

Marina Ćurlin

LIKVORSKA DIJAGNOSTIKA U MULTIPLOJ SKLEROZI

NAKLADNIK

Sveučilište u Mostaru



ZA NAKLADNIKA

prof. dr. sc. Zoran Tomić, rektor

UREDNIKA

doc. dr. sc. Marina Ćurlin

RECENZENTICE

prof. dr. sc. Nada Vrkić

prof. dr. sc. Emina Kiseljaković

doc. dr. sc. Ines Vukasović

LEKTURA

Ante Ćurlin, mag. philol. angl. et phil.

KOREKTURA

doc. dr. sc. Josip Šimić

Vladimir Ruf, mag. inf.

NASLOVNA STRANICA

Umjetna inteligencija (DALL-E 3)

GRAFIČKO OBLIKOVANJE I TISAK

PRESSUM, Mostar

ISBN 978-9926-28-064-2

CIP zapis dostupan u COBISS sistemu Nacionalne i univerzitetske biblioteke BiH pod

ID brojem 59519238

Marina Ćurlin

LIKVORSKA DIJAGNOSTIKA U MULTIPLOJ SKLEROZI



Mostar, 2024.

Sadržaj

Predgovor	1
1. UVOD	2
1.1. Anatomija središnjeg živčanog sustava.....	2
1.2. Koroidni pleksus.....	2
1.3. Krvno-moždana i krvno-likvorska barijera	3
1.4. Likvor	5
2. MULTIPLA SKLEROZA.....	9
2.1. Spolna i dobna distribucija, genetska predispozicija i okolišni čimbenici	9
2.2. Patofiziologija.....	10
2.3. Klinička slika	13
3. DIJAGNOSTIKA MULTIPLE SKLEROZE.....	24
3.1. Dijagnoza multiple skleroze.....	24
3.2. Diferencijalna dijagnoza multiple skleroze	25
4. MAGNETNA REZONANCIJA	28
4.1. Osnovni principi magnetne rezonancije	28
4.2. Uloga MR-a kod pacijenata s MS-om	29
5. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA MS-A	36
5.1. Rutinski pregled likvora.....	36
5.2. Očuvanost krvno-likvorske barijere.....	37
5.3. Intratekalna sinteza proteina.....	39
5.4. Matematički model za procjenu očuvanosti KLB i intratekalne sinteze	41
5.5. Dokazivanje oligoklonskih imunoglobulina u likvoru	44
5.6. Slobodni laki lanci imunoglobulina u krvi i likvoru	47
5.7. Povezanost KFLC-a sa MR mozga kod pacijenata sa MS-om	63
5.8. Imunosni odgovor na neurotropne viruse i Boreliju Burgdorferi...	63
5.9. Uloga laboratorija u dijagnostici, predikciji i prognozi multiple skleroze	65
5.10. Biomarkeri u MS-u	66

Predgovor

Povijest likvora i njegovo prvo pojavljivanje u literaturnim zapisima datira iz doba starog Egipta između 3000. i 2500. godina pr. Kr. Po većini autora, Cotugno je 1764. godine dao prvi pravi opis likvora, dok je Quincke izveo prvu dijagnostičku lumbalnu punkciju 1891. godine, čime je utaban put modernim dijagnostičkim postupcima u likvoru.

Danas je analiza likvora jedna od veoma važnih i neizostavnih neuroloških dijagnostičkih metoda i stoga mi je osobno zadovoljstvo vidjeti kako analiza likvora sve više napreduje.

U ovoj knjizi željela sam prikazati aktualna znanja o analizi likvora s osvrtom na neurološku bolest multiplu sklerozu. Knjiga je koncipirana prema poglavljima u kojima su opisani tehnički aspekti analize likvora, te su dati i prikazi i rasprave nalaza likvora u širem kliničkom kontekstu. U knjizi su također opisani dijagnostički kriteriji u multiploj sklerozi, no moram naglasiti kako likvor nudi mnogo izravnije dokaze o ulozi imunologije u patobiokemijskim procesima ove bolesti, te očekujem da ćemo jednog dana znati točne molekularne mehanizme multiple skleroze. Relativna malobrojnost sastojaka u likvoru i njihova niska koncentracija u odnosu na krv predstavljaju određeni metodološki izazov. S druge pak strane upravo niska koncentracija određenih tvari u likvoru u odnosu na krv čine likvor dostupnim za istraživanje novih biomarkera.

Knjiga je prvenstveno namijenjena studentima biomedicinskih znanosti, no iskreno se nadam da će se naći i u rukama kliničara i analitičara kojima je povjerena analiza ove dragocjene biološke tekućine o kojoj ćemo još dosta toga trebati naučiti, istražiti, te primijeniti u kliničkoj praksi.

Nadam se da će korisnici knjige proširiti svoja znanja kako u kliničkom radu tako i u saznanjima o analizi likvora u dijagnozi multiple skleroze.

Na kraju, od srca se zahvaljujem obitelji na bezrezervnoj podršci, strpljenju i ljubavi, jer bez njih ova knjiga ne bi danas bila u vašim rukama.

Također, veliko hvala recenzentima koji su svojim stručnim savjetima, smjernicama i sugestijama pomogli da knjiga Likvorska dijagnostika u multiploj sklerozi ima svoj doprinos u vašem budućem radu.

Marina Čurlin

1. UVOD

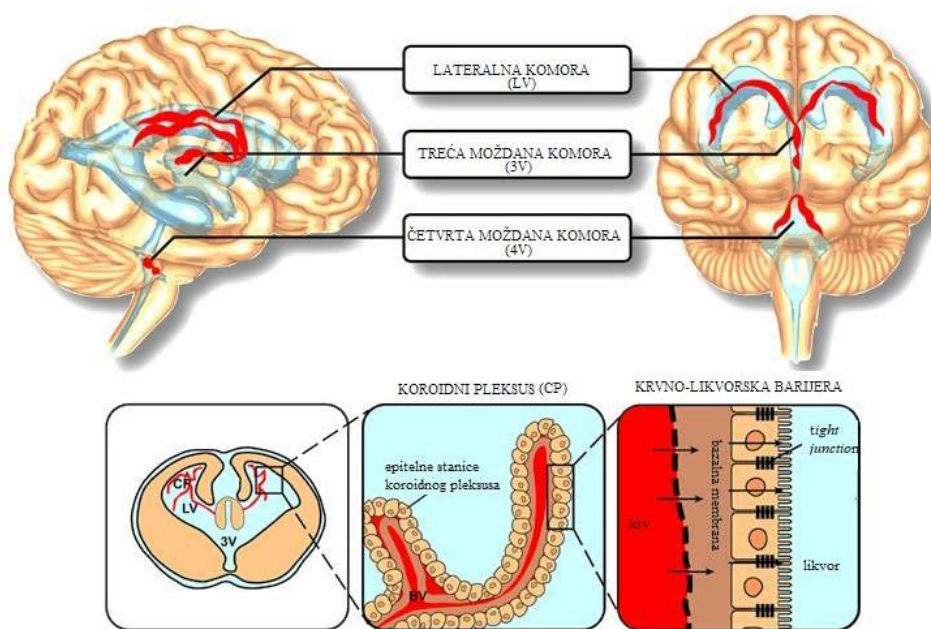
1.1. Anatomija središnjeg živčanog sustava

Središnji živčani sustav (SŽS) je najsloženiji organ ljudskog tijela koji se sastoji od mozga i kralježničke moždine. Mozak je izuzetno složen u svojim različitim anatomskim regijama te vrlo osjetljiv i na male žarišne ozljede koje mogu dovesti do potpunog ispada određene funkcije kao što su govor, vid, ravnoteža i motorika. SŽS je zaštićen čvrstim koštanim oklopom, vezivnim ovojnica (pia mater, arachnoidea mater, dura mater), likvorom i serijom anatomskih i funkcionalnih barijera. Likvor (CSF, engl. *cerebrospinal fluid*) pruža mehaničku zaštitu mekom moždanom tkivu i služi očuvanju njegove homeostaze. Specijalizirane stanice koje tvore sustav krvno-moždane barijere (KMB) i krvno-likvorske barijere (KLB) odvajaju SŽS od periferije.

1.2. Koroidni pleksus

Postoje četiri moždane komore od kojih su prva i druga smještene lateralno, treća razdvaja međumozak, a četvrta je šupljina između malog mozga i moždanog debla koji povezuje mali mozak s kralježničkom moždinom. Unutar svake moždane komore nalazi se koroidni pleksus (lat. *plexus choroideus*) (Slika 1-1). Koroidni pleksus je splet krvnih žila koji je prekriven tankim slojem epitelnih stanica. Koroidni pleksusi smješteni u lateralnim komorama te u krovu treće i četvrte moždane komore, procesima sekrecije i filtracije stvaraju 70 % likvora.

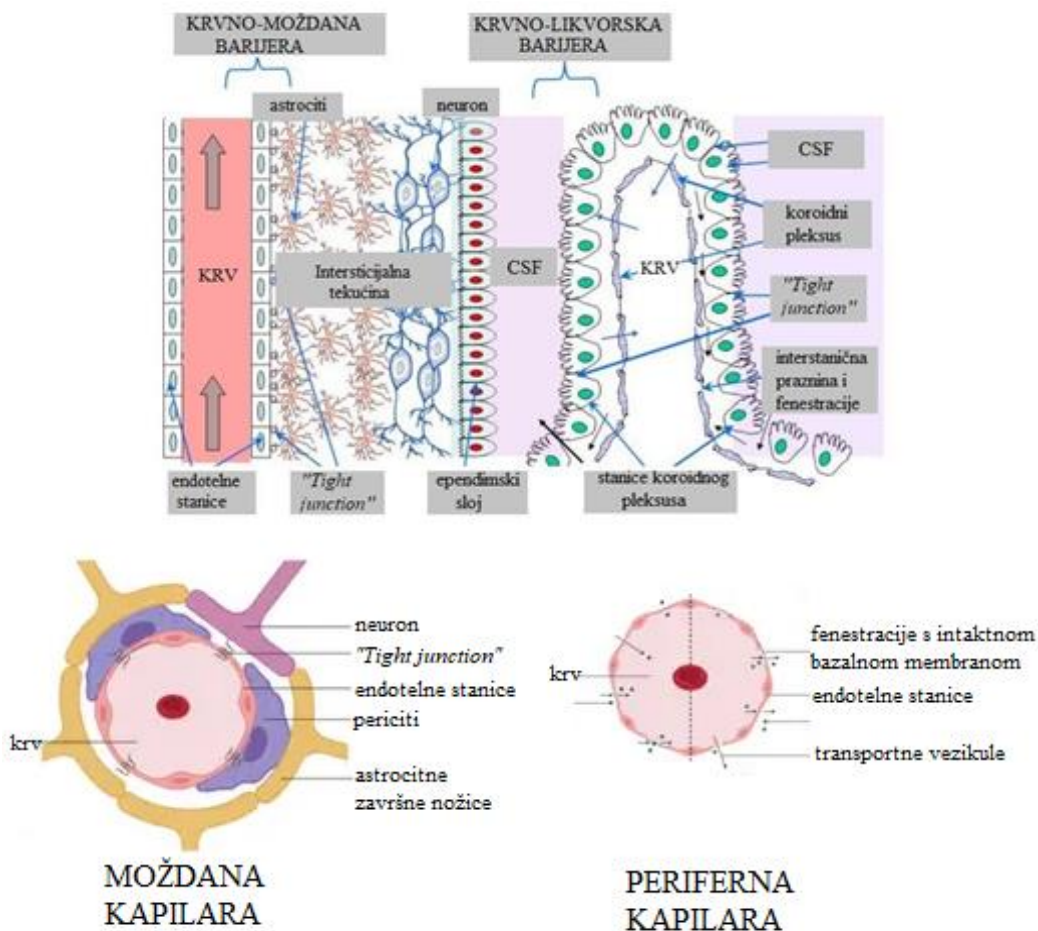
Lučenje tekućine iz koroidnog pleksusa ovisi o aktivnom prijenosu natrijevih iona kroz epitelne stanice koje oblažu vanjsku površinu pleksusa. Natrijevi ioni za sobom vuku veliku količinu kloridnih iona jer pozitivni naboj natrijevih iona privlači negativni naboj kloridnih iona, što povećava količinu osmotski aktivnog natrijevog klorida u likvoru. Zbog stvorenog osmotskog gradijenta između krvi i likvora, dolazi do pasivnog ulaska vode u likvorske prostore. Osim što koroidno epitelne stanice proizvode likvor, one su ujedno i krvno-likvorska barijera.



Slika 1-1. Prikaz koroidnog pleksusa prilagođeno prema Liddelow SA. *Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. Front Neurosci* 2015; (9); DOI:10.3389/fnins.2015.00032

1.3. Krvno-moždana i krvno-likvorska barijera

Barijere reguliraju ravnotežu između različitih odjeljaka SŽS-a. Sastavljene su od niza regulatornih površina između krvi iz cirkulacije i tkiva SŽS-a i/ili likvora. Sastav likvora nadziru procesi koji omogućuju izmjenu tvari između mozga, krvi i likvora, a najvažniju ulogu u tome imaju krvno- moždana (KMB) i krvno-likvorska barijera (KLB) (Slika 2-1). KMB i KLB su veoma propusne za vodu, ugljikov dioksid, kisik i većinu tvari topljivih u lipidima. Slabo su propusne za elektrolite poput natrija, kalija i klorida, a gotovo posve nepropusne za plazmatske proteine i većinu velikih organskih molekula netopljivih u mastima. KMB čine endotelne stanice moždanih kapilara koje su jedna s drugom usko povezane čvrstim spojištima, pa među njima nema mnogo pukotinastih pora kao u većini ostalih kapilara u tijelu. Čvrsta spojišta (engl. *tight junctions*) među endotelnim stanicama podržavaju završne nožice (engl. *end feet*) astrocita. Iz ovakve strukture endotelnih stanica moždanih kapilara proizlazi i njihova osnovna funkcionalna karakteristika koja podrazumijeva izrazito nizak unutarstanični prolaz makromolekula, staničnih elemenata, ali i različitih patogenih klica.



Slika 1-2. Prikaz KMB-a i KLB-a; prilagođeno prema Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, Fuente J, Grazu V et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspective on tracking and neuroimaging. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010; 7(1):3, i prema: Verheggen ICM, de Jong JJA, van Bortel MPJ, Postma AA, Verhey FRJ, Jansen JFA et al. Permeability of the windows of the brain: feasibility of dynamic contrast-enhanced MRI of the circumventricular organs. *Fluids Barriers CNS*. 2020;17(1):66. DOI: 10.1186/s12987-020-00228-x.

KMB čini čvrsta veza koja spaja rubove endotelnih stanica moždanih kapilara bez fenestracija i s vrlo malim brojem citoplazmatskih vezikula. Endotelne stanice ojačane su pericitima i bazalnom membranom. Završne nožice astrocita pokrivaju abluminalnu površinu bazalne membrane i samim tim podržavaju čvrstu vezu među endotelnim stanicama. Osnovu KLB-a čini čvrsti spoj koji spaja apikalne dijelove epitelnih stanica koroidnog spleta. Koroidni splet ima fenestrirane kapilare. S obzirom da tvari iz krvi prolaze kroz fenestrirane endotelne stanice kapilara u koroidnom spletu, KLB u epitelu koroidnog spleta ima važnu ulogu u kontroli ulaska tvari iz krvi u likvor. Za razliku od moždanih kapilara, endotelne stanice kapilara koroidnog spleta su povezane slabijim vezama. KMB - krvno-moždana barijera; KLB - krvno-likvorska barijera.

Na određenim mjestima nabori meke moždane opne *pia mater* strše u moždane komore i tvore koroidne spletove. Vezivno tkivo *pia mater* prekriveno je jednoslojnim kubičnim epitelom, podrijetlom iz ependimskih stanica koje oblažu površinu moždanih komora. Svojim apikalnim dijelom koroidne stanice su spojene čvrstim spojevima i time čine morfološku osnovu KLB-a. Čvrsti spoj koji spaja rubove endotelnih stanica dubokih moždanih kapilara i apikalna područja koroidnog epitela čine morfološku osnovu KMB-a odnosno KLB-a. Upravo ove dvije barijere imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze u mozgu.

Ako je došlo do poremećaja barijera, smanjena je filtracijska selektivnost zbog čega raste koncentracija ukupnih proteina u likvoru. Albuminski kvocijent (koncentracija albumina u likvoru/koncentracija albumina u serumu) je mjera očuvanosti krvno-likvorske barijere. Na temelju albuminskog kvocijenta može se izračunati količina imunoglobulina (Ig, eng. *immunoglobulin*) koja se sintetizira intratekalno.

1.4. Likvor

Likvor je bistra bezbojna tekućina koja ispunjava moždane komore, središnji kanal kralježničke moždine, te prostore između *pia mater* i *arachnoidea mater* (subarahnoidni prostor). Više od dvije trećine likvora nastaje lučenjem iz koroidnog plexusa u četvrtim komorama (uglavnom dvjema lateralnim), dok ostatak likvora potječe od izvanstanične tekućine mozga koja difuzijom ulazi u likvorske prostore kroz ependim, pija-glijalnu membranu na površini mozga i kroz perivaskularne prostore. Kroz tri otvora četvrte moždane komore većina likvora dopijeva u veliku cisternu (*cisterna magna*), koja je povezana sa subarahnoidnim prostorom koji okružuje cijeli mozak i kralježničku moždinu. Najveći dio likvora se apsorbira preko arahnoidnih resica, koje tvore arahnoidne granulacije, u venske sinuse ovojnice *dura mater*.

Likvor je bistra, bezbojna tekućina koja se neprekidno stvara i reapsorbira pa se cjelokupni volumen likvora izmijeni 3-4 puta tijekom 24 sata. Ukupni volumen likvora u odraslih osoba iznosi između 140 i 150 mL. U moždanim komorama se nalazi oko 30-40 mL, 30 mL oko kralježničke moždine te 70-80 mL u subarahnoidnom prostoru oko mozga. Likvor i mozak imaju približno istu gustoću, pa se smatra da mozak jednostavno lebdi u

tekućini. Najvažnija zadaća likvora je da štiti mozak od krutog prostora. Osim mehaničke zaštite koju pruža mekom moždanom tkivu, likvor ima važnu ulogu i u raznošenju različitih bioloških aktivnih spojeva koji imaju zadaću kemijskih glasnika. Svojstva likvora su sljedeća: osmotski tlak je približno jednak onomu plazmi, koncentracija natrijevih iona također je približno jednaka onoj u plazmi, koncentracija klorida je oko 15 % veća nego u plazmi, kalija oko 40 % manja, a glukoze oko 30 % manja. Koncentracije nekih važnih sastojaka u likvoru nisu iste kao u izvanstaničnoj tekućini drugdje u tijelu. Mnoge velike molekule teško prelaze iz krvi u likvor ili u međustaničnu tekućinu mozga zbog KMB i KLB. Između likvora i izvanstanične tekućine moždanog tkiva nema barijera pa tvari slobodno difundiraju između tih odjeljaka. Zbog toga likvor može poslužiti kao „ogledalo“ SŽS-a.

Upravo je održavanje stabilnog kemijskog sastava likvora i izvanstanične tekućine mozga od najvećeg značaja za funkcioniranje SŽS-a. Sustavi KMB-a i KLB-a u tome imaju značajnu ulogu jer nadziru i ograničavaju ulazak različitih tvari iz krvi u SŽS, ali i obratno.

Likvorska dijagnostika se počela razvijati nakon što je Quincke 1891. godine uveo lumbalnu punkciju koja se i danas izvodi. Normalni likvor je gotovo acelularna tekućina koju čini uglavnom voda (99 %), ali također sadrži puno soli i malu količinu proteina. Po svom kemijskom sastavu sličan je serumu, ali se koncentracije pojedinih tvari uvelike razlikuju, kao što su koncentracije proteina i ostalih makromolekula. Iako su koncentracije ukupnih proteina u likvoru vrlo niske u odnosu na serum (od 200-300 puta niže), što je posljedica otežanog prolaza makromolekula iz krvi kroz zdravu KMB i KLB, procjenjuje se da je 80 % proteina u likvoru krvnog podrijetla, a 20 % ih se dodatno stvara unutar SŽS-a što predstavlja intratekalnu sintezu. Oko 1-2 % proteina u likvoru čine tzv. nervno-specifični proteini. Ulazak plazmatskih proteina u likvoru kroz sustav barijera ovisi o veličini proteina, odnosno o hidrodinamskom volumenu makromolekula, gdje u većini slučajeva hidrodinamski radijus korelira s molekulskom masom proteina. Stoga kroz zdravu barijeru može proći oko 1 od 200 molekula albumina, odnosno 1 od 3000 molekula imunoglobulina IgM. U početku, likvorska dijagnostika je bila ograničena na morfološke pretrage i ispitivanje proteina, no danas se znatno proširila i nezaobilazna je u dijagnostici i praćenju bolesti SŽS-a. Nagli razvoj osjetljivih i specifičnih analitičkih postupaka proširio je paletu različitih pretraga koje se mogu odrediti u likvoru, međutim pri interpretaciji nalaza uvijek treba uzeti u obzir da je riječ o vrlo dinamičnom sustavu čiji se sadržaj može mijenjati iz sata u sat. Lumbalna punkcija nije bezazlen dijagnostički postupak te moraju postojati čvrste kliničke

indikacije za njezinu primjenu. Upostavljanju dijagnoze, likvorska dijagnostika ponekad ima ključnu ulogu te je nikakve slikovne tehnike kao što su kompjuterska tomografija (CT, engl. *computed tomography*) i magnetna rezonancija (MR, engl. *magnetic resonance imaging*) ne mogu zamijeniti.

Literatura:

1. Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, Fuente J, Grazu V et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspective on tracking and neuroimaging. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010; 7(1):3.
2. Brinar V. Demijelinizacijske bolesti središnjeg živčanog sustava. U: Brinar V i sur. *Neurologija za medicinare*. Zagreb: Medicinska naklada, 2019.
3. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev* 2013; 93:1847-92.
4. Davson H, Segal MB: *Physiology of the CSF and Blood-Brain Barriers*. Boca Raton: CRC Press, 1996.
5. Deeken JF, Loscher W. The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res*. 2007;13:1663-74.
6. Guyton A, Hall J. *Medicinska fiziologija*. 13. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2017. str. 791.
7. Holdgate A, Cuthbert K. Perils and pitfalls of lumbar puncture in the emergency department. *Emergency Medicine*. 2001; 13:351-58.
8. Krstić RV. *Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology*. 1. izdanje. Berlin: Springer; 1991. str. 498.
9. Liddelow SA. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Front Neurosci* 2015; (9); DOI=10.3389/fnins.2015.00032
10. Orešković D, Klarica M. A new look at cerebrospinal fluid movement. *Fluid Barriers CNS*. 2014;11:16.
11. Sanchez AL, Martinez-Bazan C, Gutierrez-Montes C, Criado-Hidalgo E, Pawlak G, Bradley W. On the bulk motion of the cerebrospinal fluid in the spinal canal. *J Fluid Mech*. 2018;841:203-27.
12. Sandberg-Wollheim M, Olsson T. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably

- downplayed by the McDonald criteria 2010: Yes. Multiple Sclerosis Journal. 2013;19(6):714-16.
13. Trbojević-Čepe M, Štraus B. Cerebrospinalna tekućina. U: Čvorišćec D, Čepelak I, urednici. Štrausova medicinska biokemija. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2000. str. 558-88.
 14. Ueno M, Chiba Y, Murakami R, Matsumoto K, Kawauchi M, Fujihara R. Blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in normal and pathological conditions. Brain Tumor Pathol. 2016;33(2):89-96.
 15. Venkatesh B, Scott P, Ziegenfuss M. Cerebrospinal fluid in critical illness. Crit Care Resusc. 2000;2(1):42-54.
 16. Verheggen ICM, de Jong JJA, van Boxtel MPJ, Postma AA, Verhey FRJ, Jansen JFA et. al Permeability of the windows of the brain: feasibility of dynamic contrast-enhanced MRI of the circumventricular organs. Fluids Barriers CNS. 2020;17(1):66. DOI: 10.1186/s12987-020-00228-x.
 17. Vukasović I, Mikula I. Neurološke bolesti. U: Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i suradnici. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. 2. dopunjeno i izmijenjeno izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2018. str. 238-72.
 18. Watson MA, Scott MG. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. Clin Chem 1995;41:343-60.

2. MULTIPLA SKLEROZA

2.1. Spolna i dobna distribucija, genetska predispozicija i okolišni čimbenici

Multipla skleroza (MS, engl. *multiple sclerosis*) je definirana kao kronična, autoimuna, upalna, demijelinizacijska i degenerativna bolest SŽS-a. U prvoj fazi bolesti prevladava demijelinizacijska upala, a u kasnijoj fazi se javlja neurodegeneracija postupnim ireverzibilnim oštećenjem.

Demijelinizacijska upala se očituje oštećenjem mijelinske ovojnice živčanog vlakna, samog aksona, oligodendrocita koji stvaraju mijelinsku ovojnicu. U 70 % bolesnika javlja se u dobi od dvadesete do četrdesete godine života i predstavlja vodeći uzrok onesposobljenosti kod mladih ljudi. Žene obolijevaju češće od muškaraca te se smatra da žene imaju raniji početak bolesti, nižu prevalenciju primarno progresivnog tijeka bolesti i sporiju progresiju invaliditeta od muškaraca. Iako još uvijek nema sigurnih i općeprihvaćenih epidemioloških podataka prevalencije MS-a u svijetu, prevalencija bolesti je u porastu, a uzrok tomu mogu biti i čimbenici vezani za nove dijagnostičke kriterije koji omogućavaju ranije postavljanje dijagnoze. Epidemiološka istraživanja u MS-u ukazuju da bolest nastaje međudjelovanjem genskih i okolišnih čimbenika. Kod genskih čimbenika važna je povezanost MS-a s HLA klase II genima na 6. kromosomu osobito za DR2 (HLA DRB1*1501 i DQB*0602), a pokazan je i utjecaj HLA klase I gena na rizik za MS (HLA-A*0301). Važnost HLA sustava sastoji se u činjenici da klasa I HLA alela (A, B, C) prezentiraju antigene za CD8+ tip T-limfocita, a klasa II HLA alela (DP, DM, DOA, DQ i DR) za CD4+ tip T-limfocita. Obje vrste limfocita, CD8+ i CD4+, uključeni su u patogenezu MS-a. Bez obzira na intenzivna istraživanja, gen odgovoran za nastanak MS-a još uvijek nije utvrđen i najvjerojatnije se radi o poligenskom nasljeđivanju. Rizik za razvoj MS-a ako oba roditelja boluju dosta je visok i iznosi oko 20%, za razliku od samo 2% u slučajevima kad je bolestan samo jedan roditelj. Međutim, MS se ne može protumačiti samo genskom sklonošću, već značajnu ulogu imaju i čimbenici okoline. Okolišni čimbenici koji se dovode u vezu s MS-om su: Epstein-Barrov Virus (EBV), izloženost UV zračenju, vitamin D, pušenje, debljina te povećani unos natrija. Infekcija je jedna od mogućih okolišnih čimbenika koja doprinosi razvoju MS-a, te izlaganje što većem broju infekcija

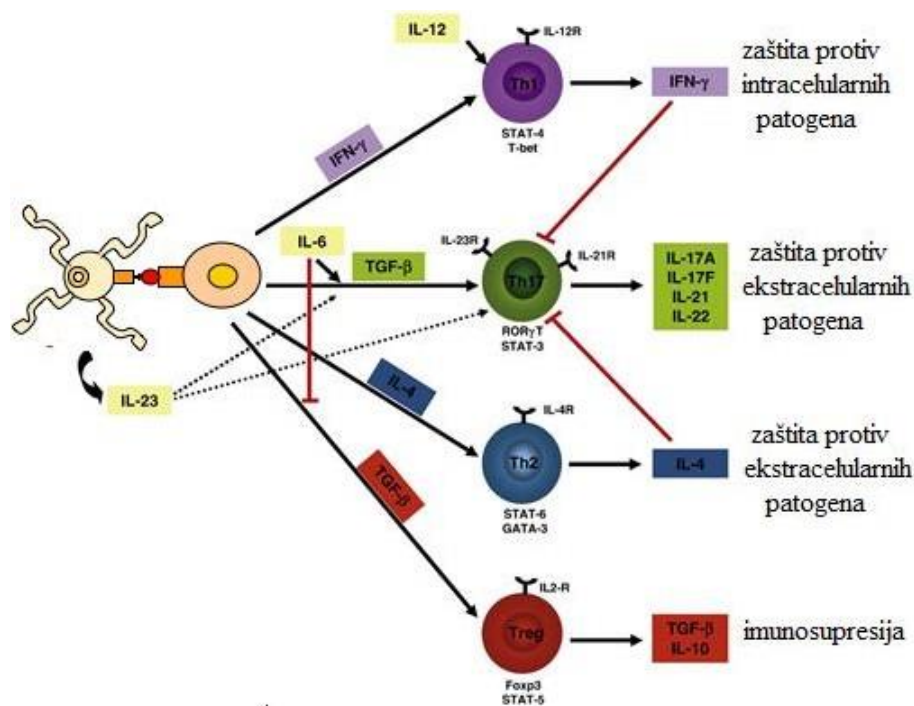
u djetinjstvu djeluje zaštitno na razvoj MS u odrasloj dobi. Mogući uzrok je neurotropni virus koji uzrokuje demijelinizacijska oštećenja. Najbolje istraжена je infekcija EBV-om osobito ako je prvi kontakt s virusom nastupio u ranoj adolescenciji i ako se razvila klinička slika infektivne mononukleoze. Veći postotak bolesnika s MS-om seropozitivan je na EBV, te je seronegativan EBV povezan sa smanjenim rizikom od MS-a. Od ostalih infektivnih čimbenika istražen je humani herpes virus 6 (HHV6), *Herpes Simplex 1* i 2 (HSV tip 1 i tip 2), *Varicella zoster*, citomegalovirus (CMV), *Chlamydia pneumoniae*, ali ni jedan od ovih ispitivanih virusa nije se pokazao uzročnikom MS-a. Osim infekcije, od ostalih okolišnih čimbenika ispitan je i učinak vitamina D na rizik za razvoj MS-a. Epidemiološka istraživanja jasno su pokazala da je incidencija MS-a puno viša u sjevernim zemljama. Stoga visoka koncentracija vitamina D u serumu povezana je s nižim rizikom od razvoja MS-a. Nedavno je objavljeno da nedovoljna koncentracija vitamina D u serumu za vrijeme trudnoće može povećati rizik za razvoj MS-a u potomstvu. Oboljelim od MS-a treba preporučiti uzimanje umjerenih količina vitamina D, a posebno je važno ovo naglasiti trudnicama s MS-om. Također se smatra da vitamin D ima važnu ulogu u pojavljivanju više autoimunih bolesti, pa tako i u MS-u.

2.2. Patofiziologija

Dokazano je da su infiltracija upalnih stanica, demijelinizacija i aksonska degeneracija osnovni patološki mehanizmi koji uzrokuju kliničke manifestacije MS-a. Aktiviranje autoimune upale koja dovodi do oštećenja strukture mijelinske ovojnice živčane stanice na koje se najčešće nadovezuje oštećenje aksona, nastaje djelovanjem još neidentificiranog okolišnog čimbenika na podlozi kompleksne genske osnove. U SŽS-u su upravo oligodendrociti ti koji formiraju mijelin produživanjem i spiralnim omotavanjem izdanka svojih staničnih membrana oko živčane stanice, pa tako živčana stanica sadrži mnogobrojne kratke mijelinizirane segmente koji su odvojeni pukotinama, tj. Ranvierovim čvorovima. Budući da oligodendrocit može formirati i do stotinjak mijeliniziranih segmenata, smrt jednog oligodendrocita ima veće posljedice za provođenje električnog impulsa nego smrt Schwannove stanice.

Na mjestu demijelinizacije živčanog vlakna dokazane su promjene u samoj strukturi aksona, ali i organizaciji molekula na njegovoj površini. Primijećeno je da u ranim aktivnim lezijama dolazi do zadebljanja demijeliniziranih internodalnih segmenata koje se povezuju s povećanom propusnošću aksoleme i modificiranim aksonalnim citoskeletnim proteinima. U kroničnim lezijama dolazi do povećane reekspresije polisijalizirane forme adhezijske molekule neuralnih stanica (PSA-NCAM, engl. *Polysialylated neural cell adhesion molecule*), koja se pojavljuje samo u neuronima u ranom razvoju, a u odraslih je ograničena na mjesta trajne plastičnosti. Postoji mogućnost da ekspresija ove molekule pridonosi slabijoj remijelinizaciji kroničnih plakova zbog prekida interakcije oligodendrocita i aksona. Međutim, u nekim kronično demijeliniziranim aksonima ipak postoji provođenje impulsa, iako je ono usporeno, što upućuje na preraspodjelu, odnosno umnažanje natrijskih kanala uzduž internodalnog prostora poslije demijelinizacije. Odavno je poznata činjenica da oštećenje i gubitak aksona spada u važnu značajku patologije MS-a. Dok je autoimuni upalni proces uglavnom razjašnjen, neurodegenerativni upalni proces još uvijek nije. Donedavno je smatrano da neurodegeneracija slijedi nakon autoimune upalne faze, ali je u zadnje vrijeme, koristeći suvremenije dijagnostičke pretrage, ustanovljeno da i jedan i drugi proces teku od samog početka bolesti s tim da je upalni proces dominantniji na početku, a neurodegenerativni sve izrazitiji u kasnijoj fazi oboljenja. Upalni proces započinje proliferacijom, aktivacijom i ulaskom aktiviranih T-limfocita u cirkulaciju. Aktivirane CD4⁺ T-stanice pomoću adhezijskih molekula uzrokuju promjenu endotela te mogu proći KLB, koja je inače nepropusna u zdravih osoba i izazvati uništenje mijelinske ovojnice. Još uvijek je nepoznato što dovodi do aktivacije tih stanica na periferiji. Kada se ispune genetički, okolišni i nepoznati preduvjeti za nastanak MS-a, CD4⁺ T-stanice pokreću imunopatogenetsku kaskadu koja dovodi do kronične upale. U početku se smatralo da CD4⁺ T-stanice koje stvaraju interferon γ tzv. Th1 stanice pod utjecajem interleukina 12 (IL-12) imaju centralnu proupalnu ulogu u MS-u. Th2 stanice koje nastaju pod utjecajem interleukina 4 (IL-4) djeluju protuupalno. Teorija o nepovoljnom omjeru Th1:Th2 stanica bila je temelj za razvoj nekih od prvih lijekova za liječenje MS-a kao što je interferon β . Daljnja istraživanja pokazala su da su efektorske CD4⁺ T-stanice koje stvaraju interleukin 17 (Th17) važne u imunopatogenezi MS-a kao i regulatorne CD4⁺ CD25⁺ T-stanice (T reg) (Slika 2-1.). Osim CD4⁺ T-stanica, CD8⁺ T-stanice su dominantne na patohistološkim nalazima

demijelinizacijskih lezija te se mogu klonalno umožiti i ostati u SŽS-u dugi niz godina. Ove stanice su važne u povećanju propusnosti KLB-a te su jedan od ključnih koraka u imunopatogenezi MS-a. Osim T-stanica u imunopatogenezi MS-a važne su i B-stanice. Ove stanice imaju ulogu u lučenju proupalnih citokina u odnosu na manje lučenje protuupalnih citokina. B-stanice stvaraju antitijela koja uzrokuju oštećenje tkiva i aktivaciju makrofaga i NK-stanica te sudjeluju u stvaranju ektopičnih limfoidnih struktura sličnih folikulima što za posljedicu može imati aktivaciju mikroglije, lokalnu upalu i gubitak aksona.



Slika 2-1. Prikaz diferencijacije CD4⁺ T stanica prilagođeno prema Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. Clin Immunol 2012;142:2-8.

Upalnom reakcijom dolazi do oštećenja mijelinskog omotača, a dijelom i samog aksona. Na mjestu oštećenja nastane akutna, a potom kronična demijelinizacijska lezija ili plak. U ranoj fazi nastanka, lezije se patomorfološki sastoje od perivaskularne infiltracije (limfocita i makrofaga) uz demijelinizirani dio aksona. Starije lezije pokazuju degenerativne promjene samog aksona. Donedavno je smatrano da su lezije raspoređene samo u bijeloj

masi cerebralnih hemisfera, u *cerebellumu*, *medulli spinalis* i očnom živcu, a danas je poznato da je oko 25 % lezija smješteno u dubokim sivim masama i kori mozga, čak i unutar retine. Sve veće razumijevanje imunopatogeneze MS-a dovelo je do razvoja novih terapijskih smjerova prikazanih u Tablici 2- 1.

Tablica 2-1. Četiri terapijska smjera u MS-u

Imunosupresivni lijekovi	1) Ciklofosfamid 2) Mitoksantron 3) Lakvinimod 4) Kladribin 5) Teriflunomid
Imunomodulatorni lijekovi	1) Inhibitor citokina (interferon β) 2) Lijekovi koji smanjuju specifične populacije imunosnih stanica: • Alemtuzumab (cilja CD52 koji se nalazi na T i B stanicama; dugotrajno smanjuje T-staničnu populaciju) • Rituksimab (cilja CD20 i smanjuje B-staničnu populaciju) 3) Lijekovi koji selektivno blokiraju koreceptore i kostimulatore : • Daklizumab (cilja CD25 i inhibira aktivnost T-stanica te potiče regulatorne imunosne stanice)
Lijekovi koji modificiraju migraciju stanica	1) Natalizumab [monoklonsko protutijelo koje blokira vrlo kasni antigen 4 (VLA-4, engl. <i>very late antigen 4</i>)]; lijek koji djeluje kao adhezijska molekula 2) Fingolimod (agonist sfingozin-1-fosfat receptora)
Neuroprotektivni lijekovi	1) Statini 2) Agonisti aktivacije receptora za proliferaciju peroksisoma (PPAR agonisti, engl. <i>peroxisome proliferator activated receptors</i>) 3) Estriol 4) Fumarat 5) Minociklin 6) Eritropoetin

2.3. Klinička slika

Postavljanje dijagnoze MS-a započinje s pacijentom koji ima smetnje, odnosno simptome karakteristične za MS. Simptomi bolesti mogu biti vrlo izraženi ili klinički neprepoznatljivi ne zahtijevajući medicinsku pomoć mjesecima ili godinama. Takvi slučajevi potvrđeni su nalazima obdukcije ili usputnim nalazima MR-a koja može ukazati na asimptomatsku MS. Ako su simptomi i slikovni nalazi tipični za MS, kliničar mora primijeniti

odgovarajuće dijagnostičke kriterije, a ako su atipični, potrebno je upotrijebiti alternativne metode. Atipični simptomi označavaju alternativnu dijagnozu za MS te uključuju simptome koji ukazuju na druge neurološke bolesti ili na medicinski neobjašnjene simptome. Pojam „crvena zastavica“ (engl. *red flag*) koristi se u procjeni kod dijagnoza koje ne upućuju na MS. Skupina za magnetnu rezonanciju u multiploj sklerozi (MAGNIMS, engl. *Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis*) opisala je te crvene zastavice te ih klasificirala prema značajnosti kod alternativnih dijagnoza za MS. Simbol velike crvene zastavice pruža jak dokaz za dijagnozu koja isključuje MS, kao što su koštane lezije, uključenost pluća i bubrega, srčana bolest, periferalne neuropatije, miopatija, retinopatija, *diabetes insipidus* itd. Simbol srednje velike crvene zastavice može predstavljati alternativnu dijagnozu no ujedno može biti i dosljedan MS-u. Simbol srednje velike zastavice uključuje stanja kao hidrocefalus, gubitak sluha, simetrično distribuirane lezije, neuropsihijatrijski sindrom te druga stanja. Simbol male crvene zastavice može se pojaviti kod pacijenata kojima je tek dijagnosticiran MS te se pojavljuje u stanjima kao što su sindrom moždanog debla, mijelopatije, velike lezije.

Tipični klinički simptomi MS-a karakterizirani su diseminacijom bolesti u prostoru (DIS, engl. *dissemination in space*) i diseminacijom bolesti u vremenu (DIT, engl. *dissemination in time*). DIS je ispunjen kad u pacijenta klinički ili putem MR-a pronađemo znakove oštećenja u najmanje dva sustava (npr. mozak i vratna kralježnica), dok je DIT zadovoljen kada pacijent ima klinički ili neuroradiološki nalaz da su dva oštećenja nastala u različitim razdobljima. Iz navedenog je vidljivo da je nalaz MR-a preuzeo vrlo važnu i vodeću ulogu u dijagnostici, ali i praćenju bolesnika s MS-om. Klinički simptomi u MS-u uključuju osjetne poremećaje kao što su parestezije, disestezije, hipoestezije, motorički simptomi, optički neuritis, ataksija, vrtoglavica, disartrija, disfagija, kao i kognitivne poremećaje i poremećaje kontrole sfinktera. Zbog pojačane mehanoreceptivnosti i efaptičkog provođenja impulsa uzrokovanih demijelinizacijom, javljaju se i paroksizmalni simptomi kao miokimije, spazmi mišića, trigeminalna neuralgija, Lhermitteov simptom i znak koji podrazumijeva osjećaj prolaženja struje niz leđa ili ekstremiteta pri nagloj fleksiji glave te drugi simptomi. Simptomi kod pacijenata s MS-om su raznoliki i nepredvidljivi, međutim bolest ipak pokazuje određene pravilnosti ako se prati kroz duže vremensko razdoblje. Kod većine bolesnika MS počinje relapsom koji nazivamo klinički izolirani sindrom (CIS, engl. *clinically isolated syndrome*). Uz dovoljno dugo

praćenje, u većine bolesnika će CIS prijeći u relapsno remitirajuću multiplu sklerozu (RRMS). Ako bolesnike s RRMS-om ne liječimo, 70% njih će razviti progresiju bolesti obilježenu kontinuiranim povećanjem neurološke onesposobljenosti, što nazivamo sekundarnom progresivnom multiplom sklerozom (SPMS). Oko 15% pacijenata od početka ima progresivni tijek što nazivamo primarno progresivnim oblikom bolesti (PPMS).

2.3.1. Klinički izolirani sindrom

Pojam CIS opisuje prvu epizodu čiji klinički i paraklinički nalazi ukazuju na MS. Mnogi pacijenti koji razviju MS prezentiraju se prvi put kao CIS. Postoje pacijenti koji se prvi put prezentiraju tipičnim simptomima za CIS te još uvijek ne zadovoljavaju kriterije za RRMS. Takvi pacijenti ostaju CIS sve dok se kriteriji za RRMS ne zadovolje. CIS se odnosi na prvi klinički demijelinizirajući događaj u SŽS-u koji traje preko 24 h te je izoliran u vremenu, a može ili ne mora biti izoliran u prostoru. Budući da je CIS demijelinizirajući događaj u SŽS-u koji je izoliran u vremenu, kompatibilan je s mogućim budućim razvojem MS-a te njegovo rano dijagnosticiranje pomaže u odlukama pri liječenju. MR je trenutno najkorisniji alat za procjenu rizika. Istraživanja likvora i evociranih potencijala bi se također mogli koristiti za procjenu vjerojatnosti MS-a, no za razliku od evociranih potencijala, MR je, uz ispitivanje oligoklonskih vrpca u likvoru, dio McDonaldovih kriterija iz 2017. godine.

Također CIS se razlikuje od radiološki izoliranog sindroma (RIS, engl. *radiologically isolated syndrome*) u kojima pacijenti imaju slučajno uočena T2 svijetla žarišta na MR-u koja ukazuju na demijelinizaciju u odsutnosti kliničkih simptoma. Tipične prezentacije za CIS uključuju unilateralni optički neuritis, fokalni supratentorijalni sindrom, fokalni sindrom moždanog debla ili malog mozga te djelomičnu mijelopatiju dok atipične prezentacije za CIS uključuju bilateralni optički neuritis, kompletnu oftalmoplegiju, kompletnu mijelopatiju, encefalopatiju, glavobolju, promjene svijesti, meningizam te izolirani umor.

Liječnici uvijek moraju ispitati pacijentove prošle neurološke događaje kao što su zamagljivanje vida, dvostruki vid, Lhermitteov znak, utrnulost ili slabost koja traje duže od 24 sata jer ovi simptomi mogu biti zanemareni pogotovo ako su blagi. Također liječnici moraju isključiti druge alternativne dijagnoze kao što su infekcije, upalni poremećaji, metabolički poremećaji, genske bolesti, neoplazme, vaskularne bolesti te druge autoimune bolesti.

Klinička prezentacija CIS-a može biti monofokalna ili multifokalna. Monofokalna prezentacija podrazumijeva odražavanje patologije na jednom mjestu. Ako je kod prve kliničke prezentacije zadovoljen kriterij DIS-a koji podrazumijeva oštećenja na dva različita mjesta SŽS-a, takav oblik CIS-a nazivamo multifokalnim. Monofokalni CIS se tipično prezentira u tri klinička oblika: nepotpuni transversalni mijelitis koji se prezentira s asimetričnom para/tetraparezom, smetnjama sfinktera te različitim osjetnim ispadima; optički neuritis kojeg obilježava klinički trijas (bolnost prilikom pomicanja bulbusa, smetnje vidne oštine, nesposobnost razlikovanja boja); te simptomima moždanog debla i/ili malog mozga koji se prezentira internuklearnom oftalmoplegijom, ataksijom, različitim oblicima centralnog nistagmusa, parezom abducensa ili paroksizmalnim simptomima.

Trenutno nema markera koji su patognomični za dijagnozu CIS-a ili MS-a. Dijagnostička obrada CIS-a obično počinje s MR-om mozga.

Prema Milleru, CIS se može podijeliti na pet tipova:

- 1) **Tip 1** koji je obilježen monofokalnim simptomima kao što je npr. optički neuritis uz barem još jednu asimptomatsku leziju na MR-u
- 2) **Tip 2** koji je klinički obilježen multifokalnim simptomima kao što je optički neuritis s internuklearnom oftalmoplegijom uz barem još jednu asimptomatsku leziju na MR-u
- 3) **Tip 3** koji je obilježen monofokalnim simptomima, dok na MR-u nema asimptomatskih lezija
- 4) **Tip 4** koji je obilježen multifokalnim simptomima dok na MR-u nema asimptomatskih lezija
- 5) **Tip 5** koji predstavlja bolesnike čiji MR zadovoljava Barkhofove kriterije za DIS, dok simptomi karakteristični za demijelinizacijske bolesti izostaju.

U McDonaldovim kriterijima iz 2017. godine za CIS, osim asimptomatskih lezija, trebaju se u obzir uzeti i simptomatske lezije. Važnost pravodobnog i točnog postavljanja dijagnoze CIS-a je u činjenici da su bolesnici s CIS-om pod povećanim rizikom za razvoj MS-a, a brojna istraživanja pokazuju da početak liječenja MS-a još u fazi CIS-a nosi puno bolju dugoročnu prognozu.

Dakle, nakon što se postavi dijagnoza CIS-a, jedno od glavnih pitanja je koliki je rizik tog bolesnika da razvije MS. Istraživani su brojni čimbenici kao

moгуći prediktori konverzije, no samo se MR i likvor koriste u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici.

2.3.2. Radiološki izolirani sindrom

Povećana upotreba MR-a mozga rezultirala je slučajnim pronalascima abnormalnosti bijele tvari u SŽS-u. Dok je većina tih nalaza nespecifična, neki upućuju i na demijelinizirajuću patologiju. Porast neočekivanih promjena na MR-u su povećale zanimanje za otkrića čija morfologija, veličina, lokacija i distribucija visoko upućuju na demijelinizirajuću patologiju. Ovo je dovelo do definicije RIS-a koji je uveden kako bi se opisali asimptomatski pacijenti s abnormalnostima mozga na MR-u koji ukazuju na moguću MS, no koji imaju odsutne kliničke znakove.

Priroda ovih oštećenja i razvoj stanja kod ovih bolesnika ostaju nejasna i potrebni su dodatni dokazi da bi se ustanovio rizik.

Određeni broj pacijenata s RIS-om s vremenom prijeđe u MS. RIS je zapravo slučajan nalaz T2 i FLAIR hiperintenzivne lezije, na MR-u mozga i kralježnične moždine i to kod pacijenata koji nemaju simptome karakteristične za MS. Pojam RIS-a je prvi predložio Okuda sa suradnicima te je ponudio primjenjive kriterije koji se fokusiraju na strukturalna otkrića MR-a te istovremeno isključuju kliničke promjene i druga bolesna stanja koja bi mogla sačinjavati promatrane parakliničke anomalije. Okudini kriteriji iz 2009. godine podrazumijevaju prisutnost najolikih i dobro okruženih lezija uz prisutnost ili odsutnost *corpus callosum*, koje su veće od 3 mm te ispunjavaju barem tri od četiri DIS kriterija. MAGNIMS skupina predložila je nove MR kriterije za dijagnozu MS-a koji su utjecali na reviziju McDonaldovih kriterija iz 2010. godine. Ovi kriteriji su se fokusirali na lokaciju lezija, što je olakšalo pojašnjenje MR-a i njegovo korištenje u kliničkoj praksi. MAGNIMS skupina je modificirala ove kriterije te su oni uključeni u McDonaldove kriterije iz 2017. godine (Tablica 2-2). Prema ovim kriterijima, preporuča se da bi se identični MR kriteriji za DIS trebali primjenjivati za dijagnozu RIS-a i MS-a. Također, ispunjavanje McDonaldovih kriterija za DIT bi nadalje moglo poboljšati identifikaciju pacijenata s RIS-om s visokim rizikom od razvijanja neuroloških simptoma te bi omogućilo definitivnu dijagnozu MS-a i to kad bi pacijent prikazao prvi neurološki simptom koji ukazuje na demijelinizaciju SŽS-a.

Tablica 2-2. Prikaz MAGNIMS preporuka za dijagnozu i liječenje RIS-a (s dodanim modificiranim kriterijima) i subkliničkog MS-a

DIJAGNOSTIČKI KRITERIJI
Dijagnoza RIS-a pretpostavlja da su otkrića neočekivana za remitirajuće kliničke simptome nakon pažljivo skupljene kliničke povijesti i pedantnog kliničkog pregleda.
Opis prostornog i vremenskog širenja MR lezija koji je predložen u najnovijoj reviziji McDonaldovih kriterija za dijagnozu MS-a iz 2017. godine bi se trebao primjenjivati na pacijente s RIS-om. Prema modificiranim kriterijima za dijagnozu RIS-a, uključujući kriteriji podrazumijevaju: • Prikaz DIS-a (putem ≥ 1 T2-hiperintenzivne lezije na najmanje dvije od sljedećih lokacija): 1. Periventrikularna bijela tvar 2. Kortiko-jukstakortikalna 3. Leđna moždina 4. Infratentorijalna Isključujući kriteriji podrazumijevaju: • Klinički dokaz neurološke disfunkcije koja ukazuje na MS na temelju povijesnih simptoma i/ili objektivnih znakova • MR abnormalnosti objašnjene bilo kojim drugim bolestima, s posebnom pažnjom na starenje ili vaskularne abnormalnosti, te abnormalnosti uzrokovane izloženošću toksinima ili lijekovima
Prisutnost DIT-a na MR-u kod RIS-a može omogućiti definitivnu dijagnozu MS-a s prvom pojavom neuroloških događaja, koji su potvrđeni kliničkim pregledom te upućuju na demijelinizaciju SŽS-a.
Dijagnoza RIS-a se uglavnom temelji na pojašnjavanju MR otkrića, no potrebno je isključiti druge bolesti koje bi mogle uzrokovati promatrane anomalije na MR-u.
Prediktori konverzije i subkliničkog MS-a
Postoji dosta važnih prediktora koji ukazuju na konverziju iz RIS-a u MS te bi se trebali koristiti za identificiranje pacijenata s RIS-om koji bi mogli imati veći rizik od razvijanja MS-a.
Pojedinci s RIS-om koji imaju klasična paraklinička svojstva pacijenata s MS-om te kod kojih postoji nekoliko MR faktora rizika za konverziju u MS vjerojatno imaju subklinički oblik MS-a.
Liječenje i upravljanje
Trenutni dokaz ne podržava liječenje kod pacijenata s RIS-om, čak i kada otkrića ukazuju na subklinički MS.
Aktivno praćenje pacijenata s periodičnim (6-12 mjeseci), kliničkim i radiološkim kontrolama preporuča se kod pacijenata s mogućim subkliničkim MS-om.
Svatom pojedincu s RIS-om mora se pružiti mogućnost izbora želi li on/ona nastaviti daljnje pretrage.

2.3.3. Klinički oblici multiple skleroze

Multipla skleroza pojavljuje se u više kliničkih oblika te većinu MS bolesnika možemo svrstati u jednu od četiri glavne skupine (slika 2-2.):

1. Relapsno remitirajući oblik MS-a - Većina pacijenata s dijagnosticiranim MS-om (80-85%) ima relapsno remitirajući klinički oblik koji je karakteriziran epizodama žarišnih neuroloških ispada (relaps), nakon kojih slijedi spontani ili

terapijom potpomognuti potpuni oporavak (remisija). Učestalost napada i trajanje remisije varira od bolesnika do bolesnika. Kriterij za postavljanje dijagnoze uključuju napad, relaps i egzacerbaciju, a početna prezentacija naziva se CIS. Ponavljanjem novih epizoda upalne demijelinizacije i sve intenzivnijim oštećenjem aksona nastaju trajni neurološki poremećaji koji se postupno gomilaju stvarajući sve teže neurološke ispade. Tijekom vremena epizode remisije postati će sve kraće, a deficit sve teži. Prepoznavanje progresije bolesti komplicira činjenica da svako novo oštećenje ne mora nužno biti klinički manifestno. Pacijent tijekom vremena može „nagomilavati“ neurološka oštećenja, a nemati tešku kliničku sliku relapsa, već će nakon određena razdoblja uslijediti trajna onesposobljenost. Smanjenje broja novih egzacerbacija, ali daljnja progresija bolesti, označuje prijelaz relapsno remitirajućeg u sekundarno-progresivni oblik bolesti. Tijekom određenog vremenskog perioda relapsno remitirajući MS se može klasificirati kao neaktivan ili aktivan i to ako pacijent klinički ima epizodu novih i pogoršanje starih neuroloških ispada ili su mu utvrđeni znakovi aktivnosti bolesti na MR-u mozga.

2. Sekundarno progresivni MS - Oko 50 % pacijenata s relapsno remitirajućim MS-om nakon 10 godina i 90 % pacijenata nakon 25 godina bolesti, prijeđe u sekundarno progresivni oblik. Sekundarno progresivni oblik MS-a označava progresivnu akumulaciju onesposobljenosti nakon početnog relapsno remitirajućeg tijeka bolesti. Relapsi su manje česti, ali je onesposobljenost pacijenta značajna, te je rezultat sveukupnog stupnja aksonalnog oštećenja u SZS-u. Pacijenti se najčešće žale na pogoršanje hoda, ravnoteže, spastičnosti i kontrole mokraćnog mjehura.

3. Primarno progresivan oblik MS-a - Primarno progresivni oblik MS-a prisutan je u oko 10-15% pacijenata. Karakteriziran je podmuklim početkom smetnji koje se postupno pogoršavaju tijekom vremena. Progresivni tijek može imati i epizode stagnacije, pa i manje regresije neuroloških ispada, no nakon njih ponovno slijedi daljnje pogoršanje bolesti. Klinički se bolest najčešće prezentira kao progresivna mijelopatija, a rjeđe kao sindrom moždanog debla ili kralježničke moždine. Ovaj oblik MS-a karakteriziran je otežanim hodom, smetnjama ravnoteže, spastičnošću, slabošću i gubitkom kontrole sfinktera doksu senzorni simptomi rjeđi nego kod relapsno remitirajućeg oblika.

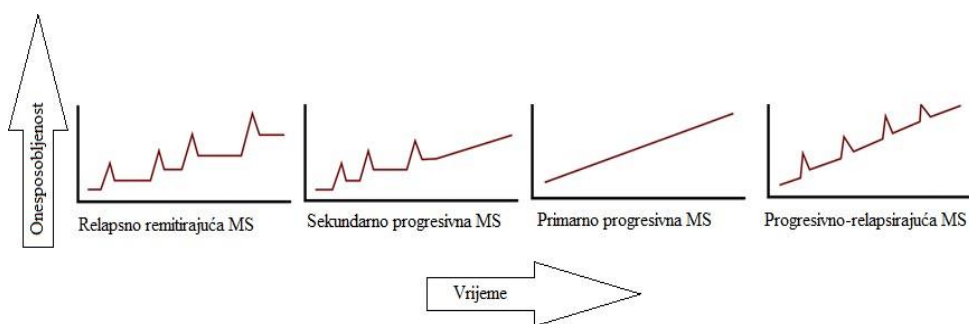
Oba progresivna oblika bolesti mogu biti aktivna (ako su prisutni relapsi bolesti) ili neaktivna, te progresivna ako je prisutno progresivno

pogoršanje simptoma ili bez progresije zbog čega ih dijelimo u četiri podgrupe: aktivna s progresijom, aktivna bez progresije, neaktivna s progresijom, neaktivna bez progresije.

4. Progresivno relapsirajući MS - Progresivno relapsni oblik može predstavljati i podtip primarno progresivnog MS-a. Vrlo mali broj oboljelih ima progresivni tijek bolesti od samog početka s povremenom pojavom akutnih relapsa.

Dodatni podtipovi MS-a također uključuju:

- 1) CIS koji predstavlja prvu pojavu kliničkih simptoma koji ukazuju na MS
- 2) RIS koji predstavlja slučajan pronalazak tipične MS lezije na MR-u bez kliničkih simptoma
- 3) Benigni MS gdje i nakon 15 godina trajanja bolesti nema značajnijih neuroloških ispada
- 4) Maligni (fulminantni) MS koji je karakteriziran brzim progresivnim tijekom koji dovodi do teže invalidnosti ili smrti u kratkom vremenu nakon početka bolesti
- 5) Progresivni MS kojeg uzrokuje jedan napad te koji se smatra podtipom SPMS-a u kojoj nakon jednog napada započinje progresivna faza
- 6) Tranzicijski MS koji odražava fazu tranzicije između RRMS i SPMS



Slika 2-2. Tijek multiple skleroze. Modificirano prema: Krieger S, Sumowski J. *New Insights into Multiple Sclerosis Clinical Course from the Topographical Model and Functional Reserve*. *Neurologic Clinics* 2017. (36).10.1016/j.ncl.2017.08.003.

Literatura:

1. Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015.
2. Brinar V. Demijelinizacijske bolesti središnjeg živčanog sustava. U: Brinar V i sur. Neurologija za medicinare. Zagreb: Medicinska naklada, 2019.
3. Brinar V, Petelin Ž. Multipla skleroza – klinička slika, dijagnostika i liječenje. Neurologija. 2003;(9):50:66-70.
4. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Multiple Sclerosis 1. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. Lancet. 2016; 389: 1336–1346.
5. Charil A, Yousry TA, Rovaris M, Barkhof F, De Stefano N, Fazekas F et al. MRI and the diagnosis of multiple sclerosis: expanding the concept of „no better explanation“. Lancet Neurol. 2006;5:841-52.
6. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. Clin Immunol 2012;142:2-8.
7. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. Lancet 2008; 372:1502-17.
8. De Stefano N, Giorgio A, Tintore M, Amato MP, Kappos L, Palace J, et al. Radiologically isolated syndrome or subclinical multiple sclerosis: MAGNIMS consensus recommendations. Multiple Sclerosis Journal. 2018;24(2):214-21
9. Fowler TJ and Skadding JW. Clinical Neurology, London: Hodder Arnold, 2003; str. 413-20.
10. Garcia Merino A, Blasco MR. Confirming the MS diagnosis. Int MS J. 2007;14(2):58–63.
11. Habek M. Klinički izolirani sindrom U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 178-92.
12. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concept in the immunopatogenesis of multiple sclerosis. Nature Reviews Neuroscience 2002;3:291-301.
13. Kelly SB, Chaila E, Kinsella K, Duggan M, Walsh C, Tubridy N et al. Using atypical symptoms and red flags to identify non-demyelinating disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012;83:44-48.

14. Krieger S, Sumowski J. New Insights into Multiple Sclerosis Clinical Course from the Topographical Model and Functional Reserve. *Neurologic Clinics* 2017. (36). 10.1016/j.ncl.2017.08.003.
15. Lawrence S, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology* 2003;3:483-92.
16. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*. 2010;133(7):1900-13.
17. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol*. 2014;72(1):1-5.
18. Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology*. 2003;61(11):1528-32.
19. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology*. 1996;46:907-11.
20. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
21. Marcus JF, Waubant EL. Updates on Clinically Isolated Syndrome and Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. *Neurohospitalist*. 2013;3(2): 65–80. DOI: 10.1177/1941874412457183.
22. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121– 27.
23. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndrome. *Lancet Neurol*. 2012;11:157-69.
24. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler*. 2008;14(9):1157–74.
25. Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2014;13:518-24.
26. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009;72(9):800–5.

27. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann Neurol*. 2005;58(6):840–6.
28. Reale M, Sanchez-Ramon S. Lipids at the cross-road of autoimmunity in multiple sclerosis. *Curr Med Chem*. 2017;24(2):176–92.
29. Rovira A, Leon A. MR in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: an overview. *Eur J Radiol*. 2008;67(3):409–14.
30. Senel M, Tumani H, Lauda F, Presslauer S, Mojib-Yezdani R, Otto M, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *PloS One*. 2014 Apr 2;9(4):e88680.
31. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*. 2018;17(2):162–73.
32. Trapp BD, Nave KA. Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?. *Annual Review of Neuroscience*. 2008;31:247–69.
33. Vukasović I, Mikula I. *Neurološke bolesti*. U: Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i suradnici. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. 2. dopunjeno i izmijenjeno izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2018. str. 238–72.
34. Weiner HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Arch Neurol* 2004;61:1613.
35. Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 1995;13:119–46.
36. Wiendl H, Toyka KV, Rieckmann P, et al. Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. *J Neurol*. 2008;255(10):1449–63.

3. DIJAGNOSTIKA MULTIPLE SKLEROZE

3.1. Dijagnoza multiple skleroze

Za postavljanje dijagnoze MS-a koriste se revidirani McDonaldovi kriteriji. Dijagnoza MS-a se zasniva na anamnezi, kliničkoj slici, analizi likvora te MR-a. Dijagnoza započinje na temelju simptoma karakterističnih za MS, a inicijalno se naziva CIS koji to ostaje dok se ne pojavi RRMS koji je karakteriziran epizodama brzo nastalih novih neuroloških deficita. Ako su simptomi i slikovni nalazi tipični za MS, kliničar može primijeniti odgovarajuće dijagnostičke kriterije. Smatra se da klinička procjena i nalaz MR-a imaju ključnu ulogu u dijagnostičkom procesu, no MR-u nedostaje specifičnosti tijekom najranijih stadija bolesti. Nalaz magnetne rezonancije pokazuje multifokalne T2 hiperintenzivne lezije bijele tvari smještene periventrikularno, jukstakortikalno i/ili infratentorijalno u T2 i FLAIR sekvencijama. Na T1 sekvencijama lezije mogu biti hipointenzivne. Također, važno je napraviti MR kralježnične moždine, jer se demijelinizacijske lezije kralježnične moždine nalaze u 80-90% bolesnika s MS-om i oko 50% bolesnika s CIS-om. Konverzija CIS-a u MS javlja se u oko 30 % oboljelih u srednjem intervalu od 5,4 godine te je iznimno važna procjena od rizika konverzije, a s najvažnijim ciljem – osigurati pacijentu ranu primjenu imunomodulacijske terapije i minimalizirati upalni proces i buduće epizode oštećenja neurona. Sve do 2010. godine dijagnozu MS-a nije bilo moguće postaviti u fazi CIS-a, no uvođenjem revizije McDonaldovih kriterija iz 2010. godine, dijagnoza MS-a se može postaviti na temelju jednog kliničkog simptoma i jednog nalaza MR-a koji zadovoljava kriterije DIT-a, što znači proučavanje aktivnosti bolesti u vremenu i DIS-a što podrazumijeva uključivanje multiplih područja u SŽS-u. Kod pacijenata koji se prezentiraju tipičnom kliničkom slikom, tipičnim nalazima na MR-u te zadovoljavaju McDonaldove kriterije revidirane u 2017. godini, nije potrebna daljnja dijagnostička obrada. S druge strane kod pacijenata kod kojih se sumnja na MS, no postoji atipični nalaz MR-a ili kliničke slike, potrebna je daljnja obrada da bi isključila alternativne dijagnoze. Upravo je analiza likvora ta koja se preporuča u onim slučajevima kad su atipični: klinička slika, dob pojedinca te nalaz MR-a. Iako analiza likvora nije obvezni dio dijagnostičkog kriterija, valja ju primijeniti u bolesnika s CIS-om da bi se isključile alternativne

dijagnoze. Osim rutinskih postupaka analiziranja likvora kod pacijenata gdje se sumnja na MS, potrebno je paralelnim analiziranjem likvora i seruma detektirati mogući poremećaj funkcije barijere te procijeniti intratekalno sintetiziranu količinu imunoglobulina G (IgG). Za detekciju intratekalne sinteze imunoglobulina, osim kvantitativne metode, preporuča se i kvalitativna metoda izoelektričnog fokusiranja (IEF, engl. *Isoelectric Focusing*) s imunofiksacijom koja je osjetljivija te predstavlja zlatni standard za detekciju oligoklonskih imunoglobulina. U slučaju da je pozitivan nalaz oligoklonskih imunoglobulina, izvodi se i reakcija na morbile, rubellu i zoster (MRZ, engl. *Morbilli, Rubella, Varicella Zoster*) koja značajno povećava specifičnost nalaza oligoklonskih IgG jer upućuje da se radi o kroničnom upalnom procesu SŽS-a.

3.2. Diferencijalna dijagnoza multiple skleroze

Iako je MR mozga i kralježnične moždine najmoćnije sredstvo u potvrdi dijagnoze MS-a, ona nas nerijetko dovodi u zabludu jer čitav niz različitih bolesti ili preboljenih stanja oponaša demijelinizacijske promjene u MR-u. Stoga se dijagnoza MS-a ne uspostavlja samo na osnovu nalaza MR-a, već na sveobuhvatnim anamnestičkim, kliničkim, parakliničkim i laboratorijskim nalazima. Dakle, svaka demijelinizacija SŽS-a ne mora biti MS. Diferencijalna dijagnoza sadrži širok spektar bolesti koji joj nalikuju. Najčešće bolesti koje je moguće zamijeniti s MS-om jesu migrena, fibromialgija, nespecifični ili nelokalizirajući neurološki simptomi s abnormalnim nalazom MR-a, psihogeni poremećaji i spektar poremećaja optičkog neuromijelitisa (NMOSD. eng. *neuromyelitis optica spectrum disorders*). No, postoje i druge bolesti, navedene u Tablici 3-1., koje se mogu zamijeniti s dijagnozom MS-a. Upravo se zbog pogrešnog tumačenja simptoma, nekompletnog pregleda neurologa i krivog tumačenja nalaza MR-a događaju greške u postavljanju dijagnoze MS-a.

Tablica 3-1. Diferencijalna dijagnoza MS-a

Upalne/autoimune bolesti	▪ Eritemski sistemski lupus (SLE) ▪ Anrifosfolipidni sindrom ▪ Sjögrenov sindrom ▪ Neurosarkoidoza ▪ Behçetov sindrom	▪ Primarni angitis SŽS-a ▪ Poliarteritis nodosa ▪ Wegnerova granulomatoza ▪ Susacov sindrom ▪ Mijastenija gravis
Demijelinizacijske bolesti	▪ Pelizaeus-Merzbacherova bolest ▪ Alexanderova bolest ▪ Krabbeova bolest	▪ Metakromatska leukodistrofija ▪ Multipli manjak sulfataze ▪ Adrenoleukodistrofija
Druge demijelinizacije	▪ Optički neuritis ▪ Spektar poremećaja iz optičkog neuromijelitisa (NMOSD) ▪ Akutni diseminirani encefalomijelitis (ADEM)	▪ Tumori SŽS-a ▪ Limfomi SŽS-a ▪ Schilderova bolest ▪ Koncentrična skleroza
Zarazne bolesti	▪ HIV ▪ Progresivna multifokalna leukoencefalopatija	▪ Sifilis ▪ Tropska spastička parapareza
Genski poremećaji	▪ Migrena ▪ Leberova hereditarna optička atrofija ▪ Hereditarna spastična parapareza ▪ Lizosomalne enzimске bolesti (metakromatska leukodistrofija, Fabijeva bolest)	▪ Organska acidemija (nedostatak biotinidaze) ▪ Mitondrijske citopatije (Leber optička neuropatija, MELAS) ▪ Willsonova bolest ▪ Cerebrovaskularne malformacije-sindromi
Metaboličke bolesti	▪ Nedostatak kobalamina ▪ Nedostatak folata	▪ Nedostatak vitamina E
Neoplastične bolesti	▪ Metastatski tumor ▪ Primarni moždani tumor	▪ Paraneoplastični sindrom
Psihogeni poremećaji	▪ Anksiozni poremećaji ▪ Depresija	▪ Konverzivni poremećaji
Druge bolesti i stanja	▪ Fibromialgija ▪ Abnormalni nalaz MR-a ▪ Leukoencefalopatija	▪ Neuroretinitis ▪ Oboljenje pleksusa ▪ Sistemska histiocitoza

Literatura:

1. Bašić Kes V, Dimitrović A. Dijagnostika multiple skleroze. U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 88-101.
2. Brinar V. Demijelinizacijske bolesti središnjeg živčanog sustava. U: Brinar V i sur. Neurologija za medicinare. Zagreb: Medicinska naklada, 2019.
3. Montalban X, Tintoré M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010;74:427-34.
4. Radulović-Prenc L, Sepčić J, Vidović I, Prenc M. New Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. *Glas. Pul. Boln*. 2011;8:8-12.
5. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-73.
6. Trbojević-Čepe M, Vogrinc Ž. Inflammation and humoral immune response within the CNS compartment: characteristic features and cerebrospinal fluid analysis. *Biochemia Medica*, 2004;14(1-2):1-36.
7. Vukasović I, Mikula I. Neurološke bolesti. U: Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i suradnici. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. 2. dopunjeno i izmijenjeno izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2018. str. 238-72.

4. MAGNETNA REZONANCIJA

4.1. Osnovni principi magnetne rezonancije

Godine 1972. patentiran je prvi uređaj magnetne rezonancije, a 1977. godine Damadin prvi snima cijeli ljudski organizam i dijagnosticira karcinom. Već 1979. godine započinje dijagnostičko snimanje MR-om. MR-om se oslikavaju pojedini dijelovi tijela. Ova dijagnostička metoda je sigurna i nije štetna za bolesnike. Sigurno se provodi i kod trudnica i kod male djece, ako postoje indikacije za ovom dijagnostičkom metodom. MR se može bez bojazni ponavljati jer za razliku od radioaktivnih zraka koji se koriste u kompjuteriziranoj tomografiji (CT), u MR-u se primjenjuju magnetni valovi i radiovalovi. Dio tijela koji se želi snimati stavlja se u područje jakog magnetnog polja. Kako je naše tijelo uglavnom građeno od vode koja sadrži veliku količinu vodikovih iona (H^+), protoni u vodikovim atomima postavljaju se paralelno ili antiparalelno s magnetnim poljem. Emitiraju se pulsni radiovalovi koji prolaskom kroz naše tijelo pomiču protone u vodikovim atomima iz njihova položaja. Prestankom emitiranja pulsnih radiovalova, događa se proces relaksacije tj. protoni (H^+) se gubitkom energije vraćaju u početni položaj prilikom čega emitiraju elektromagnetni signal koji se prihvata radioprijemnikom i potom kompjuterski pretvara u sliku. MR slika nastaje zbog razlike u gustoći H^+ iona u različitim tkivima i organima. U odnosu na normalna tkiva, patolojska tkiva imaju različit raspored i gustoću H^+ iona koji emitiraju različit signal te na temelju toga nastaje mogućnost prikaza patomorfologijskog procesa. Dakle, jakost signala ovisi o tkivu koje se ispituje, a to uključuje gustoću protona, kretanje, magnetnu primljivost i vremensku konstantu. Ovisno o vremenskoj konstanti koja se primjenjuje, slike se prikazuju u T1 ili T2 mjernim snimkama. U T1 mjernoj snimci, signalima siromašna područja s dugim T1 vremenom prikazuju se crno, a u T2 mjernoj snimci signalima bogata područja s dugim T2 prikazuju se bijelo. FLAIR (engl. *Fluid Attenuated Inversion Recovery*) je poseban postupak produljenja inverznog vremena T1 koje rezultira gubitkom signala likvora te se oštećenja prikazuju izrazitije hiperintenzivno nego u uobičajenim T2 mjernim slikama.

Najvažniji dio MR uređaja je glavni magnet koji proizvodi glavno magnetno polje. Snaga uređaja se mjeri u jedinicama Tesla (T). U MR snimkama kao paramagnetno sredstvo rabi se gadolinijski kontrast, koji se

primjenjuje intravenski. Upotreba paramagnetskog kontrastnog sredstva povećava stupanj detekcije i diferencijacije patoloških lezija. Lezije koje se imbibiraju kontrastom hiperintenzivne su u T1 mjernim snimkama. MR uređaji dijele se prema jakosti magnetnog polja na uređaje niske jakosti polja (do 0,5 T), srednje jakosti polja (0,5 T do 1 T) i visoke jakosti polja (1 T i više). Osim glavnog magneta važan dio MR uređaja čine: radiofrekventne i gradijentne zavojnice; radiofrekventno i gradijentno pojačalo te računalni i elektronički sustav. MR je pogodan za prikaz čitavog tijela, ali poseban značaj imaju u neuroradiologiji te je postupak izbora kod prikaza demijelinizacijskih oštećenja mozga i kralježnične moždine.

4.2. Uloga MR-a kod pacijenata s MS-om

MR je preuzeo glavnu ulogu u dijagnostici, ali i praćenju bolesnika s MS-om. Za postavljanje dijagnoze koriste se revidirani McDonaldovi kriteriji koji se temelje na dva osnovna postulata DIS i DIT koji se mogu zadovoljiti klinički i nalazom MR-a.

DIS kriteriji na MR-u podrazumijevaju pojavu minimalno jedne T2 lezije na najmanje dvije od četiri lokacije: periventrikularno, jukstakortikalno, infratentorijalno i/ili u kralježničkoj moždini, dok DIT kriteriji predstavljaju prisutnost nove T2 lezije i/ili gadolinij imbibirajuće lezije na kontrolnom snimanju MR-a u usporedbi s početnim MR-om (neovisno o vremenu snimanja početnog MR-a). Također, DIT može predstavljati i istovremenu prisutnost asimptomatske lezije koja se postkontrastno imbibira i lezije koja se ne imbibira.

Prilikom MR snimanja primjenjuju se nestandardizirani protokoli koji uključuju snimanje mozga, vratne kralježničke moždine, očnih živaca, a ponekad i torakalne kralježničke moždine uz primjenu intravenskog paramagnetskog kontrastnog sredstva kao što je gadolinij. Primjena gadolinija omogućuje praćenje aktivnosti bolesti. Detalji sekvenci koji se koriste u dijagnostici MS-a prikazani su u Tablici 4-1.

MS lezije se mogu pojaviti u bilo kojem dijelu SŽS-a gdje postoji mijelin. Najčešće se pojavljuju periventrikularno, u *corpus callosum*, jukstakortikalno i infratentorijalno. Obično su bilateralne i simetrične distribucije. T2 mjerna slika je osjetljivija za detekciju MS lezija moždanog debla i malog mozga, dok je FLAIR osjetljivija za periventrikularne i

jukstakortikalne lezije te rijetke kortikalne lezije. Postkontrastna T1 mjerna slika je osjetljiva za detekciju aktivnih lezija.

U upalnoj fazi bolesti dolazi do poremećaja KLB-a te paramagnetno kontrastno sredstvo iz krvožilnog sustava slobodno prelazi u MS lezije što dovodi do postkontrastnog pojačanja signala u T1 mjernoj slici. Kod aktivnih MS lezija postkontrastno pojačanje signala obično perzistira 2-6 tjedana, rjeđe 3-4 mjeseca, a vrlo rijetko više od 6 mjeseci. MS lezije u području vratne kralježnične moždine se prikazuju u T2 mjernoj slici na sagitalnim i transverzalnim presjecima.

U kasnijoj fazi bolesti osim gubitka mijelina, dolazi i do atrofije mozga i kralježnične moždine. Kralježnična moždina je uz mozak vrlo često zahvaćena MS-om, osobito gornji i srednji dijelovi vratne kralježnične moždine, dok su torakalni i lumbalni dijelovi rjeđe zahvaćeni.

Tablica 4-1. Detalji sekvenci koje se primjenjuju u dijagnostici MS-a

SE (engl. <i>Spin Echo</i>)	Podrazumijeva najjednostavniji način snimanja, a karakteristične slike nazivaju se T1 (vrijeme kad je 33,33 % protona relaksirano) i T2 (vrijeme kad je 66,66 % protona relaksirano). T1 mjerne slike daju visok udio masti, dok T2 mjerne slike daju visok udio vode.
DWI (engl. <i>Diffusion Weighted Imaging</i>)	Tehnika koja podrazumijeva poništavanje cijelog signala iz tkiva, tako da se prikazuje jedino signal onih molekula koji se kreću zbog difuzije.
FLAIR (engl. <i>Fluid Attenuated Inversion Recovery</i>)	Ova tehnika potiče potiskivanje signala vode, ali na drugačiji način od čistih T1 snimki. FLAIR sekvenca je najosjetljivija sekvenca za dijagnostiku demijelinizacijskih lezija, a korištenjem slojeva u sagitalnoj ravnini dobiva se uvid u lezije lokalizirane u <i>corpus callosum</i> , perikalozalno i na septokalozalnom spoju te predstavljaju karakteristične lokalizacije za demijelinizacijske lezije.
T2* (GRE T2)	Za razliku od T2 relaksacije protona koja dobiva <i>spin echo</i> signal, T2* relaksacijom protona dobiva se <i>gradient echo</i> signal zbog čega se može poboljšati detekcija malih lezija.
STIR (engl. <i>Short Tau Inversion Recovery</i>)	Posebna tehnika T1 snimki kod kojih se signal masti potiskuje, a budući da T1 snimke sadrže uglavnom signal masti, slike su tamne. Snimanjem STIR sekvence mogao se dobiti uvid u strukturu optičkih živaca odnosno postojanje eventualnog retrobularnog neuritisa.

U dijagnozi MS-a koriste se McDonaldovi kriteriji koji predstavljaju zlatni standard u dijagnostici MS-a u odraslih te su uz određene specifičnosti primjenjivi i u dječjoj dobi. Ovi kriteriji su objedinili MR mozga i kralježnične

moždine zajedno s kliničkom slikom, parakliničkim testovima i laboratorijskim nalazima. Prvi put ih je donijelo Internacionalno vijeće za dijagnostiku MS-a 2001. godine, a revidirani su 2005. 2010. i 2017. godine.

U Tablici 4-2 se nalaze McDonaldovi kriteriji iz 2010. godine. Revizija McDonaldovih kriterija uslijedila je 2017. godine. Ovom revizijom došlo je do nekoliko izmjena. Neke od tih izmjena su:

- da pacijenti u kojih objašnjenja za kliničku sliku tipičnog CIS-a izostaju, a ispunjavaju kliničke ili MR kriterije za DIS, prikaz specifičnih oligoklonskih vrpca (OB, engl. *oligoclonal bands*) u likvoru omogućuje dijagnozu ove bolesti. Ova preporuka dodatak je McDonaldovom kriteriju iz 2010. godine te podrazumijeva da se u određenim uvjetima pozitivan nalaz OB-a u likvoru može zamijeniti za demonstraciju DIT-a
- da se simptomatske i asimptomatske MR lezije mogu razmotriti pri određivanju DIS-a ili DIT-a što ne uključuje MR lezije u optičkom živcu kod pacijenata koji imaju optički neuritis. U McDonaldovom kriteriju iz 2010. godine simptomatske lezije kod pacijenta koji prikazuje sindrom moždanog debla ili leđne moždine su isključene kao mogući MR dokaz za DIS ili DIT
- da se kortikalne i jukstakortikalne lezije mogu koristiti pri određivanju MR kriterija za DIS. Prema McDonaldovim kriterijima iz 2010. godine kortikalne lezije se nisu mogle koristiti kod ispunjavanja MR kriterija za DIS
- da su u McDonaldovim kriterijima iz 2017. godine dijagnostički kriteriji za PPMS isti kao i u McDonaldovom kriteriju iz 2010. godine, osim što su pridodane asimptomatske te kortikalne lezije.

Tablica 4- 2. McDonaldovi kriteriji iz 2010. i 2017. godine

Klinička prezentacija	Dodatni potrebni podaci prema McDonaldovim kriterijima u 2010. godini	Dodatni potrebni podaci prema McDonaldovim kriterijima u 2017. godini
- 2 ili više napada (relapsa) - 2 ili više objektivne kliničke lezije - 1 objektivna klinička lezija s dokazanim prijašnjim napadom	Nijedan, klinički dokaz je dovoljan (dodatni dokazi su poželjni, ali moraju biti povezani s MS-om).	Nijedan, klinički dokaz je dovoljan (dodatni dokazi su poželjni, ali moraju biti povezani s MS-om).
- 2 ili više napada (relapsa) -1 objektivna klinička lezija	DIS prikazan: pojavom najmanje jedne T2 hiperintenzivne lezije na najmanje dvije od četiri lokalizacije (periventrikularno, jukstakortikalno, infratentorijalno i/ili u kralježničkoj moždini). Simptomatske lezije kod pacijenta koje prikazuju sindrom moždanog debla ili leđne moždine su isključene kao mogući MR dokaz za DIS.	DIS prikazan: dodatnim kliničkim napadom koji podrazumijeva različitu lokalizaciju u SŽS-u; putem MR-a. DIS se može prikazati: putem najmanje jedne T2-hiperintenzivne lezije na najmanje dvije od četiri lokacije SŽS-a: periventrikularnoj, kortikalnoj ili jukstakortikalnoj te infratentorijalnoj moždanoj regiji i/ili kralježničkoj moždini. Za razliku od McDonaldovih kriterija iz 2010. godine, u ovim kriterijima nema razlikovanja između simptomatskih i asimptomatskih lezija te bi za pojedince starije od 50 godina ili one sa vaskularnim faktorima rizika moglo biti dobro da liječnici traže veći broj periventrikularnih lezija.

- 1 napad - 2 ili više objektivne kliničke lezije	DIT dokazan s: istovremenom prisutnošću asimptomatske lezije koja se postkontrastno imbibira i lezije koja se ne imbibira u danom trenutku; postojanje nove T2 lezije i/ili lezije koja se postkontrastno imbibira na kontrolnom MR-u u usporedbi s početnim MR-om i to neovisno o vremenu snimanja; dodatni klinički napad (ovo omogućuje povećavanje osjetljivosti bez smanjenja specifičnosti).	DIT dokazan s: istovremenom prisutnošću lezije koja se postkontrastno imbibira i lezije koja se ne imbibira u danom trenutku; postojanje nove T2 lezije i/ili lezije koja se postkontrastno imbibira na kontrolnom MR-u u usporedbi s početnim MR-om i to neovisno o vremenu snimanja; dodatni klinički napad; prikaz specifičnih OB-ova u likvoru. Za razliku od McDonaldovih kriterija iz 2010. godine, u ovim kriterijima nema razlikovanja između simptomatskih i asimptomatskih lezija, osim toga prisutnost specifičnih OB-ova u likvoru ne prikazuje DIT, ali može predstavljati zamjenu za ovaj kriterij.
- 1 napad - 1 objektivna klinička lezija (CIS)	DIT i DIS prikazuju se na način: Za DIS: minimalno jedne T2 hiperintenzivne lezije na najmanje dvije od 4 lokacije: periventrikularno, jukstakortikalno, infratentorijalno i/ili u kralježničnoj moždini ili daljnji klinički napad koji podrazumijeva drugo različito mjesto u SŽS-u. Za DIT istovremenom prisutnošću asimptomatske lezije koja se postkontrastno imbibira i lezije koja se ne imbibira u danom trenutku, nova T2 lezija i/ili lezija koja se postkontrastno imbibira na kontrolnom MR-u bez obzira na vremensku pomaknutost od početnog MR-a ili čekanje drugog kliničkog napada.	DIT i DIS prikazuju se na način: 1. za DIS: DIS prikazan dodatnim kliničkim napadom koji podrazumijeva različitu lokalizaciju u SŽS-u; putem MR-a. 2. za DIT: DIT prikazan dodatnim kliničkim napadom; putem MR-a; prikazom likvor-specifičnih OB-ova u likvoru gdje prema McDonaldovom kriteriju iz 2017. godine prisutnost specifičnih OB-ova u likvoru ne prikazuje DIT, ali može predstavljati zamjenu za ovaj kriterij.

Primarno progresivni oblik MS-a	PPMS može biti dijagnosticiran u pacijenata s jednom godinom progresije bolesti (retrospektivno ili prospektivno dokazano) uz dva ili tri ispunjena kriterija: 1. DIS u mozgu temeljen na 1 ili više T2 lezija karakterističnih za MS (periventrikularno, jukstakortikalno ili infratentorijalno) 2. Dokaz o DIS-u u kralježničkoj moždini temeljen na dvije ili više T2 lezije 3. Pozitivan likvor (dokazani OB-ovi putem IEF-a i/ili povišenim IgG indeksom).	PPMS može biti dijagnosticiran u pacijenata s jednom godinom progresije bolesti (retrospektivno ili prospektivno dokazano) uz dva ili tri ispunjena kriterija: 1. Jedna ili više T2-hiperintenzivnih lezija karakterističnih za MS u jednoj ili više sljedećih moždanih regija: periventrikularnoj, kortikalnoj ili jukstakortikalnoj, ili infratentorijalnoj. (Prema McDonaldovom kriteriju nije potrebno razlikovanje simptomatskih i asimptomatskih lezija). 2. Dvije ili više T2-hiperintenzivnih lezija u leđnoj moždini 3. Prisutnost specifičnih OB-ova u likvoru.
---------------------------------	--	--

Rani dijagnostički kriteriji za MS primarno su se temeljili na kliničkim dokazima. Zbog tehnoloških napredaka i novih podataka kasniji kriteriji su obuhvaćali slikovne i druge parakliničke testove. Revizija McDonaldovih kriterija iz 2017. godine ponovo je obnovila ulogu analize likvora, razmatrala vrijednost slikovnih otkrića koja prethodno nisu bila uključena (simptomatske i kortikalne lezije), te je više naglasila upozorenja o pogrešnoj dijagnozi i diferencijalnoj dijagnozi.

Literatura:

1. Brinar V. Demijelinizacijske bolesti središnjeg živčanog sustava. U: Brinar V i sur. Neurologija za medicinare. Zagreb: Medicinska naklada, 2019.
2. Garcia Merino A, Blasco MR. Confirming the MS diagnosis. Int MS J. 2007;14(2):58–63.
3. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol. 2001;50(1):121–27.

4. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol*. 2011;69:292–302.
5. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann Neurol*. 2005;58(6):840–46.
6. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227–31.
7. Schumacher GA, Beebe GW, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell B, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1965; 122: 552–68.
8. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-73.
9. Zdravec D. Magnetna rezonancija (MR) neuroimunoloških bolesti i diferencijalna dijagnoza. U: Bašić Kes V i suradnici. *Neuroimunologija*. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str.88-101.

5. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA MS-A

5.1. Rutinski pregled likvora

Promjene sastava likvora odraz su različitih zbivanja unutar SŽS-a, pa tako i upalnih. Stoga se likvorska dijagnostika rutinski provodi i kod sumnje na MS. Štoviše, ona je neizostavna u dijagnostici MS-a prema najnovijim dijagnostičkim kriterijima. Tijekom lumbalne punkcije između L4 i L5 kralješka, likvor se sakuplja frakcionirano u 3 sterilne polipropilenske epruvete bez aditiva za pohranu likvora. Prva se šalje na biokemijske i serološke testove, druga na mikrobiološke i serološke testove, a treća na brojanje i diferenciranje stanica. Hitne pretrage likvora obuhvaćaju makroskopski pregled (izgled, boja likvora), broj i vrsta stanica, ukupne proteine, glukozu i laktat. Uzorak likvora u hitnim pretragama potrebno je dostaviti najkasnije 30 minuta nakon punkcije kako bi se preveniralo izdavanje lažno nižeg broja stanica jer unutar jednog sata broj neutrofilnih granulocita pada za 30%, a za 24 sata do 50%. Ako su u likvoru prisutni eritrociti, u periodu od 2 sata, 40% njih će hemolizirati i uzrokovati ksantokroman likvor.

Neurobiokemijski laboratorij nudi veliki broj pretraga u likvoru koje se dijele na biokemijske, citološke, imunološke i mikrobiološke pretrage. MS zahtjeva detaljan pregled i opsežnu dijagnostičku proceduru. U većini europskih zemalja određuju se broj i vrsta stanica, koncentracija glukoze, laktata, ukupnih proteina, albumina te imunoglobulina (IgG, IgA i IgM). Nijedan nalaz nije patognomičan, no laboratorijska dijagnostika se provodi upravo da bi se isključili drugi mogući uzroci upale SŽS-a odnosno da bi se isključile bolesti koji oponašaju MS kao što su vaskulitis, kronična infekcija, stečeni demijelinizirajući poremećaji kao što su NMOSD te poremećaji povezani s mijelinskim oligodendrocitnim glikoproteinom. Izgled likvora kod MS/CIS pacijenata je uglavnom bistar i bezbojan. Približno 50% MS, odnosno CIS pacijenata pokazuje pleocitozu likvora s brojem leukocita do 40 stanica/ μL u kojem uglavnom prevladavaju limfociti i monociti. Uz pleocitozu, javlja se i blaga proteinorahija. Paralelnom analizom uzorka seruma i likvora pomoću matematičko-statističkih modela moguće je otkriti poremećaje funkcije barijere preko albuminskog kvocijenta te postojanje intratekalne sinteza IgG-a. Pomoću MRZ reakcije te određivanja indeksa specifičnih antitijela protiv Herpes Simplexa i Borelije Burgdorferi može se

poboljšati specifičnost za MS, odrediti prediktivna vrijednost za MS i moguća pretvorba CIS-a u MS. Funkcija KLB očuvana je u više od 90% slučajeva, a Q_{Alb} rijetko prelazi 10 te je intratekalna sinteza imunoglobulina IgG utvrđena u likvoru. Pozitivni OB-ovi prisutni su u do 95% bolesnika.

Rezultate koji se dobiju analizom likvora treba interpretirati uzimajući u obzir sve dostupne podatke o pacijentu jer standardne pretrage likvora ne koreliraju s aktivnosti bolesti i stupnjem invalidnosti bolesnika.

5.2. Očuvanost krvno-likvorske barijere

Proteini se normalno nalaze u likvoru u vrlo malim koncentracijama i većina proteina u likvoru je krvnog podrijetla. Stoga kod procjene poremećaja unutar SŽS-a mora se uzeti u obzir koncentracija ovih analita u krvi kao i funkcija sustava barijera odnosno brzine izmjene likvora. Povećane koncentracije serumskih proteina općenito rezultiraju s višim koncentracijama u likvoru, no gradijent ostaje konstantno uravnotežen što se može prigodno izraziti putem koncentracijskih kvocijenata Q koji se izračunavaju kao odnos koncentracije likvor/serum, a predstavljaju precizne pokazatelje poremećaja proteina u likvoru. Albumin se isključivo proizvodi u jetri, tako da sav albumin uočen u likvoru potječe iz krvi zbog čega služi kao idealan biljeg za procjenu očuvanosti odnosno propusnosti KLB-a. Dodatna uloga Q_{Alb} je ta da služi kao temelj za druge serumske proteine pri izračunavanju njihove intratekalne sinteze, kako je poznato iz formule za IgG_{indeks} . Za određivanje koncentracije albumina u serumu i likvoru na raspolaganju su metode različite osjetljivosti kao što su turbidimetrija ili nefelometrija te bi uzorci likvora i seruma trebali biti analizirani istovremeno pri istoj kalibraciji i kontroli da bi se zadržala minimalna analitička varijabilnost. Albumin je stabilan u likvoru jedan tjedan na sobnoj temperaturi, a kad se skladišti na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabilan je do nekoliko mjeseci, dok je zamrznut na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabilan i do 2 godine. Koncentracijski kvocijent Q_{Alb} je prihvaćen kao najbolji pokazatelj disfunkcije KLB-a, jer većavrijednost Q_{Alb} uzrokuje i veći poremećaj u funkciji barijere, odnosno brzini izmjene likvora. Zbog smanjene brzine izmjene likvora dolazi do pojačanog ulaska ostalih proteina iz krvi u likvor, čime se povećavaju njihovi koncentracijski kvocijenti Q . Referentni interval za nepropusni KLB kod odraslih povezan je s omjerom albumina u likvoru i serumu i iznosi $Q_{Alb} < 8,0 \times 10^{-3}$. Granična vrijednost Q_{Alb} (Q_{limAlb}) ovisna je o dobi (Tablica 5-1.). Za djecu mlađu od 15 godina ne izračunava se Q_{limAlb} dok je granična vrijednost Q_{limAlb} za ispitanike starije od 15 godina

predstavljena formulom:

$$Q_{limAlb} = \left(4 + \frac{dob}{15}\right) \times 10^{-3}$$

Tablica 5-1. Prikaz graničnih vrijednosti Q_{Alb} (Q_{limAlb}) ovisan o dobi bolesnika

Dob (godine)	$Q_{Alb} (Q_{limAlb}) \times 10^{-3}$
Novorođenčad	8,0 - 28,0
1 mjesec	5,0 - 15,0
2 mjeseca	3,0 - 10,0
3 mjeseca	2,0 - 5,0
4 mjeseca - 6 godina	0,5 - 3,5
7 – 15 godina	< 5,0
15 – 60 godina	5,0 - 8,0
60 – 90 godina	8,0 - 10,0

Bolesnici istih godina imati će istu graničnu vrijednost Q_{limAlb} . Međutim, ova formula još uvijek daje povišene rezultate kod 15 % pacijenata kojima nije dokazan nikakav neurološki poremećaj bilo kliničkim i laboratorijskim putem ili slikovnom tehnikom. Postoji nekoliko istraživanja na normalnom Q_{Alb} koja su zabilježila više graničnih vrijednosti. Vrijedi zabilježiti da na Q_{Alb} može utjecati tjelesna težina ili indeks tjelesne težine koji također doprinosi velikoj interindividualnoj varijabilnosti unutar iste dobne skupine. Funkcija barijere smatra se očuvanom ukoliko je $Q_{Alb} < Q_{limAlb}$. Abnormalno povećanje Q_{Alb} događa se u raznim neurološkim bolestima upalnog i neupalnog karaktera. Blago do osrednje povećanje Q_{Alb} ($8,0 - 25,0 \times 10^{-3}$) primjećuje se u mnogim bolestima kao dijabetičke imunosno posredovane polineuropatije, virusnom meningitisu ili patologiji vertebralnog diska, dok su srednja do ozbiljna povećanja Q_{Alb} ($> 25,0 \times 10^{-3}$) povezana s gnojnim meningitisom, akutnom lajmskom neuroboreliozom,

neurotuberkulozom, imunosno posredovanim poliradikulitisom i mijelitisom ili teškom stenozom spinalnog kanala, što je prikazano u Tablici 5-2.

Prilikom određivanja koncentracije albumina i imunoglobulina u serumu i likvoru, koriste se različite formule za procjenu funkcije barijere, a formule koje se preporučuju temelje se na hiperboličnoj i eksponencijalnoj funkciji.

Tablica 5-2. *Spektar bolesti povezan s blagim, srednjim i težim povećanjima Q_{Alb}*

Povišeni Q_{Alb}	Neurološke bolesti
$< 12,5 \times 10^{-3}$	Optički neuritis, Bellova paraliza, demencija, depresija, idiopatski Parkinsonov sindrom, migrena, shizofrenija, tenzijska glavobolja
$< 15,0 \times 10^{-3}$	Amiotrofična lateralna skleroza, atipični Parkinsonov sindrom, dijabetička polineuropatija, epileptički napad, ishemijski udar, blaga spinalna stenoza, hidrocefalus normalnog tlaka, transverzalni mijelitis, virusni meningitis
$< 20,0 \times 10^{-3}$	Tumor mozga, srednja spinalna stenoza, virusni encefalitis
$< 35,0 \times 10^{-3}$	Guillain-Barréov sindrom, kronična upalna demijelinizirajuća poliradikuloneuropatija, <i>Herpes Simplex encefalitis</i>
$25,0 - 100,0 \times 10^{-3}$	Lajmska neuroborelioza, neurotuberkuloza, gnojni meningitis, teška spinalna stenoza, encefalitis uzrokovan krpeljom

5.3. Intratekalna sinteza proteina

Intratekalna sinteza protutijela može se dokazati u čitavom nizu neuroloških bolesti, od akutnih i kroničnih infekcija, autoimunih bolesti, neurodegenerativnih bolesti, ali i kod zdravih osoba. U normalnim uvjetima, antitijela unutar SŽS-a su krvnog porijekla i ulaze u SŽS kroz KMB i KLB, i to primarno kroz KLB. Intratekalna, lokalna sinteza protutijela u SŽS-u počinje od perivaskularnih infiltrata B-limfocita koji proliferiraju i lokalno sazrijevaju.

Mogući uzroci koji su osnova pojave intratekalnih antitijela su:

- a) Stvarni upalni proces SŽS-a, kojeg karakterizira povećani broj stanica u likvoru i povećana vaskularna permeabilnost barijera
- b) Infekcije u dalekoj prošlosti s ustrajnim imunosnim odgovorom, koji nije važan za trenutne kliničke simptome. Ove infekcije karakterizira odsutnost disfunkcije barijere te niski IgM titrovi u serumu
- c) Polispecifični intratekalni imunosni odgovor povezan s kroničnim upalnim bolestima SŽS-a bez prisutnosti odgovarajućih antigena (MS, kronične infekcije SŽS-a, sistemske autoimune bolesti koje uključuju SŽS).

Intratekalna humoralna aktivnost ima svoje karakteristične značajke od kojih su neke važne u likvorskoj dijagnostici subakutnih i kroničnih upala SŽS-a i njihovoj diferencijalnoj dijagnozi:

- 1. Lokalno stvorena frakcija protutijela može biti i do 90% od ukupne količine protutijela u likvoru. Ova se protutijela najčešće prikazuju u likvoru kao uske oligoklonske vrpce tj. oligoklonski imunoglobulini, što olakšava dokazivanje intratekalne sinteze protutijela.
- 2. Također, stvaraju se protutijela visokog i niskog afiniteta (tj. specifičan tip humoralnog odgovora i polispecifičan tip odgovora koji se očituje kroz MRZ reakciju u likvoru).
- 3. Za razliku od krvi ne dolazi do klasične konverzije u sintezi protutijela klase IgM→IgG zbog čega se tako određeni tip intratekalnog humoralnog odgovora po klasama protutijela može zadržati dulje tijekom bolesti (profil humoralnog odgovora koji više odgovara patomehanizmu bolesti, a ne stadiju bolesti).
- 4. Infekcije SŽS-a mogu potaknuti rani i vrlo snažni intratekalni humoralni imunosni odgovor i sintezu specifičnih protutijela, međutim u nekim slučajevima intratekalna sinteza specifičnih protutijela može zaostati unutar SŽS-a i godinama poslije primarne infekcije i izlječenja same bolesti, zbog čega je jedna od značajki intratekalne humoralne aktivnosti - dugotrajna sinteza protutijela i spora normalizacija.
- 5. Tijekom imunosne aktivnosti, unutar SŽS-a može doći do dugotrajne stimulacije ograničenog broja klonova memorijskih B-limfocita koje se diferenciraju u plazma stanice. Plazma stanice proizvode protutijela ograničene heterogenosti. Sva ta protutijela prepoznaju različite epitope, ali na istom antigenu. U upalnim bolestima SŽS-a uz

specifična protutijela na uzročnika bolesti postoji i udio protutijela različite antigeničnosti što odražava polispecifični imunosni odgovor. Oligoklonski imunoglobulini u kroničnim upalnim bolestima SŽS-a primarno odražavaju polispecifičnu, a tek onda oligoklonsku narav imunosnog odgovora.

Intratekalna sinteza protutijela može se dokazati različitim laboratorijskim postupcima. Mnogo češće se može dokazati kvalitativnom metodom IEF-a s imunofiksacijom, kojom se nalaz prikazuje u obliku OB-ova, nego kvantitativnim analizama i evaluacijom imunoglobulinskog kvocijenta u Reibergramu. MRZ reakcija dokazuje polispecifični, intratekalni humoralni imunosni odgovor na neurotropne viruse te poboljšava specifičnost kod bolesnika s MS-om s pozitivnim OB-om.

5.4. Matematički model za procjenu očuvanosti KLB i intratekalne sinteze

Proteini u likvoru su važan pokazatelj neuropatoloških zbivanja u SŽS-u, od oštećenja KLB-a do odvijanja različitih lokaliziranih upalnih i autoimunih reakcija. Normalni likvor sadrži nisku koncentraciju svih imunoglobina. Već prethodno je istaknuto da se Q_{Alb} koristi kao mjera očuvanosti KLB-a, a ujedno predstavlja i temelj za kvantifikaciju intratekalno sintetiziranog IgG-a. Povezanost Q_{Alb} i koncentracijskog kvocijenta IgG CSF/serum (Q_{IgG}) doveo je do razvoja $IgG_{indeksa}$ koji služi za procjenu intratekalne sinteze IgG-a:

$$IgG_{indeks} = \frac{Q_{IgG}}{Q_{Alb}}$$

U ovom matematičkom modelu pretpostavlja se da postoji linearna povezanost između Q_{Alb} i Q_{IgG} . Ovaj model bio je predmet rasprave mnogih znanstvenika koji su tvrdili da se veza između Q_{Alb} i Q_{IgG} bolje objašnjava hiperboličkom formulom. Također su hiperboličke formule bile razvijene za procjenu intratekalne sinteze IgA i IgM. Međutim, hiperbolički model nije bio univerzalno prihvaćen jer su drugi znanstvenici prijavili da je veza između Q_{Alb} i Q_{IgG} linearna ako je dvostruko logaritamska te da ne postoje statistički podaci koji ukazuju da je bolja hiperbolična formula. Dvostruka logaritamska veza

između Q_{Alb} i Q_{IgG} je dovela do razvoja produženog $IgG_{indeksa}$ (IgG_{EI}), a kasnije se razvio i produženi indeks za IgA i IgM .

$$Ig_{EI} = \frac{Q_{Ig}}{Q_{Alb}^a}$$

IgG $a = 1,12$; IgA $a = 1,15$; IgM $a = 1,9$

Međutim, linearna formula $IgG_{indeksa}$ daje lažno pozitivne rezultate pri višim vrijednostima Q_{Alb} , kad dolazi do izražene disfunkcije barijere odnosno usporene izmjene likvora. S porastom ukupnih proteina u likvoru, odnos Q_{Alb} i Q_{Ig} se mijenja te više nije linearan. Reiber je ovaj odnos definirao kroz hiperboličnu formulu koja predstavlja gornju granicu za imunoglobulinski kvocijent Q_{Ig} .

$$Q_{Ig} = a\sqrt{(Q_{Alb}^2 + b)} - c$$

(IgG : $a = 0,93$; $b = 6,0 \times 10^{-6}$; $c = 1,7 \times 10^{-3}$)

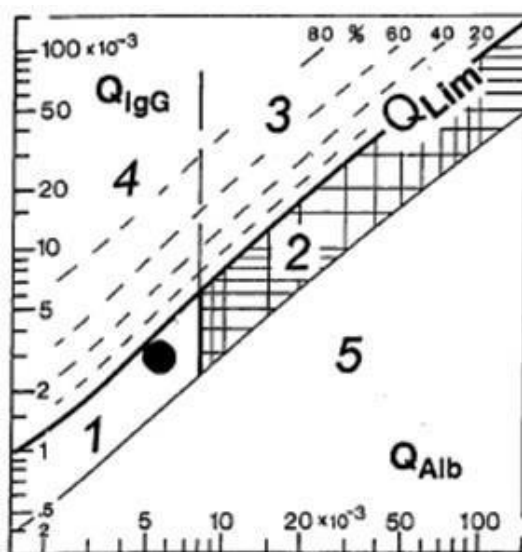
(IgA : $a = 0,77$; $b = 2,3 \times 10^{-5}$; $c = 3,1 \times 10^{-3}$)

(IgM : $a = 0,67$; $b = 1,2 \times 10^{-4}$; $c = 7,1 \times 10^{-3}$)

Smatra se da produženi indeks imunoglobulina i hiperbolična formula imaju bolju izvedbu nego konvencionalni indeks za kvantitativnu procjenu intratekalne sinteze proteina. Radi preglednosti praćenja rezultata i lakše kliničke primjene danas se sve češće koristi grafički prikaz statističko - matematičkog modela po Reiberu tzv. Reiberov model koji se temelji na odnosu albumina i imunoglobulina u likvoru i serumu, a u obzir uzima i karakteristiku KLB-a i KMB-a koja je u normalnim fiziološkim okolnostima selektivna za prolaz proteinskih molekula, dok se ta selektivnost gubi oštećenjem barijere. Reibergram olakšava procjenu funkcije KLB-a i količinu sintetiziranog IgG -a unutar SŽS-a u odnosu na ukupnu koncentraciju imunoglobulina u likvoru. Granične vrijednosti imunoglobulinskih kvocijenta Q (Q_{lim}) razgraničuju krvno podrijetlo imunoglobulina u likvoru od njegove intratekalne sinteze. Ona vrijednost koja se nalazi ispod granične linije Q_{lim} ukazuje na krvno podrijetlo ispitivanog imunoglobulina u likvoru, dok vrijednost Q_{Ig} koja se nalazi iznad granične linije Q_{lim} ukazuje na njegovu

intratekalnu (lokalnu) sintezu. Na Reibergramu (slika 5-1.) se razlikuje 5 područja koja su predstavljena kao:

1. Područje normalne funkcije barijere
2. Područje disfunkcije barijere odnosno smanjene brzine izmjene likvora
3. Područje disfunkcije barijere odnosno smanjene brzine izmjene likvora uz sintezu IgG-a unutar SŽS-a
4. Područje normalne funkcije barijere uz sintezu IgG-a unutar SŽS-a
5. Područje nesigurnog biološkog značaja koja mogu biti posljedica predanalitičkih i analitičkih grešaka



Slika 5-1. Procjena funkcije sustava barijere odnosno brzine izmjene likvora i intratekalne sinteze putem Reibergrama prilagođeno prema Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clinical Chemistry* 1995;41(2):256-63.

Gornja hiperbolička krivulja (podebljana linija) Q_{lim} predstavlja liniju razgraničenja između imunoglobulinskog kvocijenta koji ukazuje na krvno porijeklo, polje 1 i 2 koji se nalaze ispod Q_{Ig} limesa i imunoglobulinskog kvocijenta koji ukazuje na dodatnu intratekalnu sintezu imunoglobulina koji je prikazan na poljima 3 i 4 koja se nalaze iznad Q_{Ig} limesa. Polje 5 predstavlja rezultate nesigurnog biološkog značaja. Granica referentnog ranga za Q_{Alb} između normalnih i povišenih koncentracija proteina u likvoru je ovisna o dobi.

5.5. Dokazivanje oligoklonskih imunoglobulina u likvoru

Intratekalna sinteza imunoglobulina može se dokazati u čitavom nizu neuroloških bolesti od akutnih i kroničnih infekcija pa do autoimunih bolesti kao što je MS. Za razliku od krvi, unutar SŽS-a može biti lokalno stvoreno i do 90 % ukupne količine imunoglobulina koji se prikazuju u likvoru kao OB-ovi odnosno oligoklonski imunoglobulini. Tijekom imunosne aktivnosti unutar SŽS-a može doći do dugotrajne stimulacije ograničenog broja klonova memorijskih B-limfocita koji se mogu diferencirati u plazma stanice. Upravo su plazma stanice te koje proizvode protutijela ograničene heterogenosti što se očituje pojavom OB-ova u području γ globulinske frakcije. Dokazivanje oligoklonskih imunoglobulina u likvoru ukazuju na intratekalnu sintezu, te predstavljaju znak nakupljanja B-limfocita i plazma stanica u SŽS-u koje sintetiziraju protutijela IgG i IgM na određeni antigen. Ove vrpce se mogu lako uočiti u likvoru upravo zbog postojanja KLB-a te ograničenog ulaska plazmatskih proteina.

Europski Odbor za usklađeno djelovanje kod MS-a je zaključio da dokazivanje OB-ova metodom IEF-a predstavlja najosjetljiviji test za detekciju humoralnog imunosnog odgovora. OB-ovi se analiziraju metodom IEF-a na agarozu uz obveznu karakterizaciju IgG OB-ova postupkom imunofiksacije. Metodom IEF-a moguće je dokazati čitav niz IgG vrpce u likvoru, ali i u serumu. IEF se može zamisliti kao separacija IgG-a na osnovu različitih izoelektričnih točki. Važno je isključiti vrpce koje su nastale artefaktom, što se praktično može uraditi usporedbom nekoliko uzoraka seruma različitih pacijenata. Vrpce koje se nalaze na istoj izoelektričnoj točki u svim uzorcima iste serije izoelektričnog fokusiranja s imunofiksacijom su najvjerojatnije artefakti koje proizvode amfoliti korišteni za separaciju. Što je veći broj artefakta, teže je prepoznati ne samo abnormalne serumske vrpce, nego i vrpce u likvoru. Izbor komercijalnog dostupnih amfolita je važniji od izbora medija (npr. agaroz ili poliakrilamid).

U nalazima analize likvora potrebno je oprezno interpretirati kvalitativne, kao i kvantitativne rezultate. Kod sagledavanja rezultata IEF-a valja pažljivo uočavati izgled i broj proteinskih frakcija - je li frakcija poliklonalna (bez oštih vrpce, difuzna), monoklonalna (paraproteinska vrpca) ili oligoklonalna (više oštih vrpce). Prema međunarodnom dogovoru o

interpretaciji nalaza oligoklonskih IgG-ova u likvoru i serumu rezultati nalaza se izražavaju na sljedeći način (slika 5-2.):

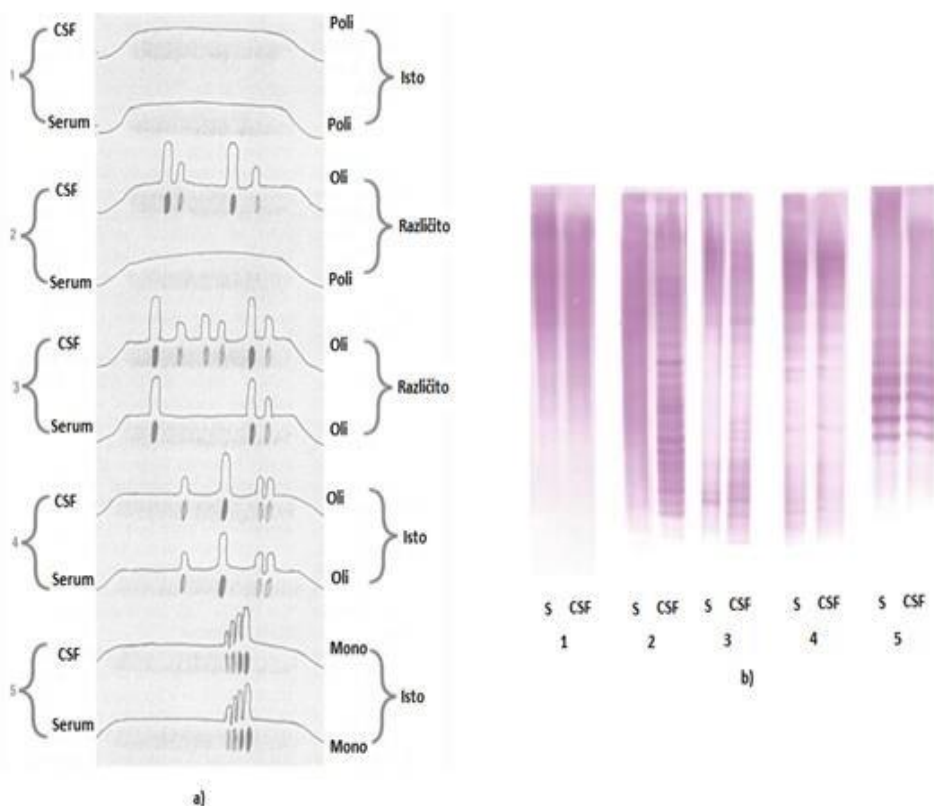
- **Tip 1** - predstavlja normalan nalaz
- **Tip 2** - predstavlja intratekalnu sintezu IgG-a jer se dvije ili više vrpce nalazi samo u likvoru
- **Tip 3** - predstavlja nalaz intratekalne sinteze jer se mnogo vrpce IgG-a nalazi u likvoru, a neke od njih prisutne su i u serumu
- **Tip 4** - predstavlja nalaz bez intratekalne sinteze koji upućuje na sistemske bolesti gdje su identične vrpce prisutne i u likvoru i u serumu (zrcalna slika)
- **Tip 5** - predstavlja nalaz koji upućuje na monoklonsku gamopatiju gdje su jako izražene vrpce zrcalno prisutne i u likvoru i u serumu.

Od pet tipova uzoraka vrpce, samo uzorci 2 i 3 predstavljaju lokalnu, intratekalnu sintezu IgG-a unutar SŽS. Slika 5-2. prikazuje primjere pet tipova uzoraka.

Međutim, otkriće oligoklonskih vrpce putem IEF-a nije specifično za MS. Svoju maksimalnu vrijednost otkriće doseže tek u diferencijalnoj dijagnozi kada se isključe svi drugi poznati uzroci upale SŽS-a.

Analiza IgA kvalitativnom ili kvantitativnom metodom je od male značajnosti za laboratorijski podržanu dijagnozu MS-a. Snažna intratekalna IgA produkcija može ukazivati na drugačiju dijagnozu koja nije MS.

Intratekalna produkcija IgM vrpce kod pacijenata s MS-om je manje učestala nego intratekalna produkcija IgG vrpce.



Slika 5-2. Prikaz 5 tipova uzoraka svrstanih po međunarodnom dogovoru modificirano prema Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(8):897–902.

a) Dijagram prikazuje idealizirane uzorke likvora i seruma dobivene putem IEF-a. Pojam „Različito“ označava intratekalnu IgG sintezu. Denzitometrijski skenovi uzoraka prikazuju različite optičke gustoće (relativne količine proteina po vrpce). Tip 1 je normalan, tip 2 i tip 3 se prezentiraju u MS-u s tim da se tip 3 može naći i u sistemske bolesti kao sarkoidoza. Tip 4 se prezentira u sistemske upali kao Guillain-Barré sindrom. Tip 5 se prezentira u mijelomu ili monoklonske gamopatiji neutvrđenog značaja. pH gradijent je od 6-9, a katoda se nalazi na desnoj strani. Poli – poliklonalno; Oli-oligoklonalno; Mono-monoklonalno

b) Laboratorijski nalaz IEF-a s imunofiksacijom. Nalaz se svrstava prema već navedenom međunarodnom dogovoru u 5 tipova kako je opisano pod slikom 3. a). S - serum; CSF - cerebrospinalna tekućina – likvor modificirano prema Sellebjerg F. *Immunoglobulins in Cerebrospinal Fluid*. U: Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE, Tumani H. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*. 1. izdanje. Berlin: Springer, 2015. str. 116-26.

5.5.1. Razlike u metodama određivanja oligoklonskih vrpce

Oligoklonske vrpce predstavljaju zlatni standard za otkrivanje intratekalne sinteze IgG-a te su uključene u posljednju reviziju McDonaldovih kriterija iz 2017. godine kao zamjena za kriterij ispunjavanja DIT-a. Pri ispitivanju osjetljivosti OB-ova postoje različite metode. U svim metodama detekcije OB-ova, najveća osjetljivost postiže se odvajanjem imunoglobulina IgG-a u likvoru i serumu pomoću izoelektričnog fokusiranja. Metoda se izvodi na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu u pH gradijentu od 6-10. Za vizualizaciju razdvojenih imunoglobulina koriste se različite tehnike kao što su bojenje srebrom, imunofiksacija i imunoblot. Za imunofiksaciju i imunoblot koristi se anti IgG koji se veže za Fc dio razdvojenog IgG-a nakon čega slijedi vizualizacija uz pomoć peroksidaze vezane na anti IgG-antitijelo koja vrši pretvorbu kemijskog supstrata. Na taj način se povećava osjetljivost metode, olakšava vidljivost vrpce i interpretacija. Za bojanje srebrom poliakrilamidni gelovi su impregnirani ionima srebra koji se reduciraju u elementarno srebro. Oligoklonske vrpce odražavaju polispecifičnu narav imunskog odgovora ograničenog broja klonova B-limfocita, a nalaz se interpretira prema međunarodnom dogovoru po tipovima od 1 do 5, gdje tip 1 predstavlja normalan nalaz, dok tip 2 (više OB-ova u likvoru) i tip 3 (više OB-ova od kojih su neke i u serumu) upućuju na intratekalnu sintezu. Serum i normalni likvor pokazuju difuzan imunoprecipitat IgG-a u području pH 6-10. Do danas ne postoje istraživanja koja su uspoređivala osjetljivost različitih metoda vizualizacije OB-ova. No, većina istraživanja koja su za određivanje OB-ova koristila poliakrilamidne gelove i bojanje srebrom pokazala su bolju izvedbu s višim postotkom dijagnostičke osjetljivosti kod MS pacijenata.

5.6. Slobodni laki lanci imunoglobulina u krvi i likvoru

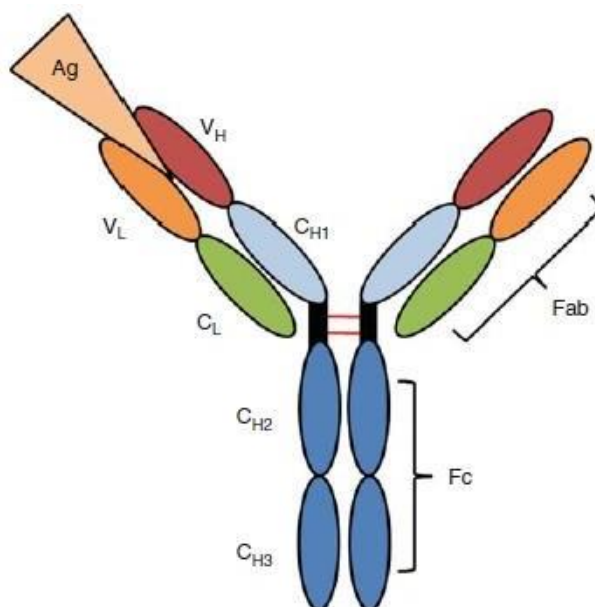
Za vrijeme upale SŽS-a nerijetko se odvija sinteza intratekalnih imunoglobulina. S obzirom da KMB uvelike sprječava prelazak imunoglobulina u krv, oni se postupno nakupljaju u likvoru. Plazma stanice koje se nalaze u intratekalnom prostoru, uglavnom izlučuju IgG. Produkcija imunoglobulina uz produkciju slobodnih lakih lanaca (FLC, engl. *free light chains*) dio je humoralnog imunskog odgovora.

Osnovnu jedinicu građe imunoglobulina (Slika 5-3.) čine dva para istovrsnih polipeptidnih lanaca, koji se razlikuju po broju aminokiselina. Laki

lanci sastavljeni su od 220, a teški od 440 aminokiselina. Sva četiri lanca povezana su međusobno disulfidnim vezama u osnovnu četverolančanu jedinicu. U osnovi, imunoglobulini su sastavljeni od 2 teška lanca i 2 laka lanca. Laki lanci se mogu svrstati u dvije skupine:

- a) kapa (KFLC, engl. *kappa free light chains*)
- b) lambda (LFLC, engl. *lambda free light chains*)

Oba su lanca zastupljena u svim razredima i podrazredima imunoglobulina, ali tako da su u istoj molekuli, oba laka lanca jednaka ili kapa, ili lambda, ali nikad zajedno i kapa i lambda.



Slika 5-3. Shematski prikaz molekule Ig prilagođeno prema Sellebjerg F. *Immunoglobulins in Cerebrospinal Fluid*. U: Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE, Tumani H. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*. 1. izdanje. Berlin: Springer, 2015. str. 116-26.

Laki lanac (V_L i C_L) te domene V_H i C_{H1} sačinjavaju Fab fragment Ig-a koji veže antigen, dok C_{H2} i C_{H3} domene sa dva teška lanca formiraju Fc fragment. V_L – varijabilni dio lakog lanca, V_H – varijabilni dio teškog lanca, C_L – konstantni dio lakog lanca, C_{H1} – C_{H3} – tri domene konstantnog dijela teškog lanca.

Kod interpretacije nalaza abnormalni se imunoglobulini procjenjuju na temelju paralelnog podatka o imunoglobulinima iz seruma zbog mogućeg difundiranja iz krvi u likvor. Također, ako postoji upala moždanih ovojnica, serumski protein će lakše ući u likvor i neće biti samo intratekalnog podrijetla. Stoga se mjerenja proteina u likvoru izvode uvijek u odnosu na mjerenja serumskih proteina. Kad procijenjujemo produkciju imunoglobulina u likvoru, stavljamo u omjer koncentraciju imunoglobulina u likvoru i krvi te koncentraciju albumina u likvoru i krvi iz razloga što se albumin nikad ne sintetizira u mozgu. Premda se čini jednostavnim paralelno kvalitativno usporediti rezultate elektroforetskog razdvajanja seruma i likvora, metoda zahtijeva puno vremena i vrlo iskusnog analitičara.

Zbog navedenih teškoća i nastojanja da se pronađe pouzdan biljeg koji se može u kraćem vremenu kvantificirati, standardizirati i automatizirati te koji neće biti ovisan o vrsnosti analitičara, istražuju se FLC imunoglobulina koji se sintetiziraju i nakupljaju u likvoru zajedno s intaktnim imunoglobulinima. Zbog svoje veličine i niskih serumskih koncentracija, ne ulaze u značajnim količinama iz krvi u likvor. Detekcijske metode za slobodne lake lance u likvoru uključuju IEF, kvantifikaciju putem enzimskih/radio-imunotestova i nefelometrije, no rezultati nisu bili od općeg interesa.

Međutim, razvojem jednostavnih nefelometrijskih testova za detekciju FLC-ova pojavio se obnovljeni interes za njihova mjerenja u likvoru. Ovaj test pokazuje željene značajke kvantitativnog pristupa i praktične primjene automatskih analizatora.

Nefelometrija kao kvantitativna metoda koja ima provjerene kalibratore i kontrolne uzorke, osiguranu preciznost i ponovljivost u ujednačenim analitičkim uvjetima analitičkih instrumenata te daje pouzdane i egzaktne rezultate, već je zaživjela u kliničkoj praksi za dijagnostiku i praćenje multiplog mijeloma.

U istraživanju bolesti SŽS-a te analizom likvora otkrivene su povišene koncentracije FLC-a, osobito KFLC-a. Dosad je već nekoliko istraživanja prikazalo i povećane koncentracije FLC-a u likvoru kod pacijenata s MS-om i CIS-om gdje je naročito povišena koncentracija KFLC-a te promijenjen njihov omjer likvor/serum (κ kvocijent).

5.6.1. Povijest slobodnih lakih lanaca

Slobodni laki lanci su otkriveni prije nešto više od 170 godina kada je Henry Bence Jones opisao protein koji se taložio dodatkom dušične kiseline u mokraći kod pacijenta s jakim bolovima u kostima. Ovi Bence Jonesovi proteini postali su važan dijagnostički marker kod pacijenata s multiplim mijelomom. Više od 100 godina nakon otkrića, Bence Jonesov protein identificiran je kao monoklonski FLC. U početku, razvojem laboratorijskih metoda, FLC-ovi su se određivali elektroforetskom metodom uz imunofiksaciju, međutim niska koncentracija FLC-a nije bila detektibilna te su se rezultati mogli samo kvalitativno odrediti. Pokušaji kvantificiranja FLC-a u početku su bili onemogućeni zbog poteškoća u proizvodnji antitijela koje je specifično za FLC i koje pri tome unakrsno ne reagira s lakim lancima intaktne molekule imunoglobulina. Bradwell i suradnici uspjeli su odvojiti lake lance od teških lanaca te dobiti antitijela usmjerena na jedinstvene epitope FLC-a koja su inače normalno skrivena u konformacijskoj strukturi intaktnog imunoglobulina. Ovakva specifična protutijela su se mogla koristiti za razvoj testova koji su osjetljiviji od prethodnih kvalitativnih metoda. Danas se FLC-ovi mogu mjeriti i u serumu i u likvoru upotrebom dvaju vrsta detekcijskih protutijela: poliklonskih i monoklonskih.

5.6.2. Kapa i lambda slobodni laki lanci

Slobodni laki lanci obećavajući su biomarkeri za otkrivanje intratekalne upale kod pacijenata sa upalnim bolestima SŽS kao što je multipla skleroza. Dijagnostička upotreba ovog biomarkera, posebno kapa izoforme, KFLC, istražuje se više od 40 godina. Dogovor o ispravnoj metodi za procjenu koncentracije KFLC još uvijek nije postignut. S obzirom da su slobodni laki lanci dijelovi intaktnih imunoglobulina, pretpostavljeno je da bi oni mogli biti biomarker upalne aktivnosti. Intaktna molekula imunoglobulina sastoji se od dva identična teška lanca i dva kovalentna laka lanca. Sinteza teških i lakih lanaca kao i imunoglobulina odvija se u B-stanicama i plazma stanicama. Lakilanci formirani su od različitih fragmenata te u molekuli imunoglobulina doprinose mjestu vezanja antigena. Kod zdravih pacijenata, laki lanci se proizvode u prekomjernoj količini, no koncentracija takvih nevezanih slobodnih lakih lanaca je jako niska. Pojavljuju se u dvije izoforme, kapa, koji

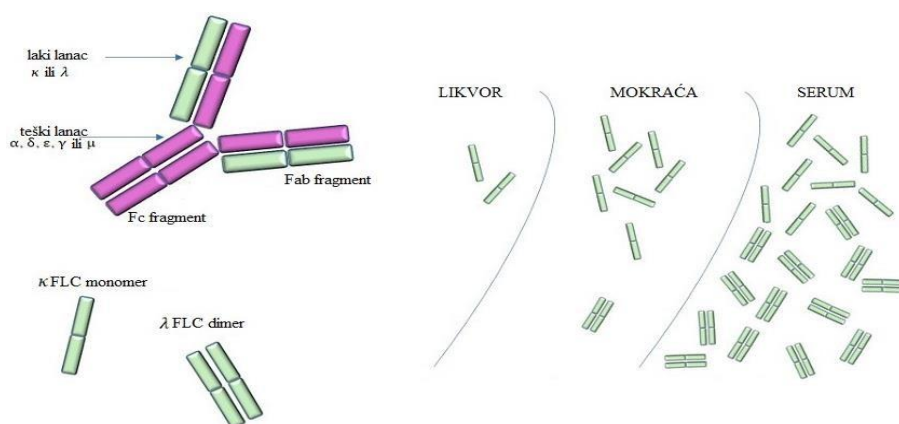
se uglavnom nalaze u monomernom obliku, i lambda, koji se češće promatraju u dimernom obliku. Glavno kataboličko mjesto lakih lanaca su bubrezi. S obzirom da bubrezi osiguravaju proteolizu lakih lanaca i njihovo izlučivanje putem mokraće, izrazito povećane koncentracije lakih lanaca oštećuju bubrege. Povećane koncentracije lakih lanaca u serumu mogu biti rezultat dvaju patofizioloških različitih mehanizama:

- 1) Pojačane sinteze
- 2) Smanjenog klirensa

Pojačana sinteza može se pronaći u različitim bolestima kao što su monoklonska gamopatija, primarna sistemska amiloidoza, sistemski eritematozni lupus, dok smanjeni klirens može biti posljedica kako ovih bolesti, tako i promjena unutar samog bubrega. KFLC i LFLC mogu se otkriti nefelometrijom, turbidimetrijom i ELISA testovima. Dok se KFLC u likvoru smatra učinkovitim alternativnim dijagnostičkim pristupom za MS, LFLC u likvoru je dobio sam ograničenu pažnju znanstveno-istraživačke zajednice. Kod pacijenata sa MS-om i CIS-om, osjetljivost KFLC za otkrivanje intratekalne sinteze imunoglobulina pokazala se boljom od LFLC-a. Dijagnostička osjetljivost i specifičnost KFLC-a u bolesnika s MS-om bila je 90%, dok je kod LFLC-a iznosila 69%, odnosno 84%. Koristile su se različite metode za procjenu graničnih vrijednosti zbog čega je došlo do nastanka širokog raspona ovih parametara. U svim istraživanjima, rezultati KFLC mjerenja otkrili su bolju korelaciju s OB-om od LFLC-a. Tako je i pokazano da je pozitivna MRZ reakcija (pozitivan ASI za najmanje dva virusa) povezana s višim vrijednostima KFLC-a, dok nije uočena korelacija LFLC-a i pozitivne MRZ reakcije. Stoga se mjerenje KFLC-a više preferira u istraživanjima u usporedbi s LFLC-om u dijagnozi MS-a. Također, rezultati za LFLC su kontroverzniji od onih za KFLC. Neki autori ukazuju na veći broj pacijenata s pozitivnim LFLC-om u odnosu na KFLC, što se objašnjava činjenicom da LFLC ima tendenciju dimerizacije gdje dimer ne prelazi KLB te imaju značajno produžen biološki život u likvoru. Ovo je znak da su i vrlo slabi upalni događaji dovoljni za povećanje koncentracije LFLC-a. Također postoje istraživanja koja nisu uopće uspjela otkriti koncentracije LFLC-a kod većine pacijenata što se može objasniti činjenicom da se lambda polimeri mogu odstraniti iz uzorka putem visokog centrifugiranja. Stoga, predanalitička obrada uzorka igra konačnu i važnu ulogu u vrijednosti LFLC-a.

5.6.3. Slobodni laki lanci u drugim tjelesnim tekućinama

Malo istraživanja se bavilo dijagnostičkom koristi slobodnih lakih lanaca u drugim tjelesnim tekućinama kao što je mokraća (slika 5-4.). Otkriveno je da se slobodni laki lanci češće mogu naći u mokraći pacijenata s MS-om u odnosu na druge neupalne bolesti, pogotovo ako dođe do recidiva. Slobodni laki lanci u mokraći potječu iz krvi, stoga njihova povišena koncentracija u mokraći teoretski ukazuje na njihovu visoku koncentraciju u serumu ili na bubrežnu disfunkciju. Niti povišene koncentracije FLC-a, niti oštećenje bubrežne funkcije nisu karakteristični za pacijente s MS-om zbog čega je dijagnostička iskoristivost slobodnih lakih lanaca u mokraći kod ovih pacijenata umanjena. Daljnji problemi u korištenju drugih tjelesnih tekućina koji nisu likvor i serum uključuju nedostatak predanalitičkih standarda. Osim toga, ne postoji suglasnost među istraživačima koja izoforma slobodnih lakih lanaca je od veće koristi, ili kapa ili lambda. S obzirom na širok raspon koncentracije slobodnih lakih lanaca u mokraći, ograničena je njihova dijagnostička vrijednost. Također, slobodni laki lanci istraživani su u suznoj tekućini i u slini gdje su nađene povećane koncentracije slobodnih lakih lanaca u usporedbi s kontrolama. Analiza neinvazivno dobivenih tjelesnih tekućina bi mogla biti važna u biokemijskom praćenju pacijenata. Međutim, teorijska razmatranja i mali broj istraživanja potkopavaju ulogu slobodnih lakih lanaca u drugim tjelesnim tekućinama koje nisu likvor i serum kod pacijenata s MS-om.



Slika 5-4. Prikaz slobodnih lakih lanaca u drugim tjelesnim tekućinama modificirano prema Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B. *Free Light Chains κ and λ as New Biomarkers of Selected Diseases.* Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 9531. <https://doi.org/10.3390/ijms24119531>.

5.6.4. Utjecaj predanalitičkih čimbenika na KFLC u likvoru i serumu

Istraživani su različiti predanalitički utjecaji KFLC-a, a među njima i kontaminacija likvora krvlju. Kontaminacija likvora krvlju prikazuje pasivni prolaz molekula tijekom prikupljanja uzorka i ne treba ga mijenjati sa sintezom proteina *de novo* u mozgu. Nađeno je da kontaminacija likvora s 20 000 eritrocita ne utječe na rezultate KFLC mjerenja u likvoru.

Također likvor skladišten na sobnoj temperaturi, odnosno na temperaturi od 4 °C, nije uzrokovao značajnije promjene u koncentraciji KFLC-a u likvoru ili serumu. Na promjenu koncentraciju KFLC nije utjecao ni izbor odgovarajuće epruvete za prikupljanje uzorka.

Različiti terapijski postupci kao što je afereza s izmjenom plazme, imunoadsorpcija te primjena intravenskih imunoglobulina nisu imale utjecaja na koncentraciju KFLC-a. Međutim, otkriveno je da infuzija 2000 mg intravenskog metilprednizolona dovodi do značajnijeg smanjenja KFLC-a dok se koncentracija imunoglobulina ne mijenja, bez obzira što imunoglobulini i slobodni laki lanci imaju isto stanično podrijetlo. Moguće objašnjenje ovog fenomena je smanjena aktivnost B stanica koja dovodi do niže sinteze KFLC-a te brzog izlučivanja KFLC-a putem bubrega. Nasuprot tome, intratekalna primjena rituksimaba povećala je koncentraciju KFLC-a iako su istraživači ovaj učinak označili kao „minimalni“. Promjena u koncentraciji KFLC-a nije pronađena kod bolesnika na terapiji interferonima (IFN β -1a), kao ni u bolesnika liječenih fingolimodom i alemtuzumabom.

5.6.5. KFLC kao biomarker MS-a

U posljednja dva desetljeća dijagnostički kriteriji za MS ažurirani su 4 puta počevši s revizijom 2001. godine, zatim revizijom 2010. godine kada je likvor kao uzorak sve manje dobivao na značaju te nije bio potreban za potvrdu dijagnoze. Broj pogrešnih dijagnoza MS-a je porasla iako nema službenog dokaza da se ovaj fenomen dogodio zbog smanjenog broja pretraga u likvoru. Do pogrešne dijagnoze došlo je zbog pretjeranog i pogrešnog tumačenja nalaza MR-a. Zapravo, velika većina pacijenata s pogrešnom dijagnozom liječila se lijekovima za MS. Budući da su etiologija i specifična patogeneza MS-a nepoznate, ne postoji specifičan test za potvrdu dijagnoze, te se dijagnoza temelji na kliničkim nalazima, MR-u, analizi likvora i drugim pretragama.

Liječnicima se savjetuje da koriste sve dostupne alate kako bi optimizirali dijagnostičku točnost.

U analizi likvora, za razliku od kvantitativne intratekalne sinteze imunoglobulina, uz pomoć široko rasprostranjene Reiberove formule koja procijenjuje intratekalnu sintezu imunoglobulina, osobito IgA i IgM, te koja ima umjerenu dijagnostičku osjetljivost od 70%, kvalitativna intratekalna sinteza, koja podrazumijeva određivanje OB-ova izoelektričnim fokusiranjem s imunofiksacijom predstavlja zlatni standard i postiže visoku dijagnostičku osjetljivost i specifičnost od 90%. No, ovakva tehnika nema mogućnosti izaći iz okvira kvalitativne metode podložne subjektivnoj interpretaciji analitičara. U posljednjih nekoliko godina mnoštvo istraživanja istaknulo je vrijednost KFLC-a u likvoru kao još jednog biomarkera za intratekalnu aktivnost B- stanica kod pacijenata s MS-om.

Kvantitativna intratekalna sinteza KFLC-a podrazumijeva mjerenje koncentracije KFLC-a u likvoru i serumu nakon čega slijedi izračun KFLC indeksa ili intratekalne frakcije KFLC-a (IF-KFLC) gdje se individualne vrijednosti pacijenta uspoređuju s unaprijed definiranom gornjom normalnom granicom. Određena istraživanja procijenili su samo apsolutne koncentracije KFLC-a u likvoru, a jako malo istraživanja bavilo se kvocijentom KFLC-a (QKFLC). Pregled različitih parametara KFLC-a istraženih u MS-u prikazan je u tablici 5-3.

Tablica 5-3. Izračuni različitih KFLC parametara istraživanih u MS-u

Različiti KFLC parametri istraživani u MS-u	
1.	Koncentracija KFLC _{likvor}
2.	$Q_{KFLC} = \frac{KFLC_{likvor}}{KFLC_{serum}}$
3.	$KFLC_{indeks} = \frac{Q_{KFLC}}{Q_{Alb}}$ ili $KFLC_{indeks} = \frac{\frac{KFLC_{likvor}}{KFLC_{serum}}}{\frac{Alb_{likvor}}{Alb_{serum}}}$
4.	$IF - KFLC = \frac{KFLC_{LOC}}{KFLC_{likvor}} \times 100$ • $KFLC_{LOC} = \left(\frac{KFLC_{likvor}}{KFLC_{serum}} - KFLC_{lim} \right) \times KFLC_{serum}$ • $Q_{KFLClim} = 0,9358 \times Q_{Alb}^{0,6687}$ prema Presslaueru. • $Q_{KFLClim} = 3,1276 \times Q_{Alb}^{0,8001}$ prema Hegenu • $Q_{KFLClim} = 9,5 + 2,08 \times Q_{Alb}$ prema Senelu • $Q_{KFLClim} = 3,27 \times (Q_{Alb}^2 + 33)^{0,5} - 8,2 \times 10^{-3}$ prema Reiberu

Kod CIS ili MS pacijenata, intratekalno stvorena frakcija KFLC (IF-KFLC) veća je od 80% te bi se moglo tvrditi da je u ovakvim slučajevima zanemariva ona koncentracija KFLC-a koja potječe iz krvi. Kod parametara KFLC indeksa, IF-KFLC i koncentracije KFLC u likvoru uočena je slična dijagnostička točnost. Međutim, jako malo istraživanja se bavilo koncentracijom KFLC-a u likvoru, kao i QKFLC zbog čega se nije mogla isključiti superiornost KFLC indeksa u odnosu na ova dva parametra. No, KFLC indeks je pokazao dobro slaganje s koncentracijom KFLC-a u likvoru samo u slučaju visoke intratekalne sinteze. Kod pacijenata koji su imali nisku intratekalnu produkciju KFLC-a, KFLC indeks bio je superiorniji.

5.6.6. Granične vrijednosti KFLC parametara

Kad je potrebno odraditi neku pretragu u cilju potvrde ili isključivanja određene bolesti, od iznimne je važnosti poznavanje normalne ili referentne vrijednosti. Ovo vrijedi za testove kliničke kemije primijenjene u analizi likvora. Iznenadujuće je kako je mali napredak postignut kada su u pitanju referentne vrijednosti za bilo koje analite u likvoru. Većina laboratorija usvaja povijesne referentne vrijednosti, bez utvrđivanja vlastitih. Ako i postoje pokušaji utvrđivanja vlastitih vrijednosti u nekim laboratorijima, metode evaluacije pate od metodoloških nedostataka kao što su pristranost pri odabiru skupine, loše definirana skupina i statističke pogreške. Dostupne su različite granične vrijednosti za KFLC indeks, koncentraciju KFLC-a u likvoru kao i IF-KFLC, no mora se obratiti pozornost na to da su različita istraživanja različito postupala s rezultatima uzoraka čije su koncentracije bile nemjerljive. Neka istraživanja koristila su donju granicu detekcije, dok su druga takve nemjerljive rezultate postavila na nulu ili ih pak izostavila iz analize. Kod apsolutne koncentracije KFLC-a u likvoru, bilo da su uzorci tretirani kao nula ili da su postavljeni na donju granicu detekcije, još uvijek podrazumijevaju jasnu kliničku interpretaciju – NEMA INTRATEKALNE SINTEZE. Problem se javlja kod KFLC indeksa koji ovise o koncentraciji KFLC-a u serumu kao i Q_{Alb} . Stoga, različito rukovanje nemjerljivim koncentracijama KFLC-a u likvoru doista mogu dovesti do različitih vrijednosti KFLC indeksa, što za posljedicu ima i različite granične vrijednosti. Dijagnostička osjetljivost i specifičnost kod KFLC indeksa kretala se od 52 % do 100 % odnosno 69 % do 100 %. Granične vrijednosti KFLC indeksa bile su u rasponu od 2,4 do 20. Ovakvi neujednačeni rezultati uvjetovani su ustrojem raznih istraživanja.

Odnosno, je li gornja referentna granica u pojedinim istraživanjima određena u neupalnoj kontrolnoj skupini ili je određena da bi se mogli razlikovati pacijenti s MS-om od drugih upalnih neuroloških bolesti. S druge strane, neujednačeni rezultati uvjetovani su nestandardiziranim analitičkim postupkom (turbidimetrija ili nefelometrija) te primjenom poliklonskog (Freelite) i monoklonskog testa (N Latex) za mjerenje KFLC parametara. U istraživanju Hegena i suradnika predložena granična vrijednost za KFLC indeks iznosila je 6,1 za razlikovanje CIS/MS pacijenata u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je predložena granična vrijednost za KFLC u likvoru iznosila 0,96 mg/L.

5.6.7. Parametri KFLC-a u odnosu na OB

Širok raspon dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti za KFLC indeks i OB proizlazi iz određene heterogenosti između studija. Rezultati istraživanja ukazuju da nema znatnih razlika u dijagnostičkoj osjetljivosti i specifičnosti KFLC indeksa i OB-a za razlikovanje pacijenata s MS-om od kontrolnih skupina. Sva istraživanja se slažu najmanje u korisnosti ili podjednakoj mogućnosti KFLC-a u odnosu na elektroforetsko dokazivanje OB-a. Neki ističu dijagnostičku, prediktivnu te prognostičku vrijednost KFLC-a za konverziju CIS u MS, a drugi samo mogućnost otkrivanja intratekalne sinteze. Neupitno je da analiza KFLC parametara ima prednost u odnosu na OB, a to su: značajno brže vrijeme izvedbe testa, pouzdanija analitika koja se može standardizirati, manji zahtjev prema osoblju podložnom subjektivnoj procjeni te pouzdanija analitička kontrola kvalitete, osobito unutarnja. U početku su cijene KFLC testova bile do 30% skuplje u odnosu na IEF, dok su danas cijene ujednačene. Iako je KFLC u likvoru već uvelike zastupljen za primjenu u kliničkoj praksi, pitanje je predstavlja li on prikladnu zamjenu za OB test, te hoće li budući McDonaldovi kriteriji spomenuti intratekalnu KFLC sintezu kao moguću alternativu za OB, ili bi se možda KFLC parametri mogli koristiti za probir uz dodatno korištenje OB-a u nerazjašnjenim kliničkim slučajevima. Ako daljnja istraživanja pokažu KFLC parametre kao pouzdanu zamjenu za metodu IEF-a moglo bi se dogoditi da OB-ovi posve izađu iz laboratorija. Pozitivne KFLC parametre trebati će interpretirati s oprezom, ako je testiranje na OB negativno ili ako uopće nije napravljeno. Jedno je sigurno, izvođenje

OB testa koji u analizi likvora podržava dijagnozu MS-a ostati će obvezno, barem do sljedeće revizije McDonaldovih kriterija.

5.6.8. Predanalitika i robusnost KFLC-a

Usred traumatske lumbalne punkcije, KFLC iz likvora je mnogo manje osjetljiv na kontaminaciju krvi, u odnosu na druge proteine likvora kao što su imunoglobulini. U gotovo 90 % pacijenta, putem Reiberove formule, dolazi do lažno pozitivnih rezultata intratekalne sinteze, dok to nije slučaj za parametre KFLC-a. Ovaj fenomen se objašnjava molekularnom veličinom koja za KFLC iznosi približno 24 kDa u odnosu na veće imunoglobuline kao što je IgG od približno 150 kDa. Manje molekule pokazuju veći omjer likvor/serum, a kod umjetne kontaminacije krvi, relativno povećanje likvora je manje. Prilikom određivanja OB-ova, kontaminacija krvi uslijed traumatske punkcije smanjuje mogućnost otkrivanja blijedih vrpce te može dovesti do lažno negativnih rezultata. Također, KFLC u uzorcima seruma stabilni su najmanje 1 godinu na temperaturi -20 °C, dok istraživanja za stabilnost KFLC-a u likvoru još uvijek nedostaju. U Tablici 5-4 nalaze se prednosti i nedostaci KFLC indeksa i OB-ova.

Tablica 5-4. Usporedba KFLC indeksa i OB-ova za dijagnozu MS-a (prednosti i nedostaci)

KFLC indeks-predstavlja intratekalnu IgG sintezu, ali također i IgA i IgM sintezu	Oligoklonske vrpce-predstavljaju intratekalnu IgG sintezu
PREDNOSTI	PREDNOSTI
Visoka osjetljivost i specifičnost Visoka stabilnost u CSF-u i serumu Robusnost Laka i brza metoda određivanja Kvantitativna metoda Interpretacija rezultata neovisna o ocjenjivaču	Visoka osjetljivost i specifičnost Visoka stabilnost u CSF-u i serumu Robusnost Detekcija IgG klonalnosti u likvoru i serumu (poliklonalno, oligoklonalno i monoklonalno) Razlikovanje dva odijeljena uzorka za procjenu intratekalne IgG sinteze
NEDOSTATCI	NEDOSTATCI
Ne može razlikovati dva odijeljena uzorka (likvor i serum)	Dugotrajna, kvalitativna i tehnički zahtijevna metoda Skupa metoda Interpretacija rezultata ovisi o ocjenjivaču

5.6.9. Može li KFLC zamijeniti detekciju OB-a / Konsenzus

Međunarodni skup stručnjaka za likvorsku dijagnostiku kod pacijenata s MS-om donio je preporuke za uspostavljanje standardne procjene likvora kod ovih bolesnika. Konsenzusni dokument prvi je sastavio glavni autor Harald Hegen nakon čega je proslijeđen ostalim stručnjacima koji su pridonijeli konačnom dokumentu. Iz dokumenta je proizašlo šest preporuka koje glase:

1. Neurolozi moraju uzeti u obzir rezultate svih testova koji se izvode kao dio rutinske obrade likvora kao što su: broj bijelih krvnih stanica i diferencijacija tih stanica, kvocijent albumina, intratekalna sinteza imunoglobulina, omjer glukoze likvor/serum ili koncentracija laktata u likvoru. Sve nalaze neurolozi trebaju protumačiti zajedno s kliničkom slikom i slikovnim tehnikama.

Približno 50% pacijenata s MS-om pokazuje pleocitozu likvora s brojem leukocita do 40 stanica/ μ L gdje prevladavaju mononuklearne stanice. Funkcija KLB-a normalna je u 90% slučajeva s Q_{Alb} približno do 10. Kod većine MS pacijenata utvrđena je intratekalna IgG sinteza. Pozitivni OB-ovi prisutni su kod 95% MS pacijenata. Nalazi likvora neznatno se razlikuju među različitim stadijima bolesti-tako pacijenti s progresivnom MS-om pokazuju manji broj leukocita i rjeđu pleocitozu u likvoru. OB-ovi su prisutni u 95 % slučajeva kod MS pacijenata te 80 % CIS pacijenata. Niža prevalencija nalazi se u područjima niže geografske širine.

2. Iako se ne smatra specifičnom za bolest, pojedinačna i najinformativnija analiza u MS-u je procjena intratekalne sinteze imunoglobulina, bilo kvalitativnom detekcijom OB-ova koristeći izoelektrično fokusiranje s imunofiksacijom ili kvantitativnom metodom mjerenja KFLC-a u likvoru nefelometrijom ili turbidimetrijom.

Bez obzira na heterogenost studija, dijagnostička točnost KFLC indeksa i OB-ova su slične.

3. KFLC indeks pokazuje dobro slaganje s vrijednostima koncentracije KFLC-a u likvoru, no KFLC indeks je superiorniji kod onih pacijenata koji imaju nisku ili umjerenu intratekalnu sintezu KFLC-a.

Utjecaj koncentracije KFLC-a u serumu i Q_{A1b} doista je zanemariv kod onih pacijenata koji imaju visok doprinos intratekalne sinteze, no ovo ne vrijedi kod pacijenata s niskom ili skromnom intratekalnom sintezom. Stoga, potrebna su daljnja istraživanja koja će usporediti različite parametre KFLC-a kod pacijenata s različitim stupnjem intratekalne aktivnosti B stanica, različitim funkcijama KLB-a i različitim koncentracijama KFLC-a u serumu. Ovakva istraživanja mogla bi biti zanimljiva zbog diferencijalne dijagnoze kao što je NMOSD koji pokazuje značajnu disfunkciju barijere koja bi mogla dovesti doveće difuzije KFLC-a iz krvi u likvor, a samim time i do mogućih lažno pozitivnih rezultata ako se mjere samo apsolutne koncentracije KFLC-a u likvoru, zbog čega se KFLC indeks nameće kao bolji izbor za procjenu intratekalne sinteze.

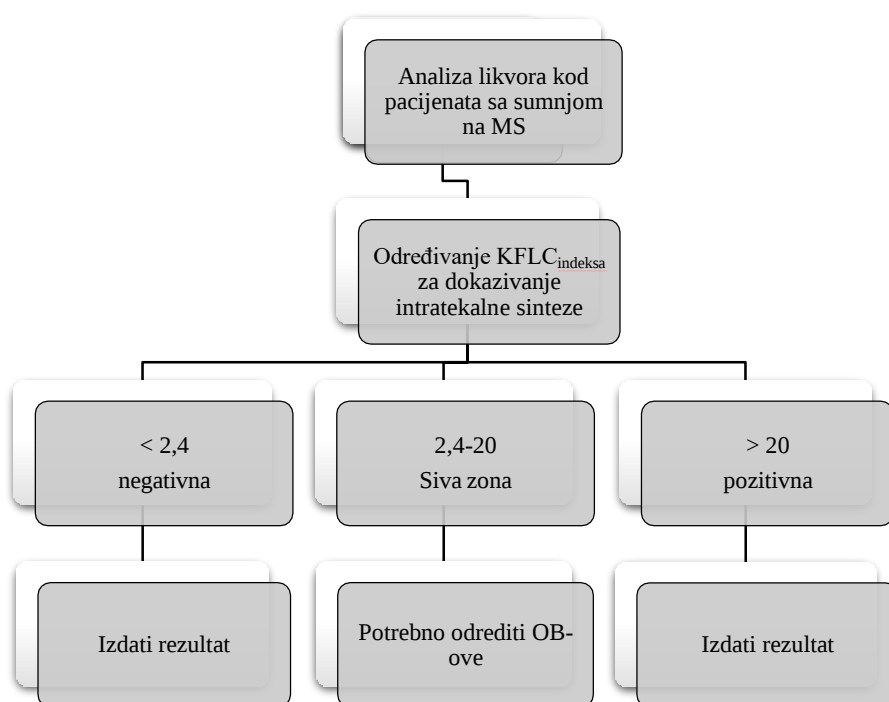
4. Postoje opsežni podaci o sličnim graničnim vrijednostima za KFLC indeks, no potrebno je provesti multicentrične studije koje koriste različite platforme i testove kako bi se potvrdile definitivne granične vrijednosti te je potrebno razviti certificirane referentne materijale.

KFLC indeks bi mogao biti manje sklon laboratorijskim varijacijama u usporedbi s apsolutnom koncentracijom KFLC-a u likvoru jer je KFLC indeks bezdimenzionalna veličina koja u svom izračunu podrazumijeva i izmjerenu vrijednost KFLC-a u likvoru kao i KFLC-a u serumu.

5. Ako su rezultati intratekalnog KFLC-a na granici, procjena OB-ova bi mogla biti od pomoći u razjašnjavanju prisutnosti intratekalne sinteze imunoglobulina (ili obratno). Dok se ne utvrdi granična vrijednost KFLC-a za intratekalnu sintezu, preporuka je da se urade oba testa.

Konsenzus predlaže „Refleksni pristup“ (slika 5-5.) gdje se određivanje

intratekalne KFLC sinteze koristi kao test probira kod pacijenata s MS-om. Refleksni pristup primjenjuje dvije granične točke koje odvajaju jasno negativne i jasno pozitivne rezultate. U slučaju da se vrijednost nađe između dvije granične vrijednosti tzv. „sive zone“, određivanje OB-ova bi trebalo uslijediti kao drugi korak. Niska granična vrijednost ukazuje da pacijenti s negativnim rezultatom doista nemaju znakove intratekalne aktivnosti B- stanica, dok visoka granična vrijednost ukazuje na pacijente s intratekalnom sintezom. Konsenzus je u „Refleksnom pristupu“ za sivu zonu KFLC indeksa predložio korištenje najniže i najviše granične točke koje su dobivene u istraživanjima. Najniža granična točka za KFLC indeks iznosila je 2,4, a najviša 20. Istraživanja koja su procjenjivali financijski dio „Refleksnog pristupa“ otkrila su da je upotreba KFLC-a kao testa probira, a nakon toga OB-a u sivoj zoni, jeftinija po pitanju reagensa i materijala. Daljnja prednost refleksnog pristupa podrazumijeva smanjeno vrijeme obrade i brže rezultate pretrage.



Slika 5-5. Shematski prikaz Refleksnog pristupa u određivanju intratekalne sinteze prilagođeno prema Hegen H, Arrambide G, Gnanapavan S, Kaplan B, Khalil M, Saadeh R, et al. *Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus statement. Mult Scler.* 2023;29(2):182-95.

6. Određivanje intratekalne sinteze KFLC-a se treba uključiti u sljedeću reviziju MS dijagnostičkih kriterija i to kao dodatni alat u mjerenju intratekalne sinteze imunoglobulina.

Istraživanja su objavila da je intratekalna sinteza KFLC-a povezana s pretvorbom CIS pacijenata u MS te da KFLC indeks predviđa vrijeme do pretvorbe u MS, kao i napredovanje onesposobljenosti. Stoga bi KFLC mogao poslužiti kao prediktivni marker u MS-u te bi u kombinaciji s MR-om mogao identificirati pacijente kojima je potrebno rano liječenje i na taj način olakšati liječnicima donošenje odluke o liječenju.

5.7. Povezanost KFLC-a sa MR mozga kod pacijenata sa MS-om

Kada je u pitanju povezanost KFLC-a ili izračunatih KFLC mjera kao što su kvocijent i indeks s MR parametrima upale SŽS-a, rezultati istraživanja su heterogeni. Negdje je primijećena značajna povezanost između povišenih koncentracija KFLC u likvoru ili KFLC indeksa i atrofije mozga/povećanja moždanih lezija, odnosno volumena T2 lezija, dok pak druga istraživanja nisu naišla na ovu povezanost. Također, rezultati su heterogeni kada je u pitanju povezanost između koncentracija KFLC-a ili KFLC indeksa i ranog invaliditeta procijenjenog EDSS ljestvicom. Visok KFLC indeks, veći od 100 na samom početku, povezan je s kraćim vremenom do klinički definitivne MS i s većom šansom za drugi klinički napad unutar 24 mjeseca od početka simptoma. Ovakvi heterogeni rezultati uzrokovani su primjenom različitih dijagnostičkih kriterija za MS, primjenom različitih metoda te različitim načinom tumačenja analiziranih rezultata.

5.8. Imunosni odgovor na neurotropne viruse i Boreliju Burgdorferi

U kroničnim upalama SŽS-a, polispecifični imunosni odgovor može se podržavati i bez prisutnosti odgovarajućeg antigena. Dokazivanje polispecifične intratekalne sinteze protutijela na neurotropne viruse (Morbili, Rubella i Varicella Zoster) poznato je pod nazivom MRZ reakcija koja je prvi put opisana 1992. godine. U sklopu MRZ reakcije izračunava se indeks specifičnih protutijela, ASI indeks, za svaki patogen. Da bi se povećala specifičnost MRZ reakcije, ASI indeks se određuje i na HSV tip 1 te na Boreliju Burgdorferi u cilju isključivanja kronične neuroborelioze. ASI indeks izračunava se iz kvocijenta specifičnih protutijela ($Q_{I_{\text{spec}}}$) i kvocijenta ukupnih protutijela iste klase imunoglobulina (Q_{Ig}) prilikom čega su ove vrijednosti već ranije izračunate putem Reibergrama. Ukoliko je Reibergramom dokazana intratekalna sinteza, umjesto kvocijenta Q_{Ig} , koriste se granične vrijednosti imunoglobulinskih kvocijenata $Q_{I_{\text{glim}}}$.

$$ASI = \frac{Q_{I_{\text{gsp}}}}{Q_{Ig}}$$

Ukoliko je $Q_{Ig} > Q_{Iglim}$ vrijedi sljedeća jednadžba:

$$ASI = \frac{Q_{Igspec}}{Q_{Iglim}}$$

Ako je vrijednost ASI indeksa $\geq 1,5$, smatra se da je to klinički relevantan nalaz koji dokazuje intratekalnu sintezu specifičnog protutijela.

Pozitivni ASI obično ukazuje na intratekalnu sintezu protutijela na odgovarajući patogen, koji se trenutno nalazi u likvoru kod pacijenata ili je u prošlosti bio prisutan. Odsutnost DNA virusa u likvoru kod pacijenata s MS-om koji imaju pozitivan ASI postavila je hipotezu o „reakciji promatrača“, koja se opisuje kao polispecifična aktivacija B-stanica unutar SŽS-a. MRZ reakcija u kliničkoj praksi ima potencijal da pridonesu kliničkoj dijagnozi, ali njena patofiziološka uloga još u potpunosti nije jasna te zahtijeva daljnje istraživanje. Dok se pozitivna MRZ reakcija može uočiti kod pacijenata sa RRMS-om, nekoliko istraživanja je pokazalo negativnu MRZ reakciju kod pacijenata s drugim autoimunim upalnim neurološkim bolestima kao što su: neuromijelitis optika, paraneoplastični neurološki sindromi, neurosarkoidoza, akutni diseminirajući encefalomijelitis i autoimuni encefalitis. Također je MRZ reakcija negativna kod pacijenata s infektivnim bolestima SŽS-a koje mogu oponašati MS, kao Lajmska neuroboreliozna i HTLV-I – vezana mijelopatija. Istraživanja pokazuju visoku prevalenciju MRZ reakcije kod pacijenata s MS-om, a također ova reakcija poboljšava specifičnost za pacijente s MS-om koji imaju pozitivne OB-ove.

Određivanjem ASI indeksa ne određuje se jakost imunosnog odgovora u svrhu potvrde ili odbacivanja zaraze određenim virusom, nego su ovi testovi prilagođeni za otkrivanje niskih titrova koji su odraz kroničnih upala SŽS-a. Zbog toga je MRZ reakcija pozitivna u kroničnim bolestima te nije prisutna u akutnim upalnim bolestima. Pomoć u diferencijalnoj dijagnostici neuroloških poremećaja pruža paralelno određivanje više vrsta specifičnih antitijela. Povećanje ASI indeksa na samo jedan patogen više govori u prilog aktivne ili kronične infekcije tim patogenom, dok istovremeno povećanje ASI-ja za više patogena ne znači da je patogen prisutan u SŽS-u već odražava polispecifičnu imunosnu reakciju kod kronične upalne bolesti, vjerovatno autoimunog karaktera kao što je MS.

5.9. Uloga laboratorija u dijagnostici, predikciji i prognozi multiple skleroze

Multipla skleroza je promjenjiva bolest po pitanju kliničkog tijeka, prognoze i kliničkih manifestacija. Pitanje dijagnoze za liječnike može biti problematično na samom početku bolesti i to ako klinički pokazatelji nisu jasni te ako postoji sumnja na druge upalne bolesti koje mogu oponašati MS. Dokaz intratekalne sinteze, koji se može naći u čitavom nizu neuroloških bolesti može biti potpuno nevažan nalaz zbog mogućeg odjeka ranijih infekcija, ali također može biti bitan nalaz za dijagnozu ove bolesti. Nalaz OB-a je najosjetljiviji biokemijski nalaz intratekalne sinteze IgG-a, ali je vrlo nespecifičan. Kod većine bolesnika s dokazanim MS-om, broj i raspored IgG OB-ova uglavnom se ne mijenja tijekom bolesti jer su one odraz nespecifične dugotrajne imunosne stimulacije, a ne specifičnog imunosnog odgovora. Pozitivan nalaz OB-a ima visoku negativnu prediktivnu vrijednost i nisku pozitivnu prediktivnu vrijednost, što čini OB-ove osjetljivim za probir, ali se ne smatraju dobrim dijagnostičkim sredstvom. Ako je rezultat normalan, velika je mogućnost da se ne radi o dijagnozi MS-a. Podaci o prognostičkom značaju negativnih OB-ova su oprečni te ih jedni opisuju kao povoljan prognostički biljeg koji ukazuje na blaži tijek bolesti i bolji odgovor na terapiju β - interferonom, dok drugi opisuju da se s većom učestalosti negativan nalaz OB-a javlja kod bolesnika s primarno progresivnim tijekom bolesti gdje je snažniji relaps i veći stupanj invalidnosti kod bolesnika. Ako su rezultati dvosmisleni, negativni ili postoji jedan OB, a klinička sumnja na MS je vrlo visoka, treba razmisliti o ponavljanju lumbalne punkcije i to ako se pojave neurološki simptomi koji do tada nisu postojali. Neki autori smatraju da broj OB-a ima prognostički značaj te da korelira s nalazom MR-a. Pacijenti s manjim brojem aktivnih plakova i plazma stanica u bijeloj tvari i meningama imaju manji broj OB-ova. Zbog značajno bržeg vremena izvedbe testa, pouzdanije analitike koja se može standardizirati, manjeg zahtjeva prema osoblju podložnom subjektivnoj procjeni te pouzdanijoj analitičkoj kontroli kvalitete, za dokazivanje intratekalne sinteze osim OB-ova, Konsenzus za MS i likvorsku dijagnostiku predlaže i mjerenje parametra KFLC-a kao dodatnog alata u mjerenju intratekalne sinteze putem „Refleksnog pristupa“. Njihova preporuka podrazumijeva primjenu KFLC indeksa kao testa probira kod pacijenata sa sumnjom na MS te po potrebi, u nejasnim slučajevima,

određivanje oligoklonskih vrpca. U kliničkoj procjeni pacijenta sa sumnjom na MS uz dokazivanje intratekalne sinteze određuje se i MRZ reakcija koja je rijetko pozitivna u bolestima koje oponašaju MS kao što su optički neuromijelitis, neuroborelioza, paraneoplastični sindrom. Pozitivna MRZ reakcija uočena je i kod pacijenata s CIS-om koji su se konvertirali u MS. MRZ reakcija ima visoku prediktivnu vrijednost za konverziju CIS-a u MS zbog čega bi bolesnike s pozitivnom MRZ reakcijom trebalo uključiti u ranu terapiju jer je klinički izazov kod pacijenata s CIS-om identifikacija pacijenata kod kojih bi se u budućnosti mogla potvrditi dijagnoza MS-a.

5.10. Biomarkeri u MS-u

Godinama se intenzivno traga za identifikacijom dobrog biomarkera u MS-u. Što se bolest ranije otkrije, omogućen je raniji početak terapije i bolji ishod bolesti. S obzirom da bolest ima različitu kliničku prezentaciju od osobe do osobe, različit je i odgovor pacijenta na terapiju. Biomarkeri MS-a dolaze iz područja imunologije i neurobiologije zbog različitih patomehanizama ove bolesti. U idealnom slučaju biomarker za MS bi trebao biti prisutan kod osoba s MS-om, a odsutan kod zdravih osoba ili osoba koji boluju od drugih bolesti SŽS-a. Ako se bolest pogorša ili poboljša, koncentracija biomarkera trebala bi se povećati ili smanjiti. Još jedna karakteristika idealnog biomarkera je da se za njegovo otkrivanje koristi neinvazivna metoda. Analitička metoda detekcije ovih biomarkera trebala bi biti precizna i ponovljiva, a istovremeno brza, jednostavna i ekonomski isplativa. Lumbalna punkcija invazivan je postupak za pacijenta, te se pokušavaju naći biomarkeri u serumu s obzirom da je vađenje krvi rutinski postupak. Unatoč velikom broju studija i dugom popisu biomarkera kandidata, danas je vrlo mali broj biomarkera od kliničke vrijednosti. Razlog tomu je nedostatak usporedivosti i premali broj ispitanika u većini studija. Potraga za biomarkerima nije usmjerena samo na stanice i molekule imunološkog odgovora, već i na molekule koje odražavaju različite mehanizme ove bolesti. Potencijalni biomarkeri uključuju antitijela, citokine, kemokine, biomarkere diferencijalne dijagnoze, prognoze i liječenja bolesti te praćenje učinka terapije.

5.10.1. Dijagnostički biomarkeri u MS-u

Za pouzdanu dijagnozu MS-a, mnoga istraživanja su usmjerena na promjene u sastavu likvora. Ranije opisane oligoklonalne vrpce, IgG indeks i MRZ reakcija su biomarkeri MS-a u kliničkoj praksi koji se koriste za potvrdu dijagnoze. Međunarodni Konsenzus stručnjaka za MS i likvorsku dijagnostiku preporučio je određivanje KFLC-a kao dodatnog kvantitativnog biomarkera za intratekalnu sintezu. Trenutno se MS ne može dijagnosticirati laboratorijskim određivanjem jednog parametra i čini se kako to još uvijek u skoroj budućnosti neće biti moguće, već će za dijagnostiku biti potreban panel biomarkera.

Akvaporin-4 je protein vodenog kanala kojeg astrociti eksprimiraju u SŽS-u i koji ima važnu ulogu u regulaciji homeostaze vode u SŽS-u. Antitijela usmjerena na akvaporin-4 je dobar biomarker za diferencijalnu dijagnozu te se sve više koristi u kliničkoj praksi. Ova antitijela se mogu otkriti u pacijenata s NMOSD, ali ne i u pacijenata s MS-om. S obzirom da MS i NMOSD imaju preklapajuće simptome, prisustvo ovog biomarkera može isključiti dijagnozu MS-a. Međutim, ni ova antitijela nisu prisutna kod svih NMO pacijenata, stoga su potrebni dodatni biomarkeri. Kao drugi dodatni biomarker nameće se anti- MOG antitijelo. MOG je mijelinski protein eksprimiran isključivo na površini mijelinskih ovojnica i membrana oligodendrocita, te se smatra potencijalnom ciljnom molekulom za autoimuni odgovor kod demijelinizirajućih bolesti. Anti-MOG antitijelo je nađeno u likvoru pacijenata s demijelinizirajućim bolestima kao što su optički neuritis (rekurentni), encefalomijelitis, encefalitis moždanog debla i akutni diseminirani encefalomijelitis. Kod 20-25% NMOSD pacijenata nije moguće detektirati antitijela na akvaporin-4, a kod 44-50% takvih osoba dokazano je prisutnost antitijela na MOG. Zbog razlika u kliničkim značajkama, tijeku bolesti te prognozi, mnogi autori koriste naziv - bolesti vezane uz antitijela na MOG tzv. MOGAD bolesti. Anti-MOG antitijela nisu prikladna za dijagnozu i prognozu MS-a, nego za diferencijalnu dijagnozu.

Kao drugi potencijalni biomarkeri u MS-u nameću se:

- skupina citokina [interleukin (IL-6), adhezijske molekule (topljiva intracelularna sICAM i vaskularna stanična adhezijska molekula sVCAM)],
- molekule povezane s oštećenjem i obnovom [glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP) i haptoglobin]
- komponente komplementa (C1 inhibitor, C1s, C5 i faktor H)

Potrebna su daljnja istraživanja koja bi trebala procijeniti ove biomarkere i njihovu ulogu u dijagnozi MS-a.

5.10.2. Prognostički biomarkeri u MS-u

Prognostički biomarker pomaže ukazati kako se bolest može razviti kod pojedinca od trenutka kada je poremećaj već dijagnosticiran. Ovi biomarkeri su korisni kod odabira pacijenata za liječenje, ali ne predviđaju izravno odgovor na liječenje. Biomarkeri za prognozu MS mogu pružiti informacije o tijeku aktivnosti bolesti i ukazati na konverziju u drugi oblik MS-a, kao što je RRMS ili SPMS. Prognostički biljezi likvora mogu utjecati na izbor terapije za MS u trenutku kada dolazi do blage progresije bolesti. Hitinazi-3 sličan protein 1 (CHI3L1), laki lanac neurofilamenta (NfL) i kemokin CKCL13 su likvorski biomarkeri koji najviše obećavaju u predviđanju konverzije MS-a i invaliditeta.

Hitinazi-3-sličan protein 1 je glikozidaza koju luče monociti, mikroglija i aktivirani astrociti. Fiziološka uloga CHI3L1 u SŽS-u je nepoznata, no njegova distribucija u upalnim lezijama sugerira da bi mogao biti važna komponenta astrocitnog odgovora na upalu u SŽS-u. Povećana koncentracija CHI3L1 nalazi se u nekim upalnim stanjima kao što su reumatoidni artritis i sistemski eritematozni lupus. Mehanizam djelovanja CHI3L1 je nepoznat, a njegova uloga u patogenim mehanizmima MS-a još u potpunosti nije razjašnjena. Obično se nalazi u likvoru te je povezan s bržom progresijom invaliditeta. Iako se ovaj biomarker ne koristi u kliničkoj primjeni, obećavajući je biomarker prognoze i odgovora na liječenje u MS-u.

Neurofilamenti (Nf) su citoskeletni proteini koji su vrlo specifični za neurone. Sastoje se od 85% neuronskih strukturnih proteina i određuju promjer aksona. Postoji nekoliko različitih vrsta neurofilamenata koji uključuju teške lance (NfH), srednje lance (NfM) i lake lance (NfL). Ako dođe do aksonskog ili neuronskog oštećenja, neurofilamenti se oslobađaju te se mogu otkriti u likvoru i serumu. Poluživot neurofilamenata u neuronima je oko 2-3 mjeseca, što ukazuje na sporu promjenu unutar neurona. Stoga, čak i kod zdravih odraslih osoba, neurofilamenti su mjerljivi u mozgu i tjelesnim tekućinama. NfL se najviše proučava u ljudskim bolestima i o njemu se najčešće objavljuje u istraživačkim publikacijama. Budući da se neurofilamenti oslobađaju iz neurona zbog gotovo svake vrste ozljede ili bolesti, gotovo svi poremećaji i bolesti SŽS-a koji ometaju rad neurona mogu dovesti do otpuštanja

neurofilamenata u likvoru i krvi. Pacijenti s MS-om imaju povišene koncentracije NfL-a, a koncentracija NfL-a u serumu također korelira s novim MRI lezijama, stupnjem invaliditeta i stopom atrofije mozga. Nadalje, NfL je također prikladan kao biomarker za konverziju iz CIS-a u MS. Određivanje serumske koncentracije NfL-a, za koju nije potrebna lumbalna punkcija, korelira s mnogim kliničkim karakteristikama MS-a te se može smatrati budućim prognostičkim biomarkerom u kliničkoj praksi.

Kemokin CXCL13 je snažan kemoatraktant B-stanica koji igra važnu ulogu u regrutiranju B-stanica u SŽS-u tijekom upale. Povećane koncentracije ovog kemokina nalaze se u serumu i likvoru pacijenata s aktivnom bolešću MS-a, naglašavajući da bi ovaj kemokin mogao biti važan biomarker upalne aktivnosti. Utvrđeno je da koncentracije CXCL13 u likvoru koreliraju s intratekalnom sintezom imunoglobulina zbog čega je CXCL13 dobio dijagnostičku i prognostičku vrijednost u MS-u.

Drugi markeri za koje se pokazalo da imaju prognostički potencijal za u predviđanju konverzije CIS-a u MS ili iz RRMS u SPMS i lošiju prognozu bolesti uključuju oligoklonske IgM vrpce i protein 14-3-3. Dijagnostički, kao i prognostički biomarkeri u MS-u prikazani su u Tablici 5-5.

Tablica 5-5. Dijagnostički i prognostički biomarkeri u MS-u

	Dijagnostički biomarkeri	Prognostički Biomarkeri
Antitijela	↑OB ↑IgMOB ↑IgGOB	OB IgMOB IgGOB
Citokini	↑CXCL13	CXCL13
Proteini	↑14-3-3 ↑CHI3L1 ↑GFAP ↑NfL ↑NfH	14-3-3 CHI3L1 NfL NfH

5.10.3. Biomarkeri praćenja terapijskog odgovora i nuspojava

Kod MS-a, Europska komisija (EMA, eng. *European Medicines Agency*) i Agencija za hranu i lijekove (FDA, *Food and Drug Administration*) odobrili su različite terapije koje mijenjaju tijekom bolesti. Ne reagiraju svi pacijenti jednako na liječenje. Da bi svakog pacijenta mogli pravovremeno liječiti individualiziranom terapijom, potrebno je poznavati biomarkere za predviđanja terapijskog odgovora i praćenje njihove učinkovitosti.

Neutralizirajuća anti-interferon beta antitijela (anti-IFN β) se mogu stvoriti kao odgovor na većinu proteinskih lijekova i spriječiti njihov stvarni mehanizam djelovanja. Ovakva antitijela se otkrivaju u serumu. Tijekom prve dvije godine liječenja interferonom β (IFN- β), neutralizirajuća antitijela nastaju kod 40% bolesnika. Neutralizirajuća antitijela smanjuju učinak IFN- β te se sukladno tome povećava stopa relapsa, progresije invaliditeta i MRI aktivnosti. Ako se dobiju 2 pozitivna rezultata neutralizirajućih antitijela u periodu 3-6 mjeseci preporučuje se promjena terapije. Stoga anti-IFN β At predstavljaju prognostički biomarker za loš terapijski odgovor. Neutralizirajuća antitijela se mogu stvoriti i tijekom terapije natalizumabom, monoklonskim protutijelom protiv integrina $\alpha 4 \beta 1$ (drugim nazivom VLA-4 prikazanom u Tablici 2-1) i $\alpha 4 \beta 7$ na leukocitima. U 6% bolesnika liječenih natalizumabom neutralizirajuća antitijela su otkrivena barem jednom, a u više od 90% slučajeva se oni javljaju tijekom prva tri mjeseca liječenja. Ova antitijela smanjuju koncentraciju natalizumaba u serumu te su povezani sa smanjenom učinkovitošću terapije. Iako ne postoje smjernice za rutinsku upotrebu anti-natalizumab neutralizirajućih antitijela kao prognostičkih biomarkera za praćenje terapijskog odgovora, preporučuje se određivanje njihove koncentracije u periodu od 3-4 mjeseca nakon početka terapije i u slučaju recidiva. Pacijenti koji su započeli liječenje natalizumabom, terapijom koja modificira tijek bolesti (DMT), koncentracija NfL-a u likvoru bila je kao kod zdravih kontrola u periodu od 6-12 mjeseci, što upućuje da se NfL također može koristiti za praćenje učinkovitosti terapije. Također koncentracija NfL-a se smanjuje u bolesnika s MS-om nakon liječenja fingolimodom, mitoksantronom ili rituksimabom. Liječenje natalizumabom dovodi i do smanjenja CHI3L1, NfH, IL-6, IL-8, kemokina i liganda CXCL13 (Tablica 5-6.). Koncentracija CXCL13 se smanjuje u likvoru bolesnika s MS-om koji se liječe steroidima, terapijom deplecije B-stanica ili fingolimodom.

Uz klinički odgovor, nuspojave su odlučujući kriterij u uspješnosti terapije, a biomarkeri mogu biti važan alat u predviđanju i praćenju nuspojava. Infekcije uzrokovane *Varicella zoster* virusom zabrinjavaju pacijente s MS-om koji se liječe fingolimodom, alemtuzumabom i kladribinom. Zbog promijenjenog imunološkog odgovora, rizik od ove infekcije povećan je kod bolesnika koji primaju ovu terapiju. Kako bi se izbjegla aktivacija ovog virusa tijekom terapije potrebno je odrediti u serumu titar antitijela na *Varicella zoster* virus (anti-VZV) prije samog početka liječenja imunomodulacijskom terapijom u pacijenata koji nisu preboljeli vodene kozice ili nisu bili cijepljeni. Ako se u serumu ne nađu anti-VZV antitijela, potrebno je provesti cijepljenje i odgoditi početak terapije za 4-6 tjedana, kako bi se uspostavila zaštita cijepljenjem. Svim bolesnicima koji se liječe alemtuzumabom preporučuje se primjena antiherpetika. Ako se razvije infekcija u bolesnika koji prima fingolimod, potrebno ju je odmah liječiti antivirusnom terapijom prema smjernicama Centra za kontrolu bolesti i prevenciju (CDC, eng. *Centers for Disease Control and Prevention*). Više od 20 godina su dostupne terapije koje modificiraju tijek bolesti kod bolesnika s MS-om. Ovisno o načinu djelovanja pojedinih lijekova, može se povećati rizik od bakterijske, virusne, parazitske i/ili gljivične infekcije. Postojeće latentne virusne infekcije mogu postati aktivne i izazvati ozbiljnu infekciju zbog promijenjenog imunološkog sustava koji može dovesti do smanjenog antivirusnog imunološkog odgovora. Najpoznatiji je razvoj progresivne multifokalne leukoencefalopatije u pacijenata s MS-om koji su zaraženi John Cunningham virusom kao nuspojava terapije natalizumabom. Pacijenti koji imaju pozitivna antitijela na John Cunningham virus (anti-JCV antitijela) i čija vrijednost indeksa je $>1,5$ imaju povećan rizik od razvoja progresivne multifokalne leukoencefalopatije. Takve je pacijente potrebno pratiti i po potrebi promijeniti liječenje. Stoga, anti-JCV antitijela kao i JCV indeks važan su biomarker u terapiji natalizumabom.

Tablica 5-6. Biomarkeri praćenja terapijskog odgovora

	Biomarkeri praćenja terapijskog odgovora i nuspojava
Antitijela	↑Anti-JCV (natalizumab) ↑Anti-IFNβ (interferon β)
Citokini	↓CXCL13 (natalizumab, terapija B-staničnom deplecijom, steroidi, mikoksantron) ↓IL-6 (natalizumab) ↓IL-8 (natalizumab)
Proteini	CHI3L1 (natalizumab, mikoksantron, fingolimod) ↑NfL (natalizumab, terapija B-staničnom deplecijom, mikoksantron, fingolimod) ↑NfH (natalizumab)

5.10.4. Pogled u budućnost: potencijalno novi dijagnostički biomarker za MS-mikroRNA

Kako bi se unaprijedila dijagnostika MS-a istražuju se novi potencijalni biomarkeri koji će omogućiti što raniju i bolju diferencijalnu dijagnostiku, točnije otkrivanje stadija bolesti, praćenje terapije te predviđanje ishoda bolesti. Brojna istraživanja, u novije vrijeme, potvrđuju ključnu ulogu endogenih malih nekodirajućih RNA-mikroRNA (miRNA) koje se nalaze u eukariotima i reguliraju ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini vezanjem na komplementarne sekvence na 3' ili 5' UTR (engl. *untranslated region*) što obično rezultira inhibicijom translacije ili degradacijom mRNA koja dovodi do smanjenja količine proteina. Biosinteza miRNA sastoji se od niza koraka koji počinju u jezgri i završavaju u citoplazmi. MikroRNA sastoji se od 21-23 nukleotida i čine 1% ljudskog genoma. Nalazi se u mnogim tekućinama kao što su likvor, serum, majčino mlijeko, mokraća, suze, sjemenja tekućina i slina. MikroRNA je ključni regulator bioloških procesa povezanih s patofiziologijom različitih stanja kao što su tumori, autoimune, neurodegenerativne i zarazne bolesti. U SŽS-u miRNA ima u izobilju i može utjecati na razvoj, proliferaciju, diferencijaciju, plastičnost i druge stanične procese.

Nedavne studije otkrile su da postoji specifičan obrazac ekspresije miRNA u patogenezi MS-a, a abnormalna ekspresija miRNA može biti "početni čimbenik" koji dovodi do patogeneze MS-a utječući na glijalne stanice i periferne imunološke stanice.

S obzirom na visoku stabilnost miRNA u izvanstaničnom odjeljku (plazmi), njenu specifičnost za tkiva i jaku povezanost s patološkim procesima, ove male molekule mogle bi se koristiti kao biomarkeri za dijagnozu, razlikovanje podtipova i predviđanje prognoze MS-a. Istraživanja o regulaciji miRNA T limfocita uključenih u patogenezu MS-a mogla bi pomoći u razvoju novih strategija za liječenje MS-a na transkripcijskim i post-transkripcijskim razinama. Pomoću mikro-RNA nastoji se razriješiti individualizirana terapija, terapija koja će za bolesnike biti najpogodnija i najdjelotvornija, a izazivati najmanje nuspojava. No, da bi se razvio biomarker koji se temelji na miRNA za dijagnozu MS-a najvažniji preduvjet je sposobnost kvantificiranja miRNA. Problem predstavljaju niske koncentracije miRNA u tjelesnim tekućinama kao i mogućnost kontaminacije s miRNA proizašlih iz staničnih komponenti krvi tijekom hemolize ili obrade uzorka. S druge strane, miRNA su vrlo stabilne u krvi, otporne su na cirkulirajuće ribonukleaze i teška stanja poput produženog skladištenja, smrzavanja-odmrzavanja i ekstremnih pH uvjeta, zbog njihovog pakiranja u lipidne vezikule kao što su egzosomi, vezanje za protein koji veže RNA i povezanost s lipoproteinom visoke gustoće. Njihova stabilnost, zajedno s razvojem osjetljivih metoda detekcije i kvantifikacija čine ih idealnim kandidatima za novu klasu neinvazivnih, osjetljivih biomarkera. Iako miRNA ima veliku ulogu u budućnosti kao biomarker MS-a, još uvijek su potrebna daljnja istraživanja pri tome osvrćući se na probleme s njegovom koncentracijom i lako mogućom kontaminacijom.

Literatura:

1. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(8):897–902.
2. Arneth B, Kraus J. The Use of Kappa Free Light Chains to Diagnose Multiple Sclerosis. *Medicina (Kaunas)*. 2022;24;58(11):1512.
3. Barwari T., Joshi A., Mayr M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016;68:2577–84. doi: 10.1016/j.jacc.2016.09.945.
4. Bašić Kes V i sur. Multipla skleroza. Zagreb, Medicinska naklada, 2021, str. 1-62, 125.

5. Bednarova J, Stourac P, Adam P. Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2005;112:97–102.
6. Bradwell AR. Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevylite), 5th edition. University of Birmingham, 2008. str. 194-7.
7. Brettschneider J, Claus A, Kassubek J, Tumani H. Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol* 2005;252(9):1067–73.
8. Brettschneider J, Tumani H, Kiechle U, Muche R, Richards G, Lehmsiek V, et al. IgG antibodies against Measles, Rubella, and Varicella Zoster Virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. *PloS One* 2009;4:11:e7638.
9. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2008; 372:1502-17.
10. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 11;20(24):6249. DOI: 10.3390/ijms20246249. PMID: 31835747; PMCID: PMC6941098.
11. DeCarli C, Menegus MA, Rudick RA. Free light chains in multiple sclerosis and infections of the CNS. *Neurol* 1987;37:1334–8.
12. Deeken JF, Loscher W. The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res.* 2007;13:1663-74.
13. Delić-Šarac M, Izetbegović S, Karamehić J, Subašić D, Šaban A, Jukić T, et al. Detection methods of immunoglobulin IgG in CSF and serum. *Med Arch* 2013;67:5:368-71.
14. De Santis G, Ferracin M, Biondani A, Caniatti L, Rosaria Tola M, Castellazzi M, et al. Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010;14;226(1-2):165-71. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.06.009. Epub 2010 Jul 16. PMID: 20637509.
15. Felgenhauer K, Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Investig* 1992;70:28-37.
16. Festa ED, Hankiewicz K, Kim S, Skurnick J, Wolansky LJ, Cook SD, et al. Serum levels of CXCL13 are elevated in active multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2009 Nov;15(11):1271-9.

17. Fissolo N, Pappolla A, Rio J, Villar LM, Perez-Hoyos S, Sanchez A, et al. Serum Levels Of CXCL13 Are Associated With Teriflunomide Response In Patients With Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2023;10(1): e200050
18. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005;62:865-70.
19. Giles PD, Heath JP, Wroe SJ. Oligoclonal bands and the IgG index in multiple sclerosis: uses and limitations. *Ann Clin Biochem* 1989;26:317-23.
20. Godec MS, Asher DM, Murray RS, Shin ML, Greenham LW, Gibbs Jr CJ, et al. Absence of measles, mumps, and rubella viral genomic sequences from multiple sclerosis brain tissue by polymerase chain reaction. *Ann Neurol*. 1992;32:401–4.
21. Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B. Free Light Chains κ and λ as New Biomarkers of Selected Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2023; 24:9531. <https://doi.org/10.3390/ijms24119531>
22. Hegen H, Arrambide G, Gnanapavan S, Kaplan B, Khalil M, Saadeh R, et al. Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus statement. *Mult Scler*. 2023;29(2):182-95.
23. Hegen H, Berek K, Deisenhammer F. Cerebrospinal fluid kappa free light chains as biomarker in multiple sclerosis-from diagnosis to prediction of disease activity. *Wien Med Wochenschr*. 2022 Nov;172(15-16):337-45.
24. Hegen H, Walde J, Berek K, Arrambide G, Gnanapavan S, Kaplan B, et al. Cerebrospinal fluid kappa free light chains for the diagnosis of multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler*. 2023;29(2):169-81.
25. Hegen H, Walde J, Milosavljevic D, Aboulenein-Djamshidian F, Senel M, Tuman H, et al. Free light chains in the cerebrospinal fluid. Comparison of different methods to determine intrathecal synthesis. *Clin Chem Lab Med*. 2019;25;57(10):1574-86.
26. Hottenrott T, Dersch R, Berger B, Rauer S, Eckenweiler M, Huzly D, et al. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response in neurosarcoidosis, acute disseminated encephalomyelitis and

- autoimmune encephalitis compared to multiple sclerosis in a tertiary hospital cohort. *Fluids Barriers CNS*. 2015;12:27.
27. Hottenrott T, Dersch R, Berger B, Rauer S, Huzly D, Stich O. The MRZ reaction in primary progressive multiple sclerosis. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2017;14:2.
 28. Ignatova V. Biomarkers in Multiple Sclerosis [Internet]. *Multiple Sclerosis - Genetics, Disease Mechanisms and Clinical Developments* [Working Title]. IntechOpen; 2022. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.106052>
 29. Jarius S, Franciotta D, Bergamaschi R, Rauer S, Wandinger KP, Petereit HF, et al. Polyspecific, antiviral immune response distinguishes multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2008;79:1134-6.
 30. Jarius S, Eichhorn P, Jacobi C, Wildemann B, Wick M, Voltz R. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity? *J. Neurol. Sci.* 2009;280:98- 100.
 31. Jenkins MA, Cheng L, Ratnaik S. Multiple sclerosis: use of light- chain typing to assist diagnosis. *Ann Clin Biochem* 2001;38:235-41.
 32. Kaplan B, Aizenbud BM, Golderman S, Yaskariev R, Sela BA. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2010;229:263-71.
 33. Karamčić J, Delić-Šarac M, Subašić D, Jukić T, Čorić J, Panjeta M, et al. Reibergram and Oligoclonal Bands in Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Med Arh* 2012;66:4:222-5.
 34. Katz Sand IB, Lublin FD. Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Continuum (Minneapolis)* 2013;19:4:922-43.
 35. Kaunzner UW, Kumar G, Askin G, Gauthier SA, Nealon NN, Vartanian T, et al. A study of patients with aggressive multiple sclerosis at disease onset. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2016;12:1907-12.
 36. Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler*. 2011 Mar;17(3):335-43.
 37. Khoury SJ, Weiner HL. Kappa light chains in spinal fluid for diagnosing multiple sclerosis. *JAMA* 1994;272:242-3.

38. Konen FF, Schwenkenbecher P, Jendretzky KF, Gingele S, Sühs KW, Tumani H, et al. The increasing role of kappa free light chains in the diagnosis of multiple sclerosis. *Cells*. 2021;6;10(11):3056.
39. Krakauer M, Schaldermose Nielsen H, Jensen J, Sellebjerg F. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1998;98:161-5.
40. Lamers KJ, de Jong JG, Jongen PJ, Kock-Jansen MJ, Teunissen MA, Prudon-Rosmulder EM. Cerebrospinal fluid free kappa light chains versus IgG findings in neurological disorders: qualitative and quantitative measurements. *J Neuroimmunol* 1995;62:19-25.
41. Leurs CE, Twaalfhoven H, Lissenberg-Witte BI, van Pesch V, Dujmovic I, Drulovic J, et al. Kappa free light chains is a valid tool in the diagnostics of MS: A large multicenter study. *Mult Scler*. 2020;26(8):912-23.
42. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37(5):397–401.
43. Long H., Wang X., Chen Y., Wang L., Zhao M., Lu Q. Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets. *Cancer Lett*. 2018;428:90–103. doi: 10.1016/j.canlet.2018.04.016.
44. Lotan I, Ganelin-Cohen E, Tartakovsky E, Khasminsky V, Hellmann MA, Steiner I, et al. Saliva immunoglobulin free light chain analysis for monitoring disease activity and response to treatment in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;44:102339.
45. Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand* 2000;102:322-5.
46. Luxton RW, McLean BN, Thompson EJ. Isoelectric focusing versus quantitative measurements in the detection of intrathecal local synthesis of IgG. *Clin Chim Acta* 1990;187:297-308.
47. Montalban X, Tintoré M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010;74:427-34.
48. Nourian NA. Molecular Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Journal of Reviews in Medical Sciences*. 2021;1:117-27.

49. Öhman S. Points of view concerning the diffusion theory for blood- CSF barrier function and dysfunction. *J Neurol Sci* 1994;126:240–5.
50. Öhman S, Ernerudh J, Forsberg P, von Schenck H, Vrethem M. Improved formulae for the judgement of intrathecally produced IgA and IgM in the presence of blood CSF barrier damage. *Ann Clin Biochem* 1993;30(5):454–62.
51. Öhman S, Ernerudh J, Forsberg P, Hendriksson A, von Schenck H, Vrethem M. Comparison of seven formulae and isoelectrofocusing for determination of intrathecally produced IgG in neurological diseases. *Ann Clin Biochem* 1992;29:405-10.
52. Öhman S, Forsberg P, Nelson N, Vrethem M. An improved formula for the judgement of intrathecally produced IgG in the presence of blood brain barrier damage. *Clin Chim Acta.* 1989;181:265-72.
53. Petereit H, Sindern E, Wick M. Liquordiagnostik. Leitlinien und Methoden-katalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie. Springer Medizin, 2007.
54. Presslauer S, Milosavljevic D, Brücke T, Bayer P, Hübl W. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008; 255:1508-14.
55. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, Parigger S, Schneider-Koch G, Bruecke T. Kappa Free Light Chains: Diagnostic and Prognostic Relevance in MS and CIS. *PLoS ONE.* 2014;9:e89945
56. Puccioni-Sohler M, Kitze B, Felgenhauer K, Graef IT, Lange P, Novis S, et al. The value of CSF analysis for the differential diagnosis of HTLV-I associated myelopathy and multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 1995;53:760–5.
57. Radulović-Prenc L, Sepčić J, Vidović I, Prenc M. New Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. *Glas. Pul. Boln.* 2011;8:8-12.
58. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry:Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clinical Chemistry* 1995;41(2):256-63.
59. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)—a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994;122(2):189–203.
60. Reiber H. Liquordiagnostik. In: Thomas L (Hrsg) Labor und Diagnose, 6. Aufl. Med Verl Ges, Marburg, 2005.

61. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *Journal of the Neurological Sciences* 2001;184:101-22.
62. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, Bernardi G, Adam P, Monteiro de Almeida S, et al. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(3):331–7.
63. Reiber H. Polyspecific antibodies without persisting antigen in multiple sclerosis, neurolupus and Guillain-Barre syndrome: immune network connectivity in chronic diseases. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2017;75:8:580-8.
64. Schwenkenbecher P, Sarikidi A, Bonig L, Wurster U, Bronzlik P, Suhs KW, et al. Clinically isolated syndrome according to McDonald 2010: Intrathecal IgG synthesis still predictive for conversion to multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 2017;18:10:2061.
65. Sellebjerg F. Immunoglobulins in Cerebrospinal Fluid. U: Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE, Tumani H. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*. 1. izdanje. Berlin: Springer, 2015. str. 116-26.
66. Sellebjerg F, Börnsen L, Khademi M, Krakauer M, Olsson T, Frederiksen JL, et al. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. *Neurology*. 2009;8;73(23):2003-10.
67. Sellebjerg F, Christiansen M, Rasmussen LS, Jaliachvili I, Nielsen PM, Frederiksen JL et al. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. Quantitative assessment of intrathecal immunoglobulin synthesis by empirical formulae. *Eur J Neurol* 1996;3:548–59.
68. Sheinerman KS, Toledo JB, Tsivinsky VG, Irwin D, Grossman M, Weintraub D, et al. Circulating brain-enriched microRNAs as novel biomarkers for detection and differentiation of neurodegenerative diseases. *Alzheimer's Res. Ther.* 2017;9:1–13. DOI: 10.1186/s13195-017-0316-0.
69. Souverijn JHM, Serrée HMP, Peet R, Grenzebach Smit W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis. Comparison of various formulae with the “gold standard” of isoelectric focusing. *J Neurol Sci* 1991; 102:11-6.

70. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stuve O, Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2013;9:267-76.
71. Süße M, Reiber H, Grothe M, Petersmann A, Nauck M, Dressel A, et al. Free light chain kappa and the polyspecific immune response in MS and CIS - Application of the hyperbolic reference range for most reliable data interpretation. *J Neuroimmunol*. 2020;12;346:577287.
72. Taradi M. Građa protutijela i antigenskih receptora limfocita B. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Škudar-Lukinović V, Marušić M i sur. *Imunologija*. Medicinska Naklada: Zagreb, 2010. str. 58-79.
73. te Velthuis H, Knop I, Stam P, van den Broek, Klaasse Bos H, Hol S, et al. N Latex FLC – new monoclonal high-performance assays for determination of free light chain kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1323-32.
74. Thomas L. Labor und diagnose. Frankfurt/Main: TH Verlagsgesellschaft GmbH, Marburg 2005.
75. Trbojević-Čepe M. Mozak kao imunološki privilegirano mjesto. U: Bašić Kes V i suradnici. *Neuroimunologija*. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 26-34.
76. Trbojević-Čepe M, Vogrinc Ž. Inflammation and humoral immune response within the CNS compartment: characteristic features and cerebrospinal fluid analysis. *Biochemia Medica*, 2004;14(1-2):1-36.
77. Tribolet L, Kerr E, Cowled C, Bean AGD, Stewart CR, Dearnley M, et al. MicroRNA Biomarkers for Infectious Diseases: From Basic Research to Biosensing. *Front. Microbiol*. 2020;11:1197. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01197.
78. Tumani H, Hegen H. CSF Albumin: Albumin CSF/Serum Ratio (Marker for Blood-CSF Barrier Function). U: Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE, Tumani H. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*. 1. izdanje. Berlin: Springer, 2015. str. 112-4.
79. Villar M, Espino M. High levels of cerebrospinal fluid free kapa chains predict conversion to multiple sclerosis. *Clin Chim Acta* 2012;413:1813-6.
80. Vasilj M, Basic Kes V, Vrkic N, Vukasovic I. Relevance of KFLC quantification to differentiate clinically isolated syndrome from multiple sclerosis at clinical onset. *Clin Neurol Neurosurg* 2018; 174:220-9.

81. Vasilj M, Klarić M, Vrkić N, Mikulić I, Marković Boras M, Jelić Knezović N, Šoljić V. Kappa Free Light Chains In Cerebrospinal Fluid of Patients With Identified Oligoclonal Immunoglobulin G. *Psychiatr Danub* 2017;29(Suppl. 2):124-8.
82. Vukasović I, Mikula I. Neurološke bolesti. U: Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i suradnici. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. 2. dopunjeno i izmijenjeno izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2018. str. 238-72.
83. Wei B, Pei G. MicroRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cell Mol Immunol*. 2010;7(3):175-81. DOI: 10.1038/cmi.2010.19. Epub 2010 Apr 5. PMID: 20364159; PMCID: PMC4002913.
84. Zhang K, Wang YW, Wang YY, Song Y, Zhu J, Si PC, et al. Identification of microRNA biomarkers in the blood of breast cancer patients based on microRNA profiling. *Gene*. 2017;619:10–20. DOI: 10.1016/j.gene.2017.03.038.
85. Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2019;16:272.