonnet M, Arimone Y, Boudineau M, Amieva H, Barroso B, Ouallet JC, Pachai C, Galliaud E, Petry KG, Dousset V, Fabrigoule C, Brochet B. Cognitive impairment as marker of diffuse brain abnormalities in early relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:519-26.
 272. Berard JA, Smith AM, Walker LAS. A Longitudinal Evaluation of Cognitive Fatigue on a Task of Sustained Attention in Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Int J MS Care*. 2018;20:55-61.
 273. Rashid W, Davies GR, Chard DT, Griffin CM, Altmann DR, Gordon R, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Upper cervical cord area in early relapsing-remitting multiple sclerosis: cross-sectional study of factors influencing cord size. *J Magn Reson Imaging*. 2006;23:473-6.
 274. Jongen PJ, Wesnes K, van Geel B, Pop P, Schrijver H, Visser LH, Gilhuis HJ, Sinnige LG, Brands AM. Does Self-Efficacy Affect Cognitive Performance in

Persons with Clinically Isolated Syndrome and Early Relapsing Remitting Multiple Sclerosis? *Mult Scler Int.* 2015;2015:960282.

275. Horakova D, Dwyer MG, Havrdova E, Cox JL, Dolezal O, Bergsland N, Rimes B, Seidl Z, Vaneckova M, Zivadinov R. Gray matter atrophy and disability progression in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis: a 5-year longitudinal study. *J Neurol Sci.* 2009;282:112-9.
276. Bellmann-Strobl J, Stiepani H, Wuerfel J, Bohner G, Paul F, Warmuth C, Aktas O, Wandinger KP, Zipp F, Klingebiel R. MR spectroscopy (MRS) and magnetisation transfer imaging (MTI), lesion load and clinical scores in early relapsing remitting multiple sclerosis: a combined cross-sectional and longitudinal study. *Eur Radiol.* 2009;19:2066-74.
277. Rudick RA, Ransohoff RM. Cytokine secretion by multiple sclerosis monocytes. Relationship to disease activity. *Arch Neurol.* 1992;49:265-70.
278. Martino G, Consiglio A, Franciotta DM, Corti A, Filippi M, Vandenberg K, Sciacca FL, Comi G, Grimaldi LM. Tumor necrosis factor alpha and its receptors in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1997;152:51-61.
279. Sivieri S, Ferrarini AM, Gallo P. Multiple sclerosis: IL-2 and sIL-2R levels in cerebrospinal fluid and serum. Review of literature and critical analysis of ELISA pitfalls. *Mult Scler.* 1998;4:7-11.
280. Kalinowska-Łyszczarz A, Szczuciński A, Pawlak MA, Losy J. Clinical study on CXCL13, CCL17, CCL20 and IL-17 as immune cell migration navigators in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2011;300:81-5.
281. Szczuciński A, Losy J. CCL5, CXCL10 and CXCL11 chemokines in patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation.* 2011;18:67-72.

Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 677/17

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 22 czerwca 2017 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu (promotor):

prof. dr hab. Jacek Losy

Miejsce prowadzenia badań:

**Zakład Neuroimmunologii Klinicznej Katedry Neurologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz:

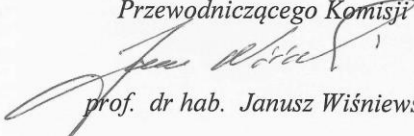
lek. med. Tomasz Grzegorski

Temat badań:

„Analiza stężeń wybranych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych w surowicy i płynie mózgowo rdzeniowym u pacjentów z klinicznie izolowanym zespołem (CIS)”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

**Zastępca
Przewodniczącego Komisji**


prof. dr hab. Janusz Wiśniewski

Zgoda Komisji Bioetycznej (aneks)



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 90/19

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2005 r. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r. Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 10 stycznia 2019 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu (promotor): prof. dr hab. Jacek Losy

Miejsce prowadzenia badań:

**Zakład Neuroimmunologii Klinicznej Katedry Neurologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: lek. Tomasz Grzegorski

Temat badań:

„Analiza stężeń wybranych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych w surowicy i płynie mózgowo rdzeniowym u pacjentów z postacią rzutowo-remisyjną stwardnienia rozsianego w fazie wczesnej”.

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu poprawek wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na włączeniu do badania trzech grup badanych oraz preredagowaniu tematu na powyższy, zgodnie z Aneks nr 1 z dnia 10.01.2019r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 677/17 z dnia 22.06.2017r.

Metodyka badania pozostaje bez zmian.

Do dokumentacji badania dołączono Formularz informacji i zgody pacjenta nr 2 z dnia 18.12.2018r., oświadczenie dotyczące przetwarzania danych osobowych nr 2 z dnia 18.12.2018, oświadczenie dot. przyjęcia warunków ubezpieczenia nr 2 z dnia 18.12.2018r. oraz zobowiązanie do uzyskania zgody pacjenta na udział w badaniu nr 2 z dnia 18.12.2018r.

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Charakterystyka pacjentów ze stężeniem IL-2 w surowicy powyżej progu czułości metody ELISA

L.P.	Grupa	Płeć	Wiek	Obraz kliniczny	Rzut [dni]	Choroby przewlekłe	Przyjmowane leki	Odchylenia w badaniu neurologicznym	Indeks IgG	Prążki oligoklonalne w PMR	Stężenie IL-2 [pg/ml]		Indeks IL-2	Aktywność w MR
											w surowicy	w PMR		
1	RRMS-rzut	K	31	Wstępujące parestezje i niedowład kończyn dolnych	7	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Niedowład kończyn dolnych, wzmożone odruchy kolanowe, cięte zaburzenia czucia	0,99	Obecne	0,07	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Tak
2	RRMS-rzut	K	19	Obwodowe porażenie lewego nerwu VII. Od około roku osłabienie, bóle głowy, zaburzenia równowagi	21	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Obwodowe porażenie lewego nerwu VII, dysdiadochokineza lewostronna, niedoczulica lewostronna	0,94	Obecne	0,40	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie
3	RRMS-rzut	K	25	Zaburzenia czucia	3	Migrenowe bóle głowy	Bez leków na stałe	Zaburzenia czucia	0,61	Obecne	0,10	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie
4	RRMS-remisja	K	29	Pozagałkowe zapalenie nerwu wzrokowego oka lewego w wywiadzie	Nie dotyczy	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Zaburzenia widzenia oka lewego	0,57	Nieobecne	0,18	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Brak danych (brak aktualnego badania MRI)
5	RRMS-remisja	M	27	W wywiadzie epizod zaburzeń mowy	Nie dotyczy	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Bez odchyłeń	0,72	Obecne	0,36	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie
6	RRMS-remisja	K	24	W wywiadzie epizod niedowładu i parestezji kończyn dolnych	Nie dotyczy	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Bez odchyłeń	0,76	Obecne	0,22	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Tak
7	RRMS-remisja	K	38	W wywiadzie pozagałkowe zapalenie nerwu wzrokowego lewego	Nie dotyczy	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Bez odchyłeń	1,2	Obecne	0,06	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie
8	Grupa kontrolna	M	22	Ból głowy	Nie dotyczy	Nadciśnienie tętnicze	Telmisartan, lacydypina, indapamid	Bez odchyłeń	1,31	Nieobecne	0,04	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie dotyczy
9	Grupa kontrolna	K	38	Ból głowy	Nie dotyczy	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Bez odchyłeń	0,73	Nieobecne	0,04	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie dotyczy
10	Grupa kontrolna	K	34	Zmiany hiperintensywne OUN, bóle głowy	Nie dotyczy	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Bez odchyłeń	0,68	Nieobecne	0,15	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie dotyczy
11	Grupa kontrolna	M	52	Podejrzenie procesu demielinizacyjnego	Nie dotyczy	Operacja dyskopatii L-S w wywiadzie	Bez leków na stałe	Bez odchyłeń	0,5	Nieobecne	0,09	0,01	10,35	Nie dotyczy
12	Grupa kontrolna	K	48	Ból głowy	Nie dotyczy	Migrena, hiperprolaktynemia	Bez leków na stałe	Bez odchylen	0,57	Nieobecne	0,07	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie dotyczy
13	Grupa kontrolna	K	18	Parestezje lewej kończyny górnej	Nie dotyczy	Bez chorób przewlekłych	Antykoncepcja hormonalna	Bez odchyłeń	0,53	Nieobecne	0,06	Poniżej progu czułości metody ELISA	Brak danych*	Nie dotyczy
14	Grupa kontrolna	K	26	Zmiany hiperintensywne OUN	Nie dotyczy	Zaburzenia lękowe	Lewetiracetam	Bez odchyłeń	0,49	Nieobecne	0,27	0,04	33,99	Nie dotyczy

K – kobieta

M – mężczyzna

* Stężenie w PMR poniżej progu czułości metody ELISA

A. Charakterystyka pacjentów ze stężeniem IL-2 w PMR powyżej progu czułości metody ELISA

L.P.	Grupa	Płeć	Wiek	Obraz kliniczny	Rzut [dni]	Choroby przewlekłe	Przyjmowane leki	Odchylenia w badaniu neurologicznym	Indeks IgG	Prążki oligoklonalne w PMR	Stężenie IL-2 [pg/ml]		Indeks IL-2	Aktywność w MR
											w surowicy	w PMR		
1	Grupa kontrolna	M	52	Podejrzenie procesu demielinizacyjnego	Nie dotyczy	Operacja dyskopatii L-S w wywiadzie	Bez leków na stałe	Bez odchyień	0,5	Nieobecne	0,09	0,01	10,35	Nie dotyczy
2	Grupa kontrolna	K	26	Zmiany hiperintensywne OUN	Nie dotyczy	Zaburzenia lękowe	Lewetiracetam	Bez odchyień	0,49	Nieobecne	0,27	0,04	33,99	Nie dotyczy

K – kobieta
M – mężczyzna

B. Charakterystyka pacjentów ze stężeniem IL-10 w PMR powyżej progu czułości metody ELISA

L.P.	Grupa	Płeć	Wiek	Obraz kliniczny	Rzut [dni]	Choroby przewlekłe	Przyjmowane leki	Odchylenia w badaniu neurologicznym	Indeks IgG	Prążki oligoklonalne w PMR	Stężenie IL-10 [pg/ml]		Indeks IL-10	Aktywność w MR
											w surowicy	w PMR		
1	RRMS-rzut	K	34	Zaburzenia równowagi, osłabienie czucia w obrębie lewej kończyny dolnej	2	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Drżenie zamiarowe lewej kończyny górnej, obustronnie polikloniczny odruch skokowy. Chód tandemowy niemożliwy.	1,38	Obecne	0,08	0,02	49,92	Tak
2	RRMS-rzut	K	37	Pozagałkowe zapalenie nerwu wzrokowego oka lewego	7	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Oslabienie ostrości wzroku oka lewego	0,59	Obecne	0,08	0,01	23,41	Nie
3	RRMS-rzut	K	19	Obwodowe porażenie n VII po stronie lewej. Od około roku osłabienie, bóle głowy, zaburzenia równowagi	21	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Obwodowe porażenie lewego nerwu VII dysdiadochokineza lewostronna, niedoczulica lewostronna	0,94	Obecne	0,18	0,18	270,83	Nie
4	RRMS-remisja	K	41	Parestezje prawej połowy twarzy, niedowład kończyn prawych, zaburzenia widzenia okiem prawym	Nie dotyczy	Bez chorób przewlekłych	Bez leków na stałe	Niedowład kończyn prawych	1,14	Obecne	0,09	0,16	582,28	Nie

K – kobieta
M – mężczyzna