

# Imunološka i mikrobiološka obilježja bolesnika s multiplom sklerozom u Kliničkom bolničkom centru Split

---

Čikara, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:755055>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Čikara**

**IMUNOLOŠKA I MIKROBIOLOŠKA OBILJEŽJA BOLESNIKA S MULTIPLOM  
SKLEROZOM U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU SPLIT**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:  
2021./2022.**

**Mentorica:  
Doc. dr. sc. Vana Košta, dr. med.**

**Split, srpanj 2022.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ana Čikara**

**IMUNOLOŠKA I MIKROBIOLOŠKA OBILJEŽJA BOLESNIKA S MULTIPLOM  
SKLEROZOM U KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU SPLIT**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:  
2021./2022.**

**Mentorica:  
Doc. dr. sc. Vana Košta, dr. med.**

**Split, srpanj 2022.**

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1. Demijelinizacijske bolesti središnjega živčanog sustava ..... | 2  |
| 1.2. Epidemiologija multiple skleroze .....                        | 2  |
| 1.3. Etiologija multiple skleroze .....                            | 2  |
| 1.3.1. Genski čimbenici razvoja multiple skleroze .....            | 3  |
| 1.3.2. Okolišni čimbenici razvoja multiple skleroze .....          | 3  |
| 1.4. Imunopatogeneza multiple skleroze .....                       | 6  |
| 1.5. Klinička slika multiple skleroze .....                        | 7  |
| 1.5.1. Klinički oblici multiple skleroze .....                     | 8  |
| 1.5.2. Simptomi multiple skleroze .....                            | 9  |
| 1.6. Dijagnostika multiple skleroze .....                          | 10 |
| 1.6.1. Dijagnostički algoritam multiple skleroze .....             | 11 |
| 1.6.2. Diferencijalna dijagnoza multiple skleroze .....            | 13 |
| 1.6.3. EDSS .....  | 14 |
| 1.7. Liječenje multiple skleroze .....                             | 14 |
| 1.7.1. Liječenje relapsa multiple skleroze .....                   | 14 |
| 1.7.2. Liječenje koje modificira tijek bolesti .....               | 15 |
| 1.7.3. Simptomatsko liječenje multiple skleroze .....              | 17 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....   | 18 |
| 2.1. Cilj istraživanja .....                                       | 19 |
| 2.2. Hipoteze .....  | 19 |
| 3. ISPITANICI I POSTUPCI .....                                     | 20 |
| 3.1. Ispitanici .....  | 21 |
| 3.2. Ustroj istraživanja .....                                     | 21 |
| 3.3. Etička načela .....   | 21 |
| 3.4. Postupci istraživanja .....                                   | 21 |
| 3.3. Statističke metode .....                                      | 22 |
| 4. REZULTATI .....   | 23 |
| 4.1. Rezultati analize likvora .....                               | 25 |
| 4.2. Rezultati analize imunološke obrade ispitanika .....          | 27 |
| 4.3. Rezultati analize mikrobiološke obrade .....                  | 31 |
| 5. RASPRAVA .....  | 34 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 6. ZAKLJUČCI.....   | 39 |
| 7. LITERATURA.....  | 41 |
| 8. SAŽETAK.....     | 48 |
| 9. SUMMARY .....    | 50 |
| 10. ŽIVOTOPIS ..... | 53 |

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Vani Košti,  
na vodstvu, znanju i savjetima kroz stvaranje ovoga rada.*

*Hvala mojim prijateljima,  
s kojima je vrijeme studiranja brzo proletjelo u ohrabrenju i (ne)zaboravnoj zabavi,  
s kojima sam imala sreću znati da smo u „dobrim starim vremenima“  
prije nego što smo iz njih otišli.*

*Svojoj obitelji zahvaljujem na velikoj podršci i razumijevanju, a iznad svega,  
beskrajno hvala mojim najvećim (i jedinim – nevažno, i dovoljno) obožavateljima:  
mojim roditeljima,  
koji su mi zajednički, ali i svaki na svoj jedinstven način,  
bezuvjetno pružili sve i više od toga.*

## POPIS KRATICA

SŽS – središnji živčani sustav

MS – multipla skleroza

UV – ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

HLA – humani leukocitni antigen

MHC – glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

EBV – virus Epstein-Barr

CMV – citomegalovirus

Th – pomagački limfociti T (engl. *T helper*)

IM – infektivna mononukleoza

EBNA1 – Epstein-Barr nuklearni antigen 1

MBP – mijelin bazični protein

KMB – krvno-moždana barijera

CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> – (limfociti T) pozitivni na receptore CD4, odnosno CD8

EAE – eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis

OCB – oligoklonalne vrpce (engl. *oligoclonal bands*)

Ig – imunoglobulin

MR – magnetna rezonanca

RIS – radiološki izolirani sindrom

CIS – klinički izolirani sindrom

RRMS – relapsno-remitentna multipla skleroza

SPMS – sekundarno progresivna multipla skleroza

PPMS – primarno progresivna multipla skleroza

VZV – varicella-zoster virus

MRZ – ospice, rubela i varicella-zoster (engl. *measles, rubella, zoster*)

ANA – antitijela protiv stanične jezgre (engl. *antinuclear antibodies*)

NMOSD – spektar poremećaja optičkoga neuromijelitisa (engl. *neuromyelitis optica spectrum disorder*)

MOG – mijelinski oligodendrocitni glikoprotein

EDSS – proširena ljestvica statusa invaliditeta (engl. *Expanded Disability Status Scale*)

PML – progresivna multifokalna leukoencefalopatija

JCV – virus John Cunningham

## **1. UVOD**



## **1.1. Demijelinizacijske bolesti središnjega živčanog sustava**

Mijelin je ovojnica aksona sastavljena od slojeva lipida i proteina koja omogućava saltatorno provođenje živčanih impulsa i tako ubrzava prijenos signala. Produkt je oligodendroglijalnih stanica u središnjemu živčanom sustavu (SŽS) (1). Oštećenje normalno razvijene mijelinske ovojnice i posljedični gubitak saltatorne kondukcije akcijskoga potencijala živčanim vlaknima obilježje je demijelinizacijskih bolesti SŽS-a (2).

Demijelinizacijske bolesti heterogena su skupina poremećaja kojima se u pozadini nalazi akutno ili kronično upalno zbivanje (3). Do navedenih oštećenja mogu dovesti upalne bolesti, infekcije, ishemija, nasljedne bolesti, migrena, intoksikacije i metabolički poremećaji. Najčešći su uzroci autoimuna upalna zbivanja, od kojih je najčešća multipla skleroza (2).

Multipla skleroza (MS) kronična je, autoimuna, upalna demijelinizacijska bolest SŽS-a obilježena tzv. plakovima, žarišnim demijelinizirajućim lezijama bijele tvari s varijabilnim oštećenjem aksona. Oštećenja se kasnije pojavljuju i u sivoj tvari, uključujući korteks, bazalne ganglije, moždano deblo i sivu tvar kralježnične moždine. U konačnici dolazi do difuzne neurodegeneracije i atrofije moždanoga tkiva (3).

## **1.2. Epidemiologija multiple skleroze**

Multipla skleroza najčešća je netraumatska onesposobljavajuća bolest mlade odrasle dobi s incidencijom u globalnome porastu (4). Procijenjena stopa prevalencije posljednja tri desetljeća u Europi iznosi 83 na 100 000 stanovnika, dok zadnji dostupni podatci za Republiku Hrvatsku pokazuju prevalenciju od 145 na 100 000 (2). Omjer ženskih i muških bolesnika u stalnome je porastu i danas iznosi gotovo 3,0 (4). Najviša stopa prevalencije zabilježena je za dobnu skupinu između 35 i 64 godine, a bolest se pojavljuje u prosjeku 5 godina ranije u žena (5,6). MS pokazuje zemljopisni gradijent s većom prevalencijom u sjevernim zemljama zbog korelacije s izloženošću ultraljubičastome (UV) zračenju (4).

S obzirom na činjenicu da bolesnici često umiru zbog drugih bolesti, smrtnost od MS-a teško je odrediti. Međutim, zahvaljujući uvođenju odgovarajuće terapije, posljednjih desetljeća zabilježen je značajan pad smrtnosti od MS-a (6).

## **1.3. Etiologija multiple skleroze**

Multipla skleroza multifaktorijalna je bolest. Ne postoji jedinstven čimbenik odgovoran za razvoj bolesti, nego je riječ o međudjelovanju genskih i okolišnih faktora (7). Značajno povećana pojavnost MS-a u monozigotnih blizanaca u sjevernoj Europi u odnosu na

opću populaciju upućuje na nemendelovsku nasljednost bolesti pod visokim utjecajem okolišnih čimbenika (8).

### 1.3.1. Genski čimbenici razvoja multiple skleroze

Iako su pronađene mnoge varijante alela povezane s MS-om, svaka od njih blago povećava rizik za ovu bolest, stoga je najvjerojatnije riječ o kumulativnome genskom opterećenju koje nastaje kad se veći broj ovih alela pojavljuje zajedno. Navedene varijante primarno su povezane s imunološkim odgovorom i citokinskom signalizacijom (9). Najveću povezanost s MS-om pokazuju humani leukocitni antigeni (HLA) klase I i II unutar gena glavnoga kompleksa histokompatibilnosti (MHC) na kromosomu 6p21 (10,11). Najistaknutija je povezanost MS-a i HLA gena klase II, a posebno haplotipa HLA-DR2 (HLA-DRB1\*1505 i DQB\*0602). Među HLA genima klase I postoje i rizične i protektivne varijante (6). Prema Velikoj genomskoj studiji (GWAS), pronađen je i velik broj varijanti izvan MHC kompleksa povezanih s MS-om, no utjecaj nasljeđa na pojavu bolesti iznosi svega 20 do 30% (10). Naime, iako genska podloga bolesti doprinosi njenoj geografskoj raspodjeli, ne objašnjava razlike rizika među migrantima istoga podrijetla niti povećanje udjela ženskih bolesnika (11).

### 1.3.2. Okolišni čimbenici razvoja multiple skleroze

Životni stil i okolišni čimbenici ključni su u nastanku MS-a (12). Poznato je da MS nastaje u genski predisponiranih osoba pod utjecajem dovoljnoga broja čimbenika iz okoline (8). Rizični čimbenici uključuju infekciju virusom Epstein-Barr (EBV), nisku razinu vitamina D, pušenje, pretilost i visoki unos natrija (2), a organska otapala i rad u smjenama pridonose povećanju rizika. Nasuprot tomu, nikotin za žvakanje, alkohol, infekcija citomegalovirusom (CMV) i kava smatraju se protektivnima (11).

#### 1.3.2.1. Infekcije

Prema tzv. higijenskoj hipotezi, višestruke infekcije u dječjoj dobi smanjuju rizik za razvoj MS-a modifikacijom imunološkoga odgovora u korist pomagačkih limfocita T (Th) 2 i regulatornih T-stanica, istovremeno utišavajući proupalnu aktivnost Th1-stanica, što djelomično objašnjava geografsku distribuciju bolesti (11).

Najistraženiji je okolišni čimbenik rizika infekcija EBV-om (2), sveprisutnim humanim herpesvirusom koji se može serološki dokazati u više od 90% odrasle populacije. Postoje dokazi da simptomska infekcija EBV-om u adolescenciji i odrasloj dobi, koja se

javlja u obliku infektivne mononukleoze (IM), povećava rizik više nego asimptomatska infekcija u djetinjstvu. Epidemiološke studije pokazale su 2 do 3 puta veći rizik od oboljenja u osoba s IM, dok seronegativnost smanjuje rizik (8,13). Međutim, infekcija nakon djetinjstva, kao pokazatelj visokoga stupnja higijene u dječjoj dobi, dovodi u pitanje direktnu ulogu EBV-a u patogenezi MS-a. Naime, prema higijenskoj hipotezi, seronegativni odrasli zbog visoke higijene pod povećanim su rizikom za oboljenje. Paradoksalno, sve dok ostaju seronegativni, rizik je oko 10 puta manji u odnosu na seropozitivne osobe (11). Randomizirane studije pokazale su da visok titar antitijela na Epstein-Barr nuklearni antigen 1 (EBNA1) i IM u anamnezi značajnije povisuju rizik u osoba s visokorizičnim HLA genima i u pretilih. Unatoč rezultatima, učinak EBV-a na razvoj MS-a nije jasno utvrđen, iako postoji nekoliko teorija (8). Križna reaktivnost limfocita T specifičnih za mijelin bazični protein (MBP) s DNA polimeraza-peptidom EBV-a te njihov nalaz u likvoru ukazuju na teoriju molekularne mimikrije. Druge su teorije prolazak inficiranih cirkulirajućih limfocita B kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) s posljedičnim stvaranjem proupalnoga okoliša te nastanak autoreaktivnih limfocita T zbog modifikacije limfocita B i monocita (6,13). Upala, demijelinizacija i neurodegeneracija inducirana virusima na životinjskim modelima dodatni su dokazi uloge virusa (14).

Iako su neke studije pokazale negativnu povezanost seropozitivnosti na CMV s rizikom za oboljenje od MS-a, ne postoje uvjerljivi dokazi protektivnoga učinka CMV-a (8). Pretpostavljeni učinak mogao bi se objasniti aktivacijom velikoga broja limfocita T citomegalovirusnom infekcijom, čime velik dio T-stanica postaje okupiran (12). Ipak, najvjerojatnije je objašnjenje izloženost infekcijama u ranoj životnoj dobi u sklopu higijenske hipoteze. Ovu tvrdnju podupiru studije drugih patogena stečenih u uvjetima loše higijene u djetinjstvu koji su također pokazali negativnu korelaciju s MS-om, kao što su *Helicobacter pylori*, *Toxoplasma gondii* i *Trichuris trichuria* (13).

#### 1.3.2.2. Geografska širina, ultraljubičasto zračenje i vitamin D

Najveći udio vitamina D za potrebe ljudskoga organizma sintetizira se u koži pod utjecajem UV zračenja Sunca. Ovaj glavni izvor vitamina D nejednoliko je raspoređen po svijetu (15). Iako je u sjevernijim zemljama povećana prevalencija rizičnih varijanti HLA gena, epidemiološki podatci navode i na utjecaj insolacije i razine vitamina D (12) jer preadolescentni migranti iz visokorizičnih u niže rizična područja pokazuju pad rizika, i obrnuto (16). Izlaganje suncu i razina vitamina D u trudnica utječu na hipovitaminozu D i rizik za MS u fetusa, pa je u osoba rođenih u proljeće rizik značajno povećan (6,13).

Glavni je učinak vitamina D na MS imunomodulacijski (15): receptori za kalcitriol, aktivni oblik vitamina D, na monocitima, makrofagima i limfocitima regulacijom transkripcije gena inhibiraju sintezu proupalnih i potiču sintezu protuupalnih citokina. Osim toga, vitamin D djeluje i direktno neuroprotektivno suprimiranjem upalnoga odgovora u moždanim pericitima, stanicama koje održavaju KMB (13). Čini se da UV zračenje ima i neovisan direktni imunosupresivni učinak (15). Na rizik od oboljenja utjecaj imaju i geni koji reguliraju razine vitamina D i sudjeluju u njegovu metabolizmu. Nije dokazan terapijski učinak vitamina D i Sunčeva zračenja na MS (12).

Od metabolita vitamina D, mjeri se 25-hidroksivitamin D kao najbolji pokazatelj zalihe u organizmu. Općenito je prihvaćena serumska razina od 75 do 150 nmol/L (15). Nažalost, u većine je populacije razina vitamina D niža od donje prihvaćene granice, a serumska razina ispod 50 nmol/L smatra se ugrožavajućom. Zaštitna razina nije utvrđena, no već pri serumskim razinama od 63,3 do 75 nmol/L pronađen je smanjen rizik od MS-a (13).

#### 1.3.2.3. Duhan

Procijenjeno je da pušenje cigareta povećava rizik od MS-a za 40 do 80%, a povezano je i s bržom progresijom bolesti te s akutnim pogoršanjem simptoma nakon pušenja (12,17). Neke su od teorija ove povezanosti vaskularno oštećenje, utjecaj na imunološki odgovor, neurotoksični učinci komponenti cigarete i utjecaj na signalne putove u SŽS-u (11). Upalni odgovor oštećuje KMB, a slobodni radikali, cijanat i ugljikov monoksid direktno su neurotoksični i mogu potaknuti demijelinizaciju. Smatra se da dim cigarete indukcijom upale dovodi do križne reaktivnosti plućnih antigena s mijelinom. Pušenje djeluje povezano s genskim faktorima, UV zračenjem i EBV-om u povećanju rizika od MS-a (18).

S druge strane, peroralna uporaba duhana povezana je sa smanjenim rizikom od MS-a, što je dovelo do zaključka da su produkti izgaranja duhana i iritacija pluća posrednici između pušenja i navedenoga rizika, dok sam nikotin djeluje neuroprotektivno (8,11).

#### 1.3.2.4. Pretilost i indeks tjelesne mase

Pretilost u djece i mladih odraslih, ali ne i u kasnijoj dobi, još je jedan promjenjivi okolišni čimbenik rizika za MS (11). Kritičan period utjecaja pretilosti na razvoj MS-a jest adolescencija. Rizik je najveći pri indeksu tjelesne mase većem od 27, no već je i blaži stupanj debljine rizični faktor (12). Nema značajnih podataka o utjecaju pretilosti na tijek bolesti, stupanj invalidnosti i mortalitet kod MS-a. Moguća su objašnjenja uloge pretilosti

snižena razina vitamina D u pretilih osoba te imunomodulacijska svojstva masnoga tkiva. Naime, pretilost je stanje blage upale s hipersekrecijom proupalnih citokina i adipokina, kao što je leptin, iz adipocita (11,19). Debljina djeluje zajedno s HLA genskim varijantama i drugim rizičnim čimbenicima: dok infekcija EBV-om i pretilost samostalno udvostručuju rizik, u kombinaciji je on uvećan 14 puta (8,12).

#### 1.3.2.5. Ostali okolišni čimbenici

Dvije su studije pokazale povećanje rizika za MS vezane za rad u smjenama, vjerojatno uzrokovan disregulacijom izlučivanja melatonina koji inhibira patogenu diferencijaciju limfocita T.

Pomoću nekoliko studija uočene su razlike u mikrobioti zdrave populacije i bolesnika s MS-om te uloga crijevnih bakterija u reakciji stanica imunološkoga sustava na SŽS, no uzročno-posljedična veza za sada nije pronađena (8,11).

Posljednjih se godina visok dijetni unos soli razmatra kao rizični faktor za MS, a neka istraživanja povezala su unos kave i alkohola sa smanjenjem rizika. Trenutno nema studija koje dokazuju ove tvrdnje (8,11,12).

### 1.4. Imunopatogeneza multiple skleroze

Multipla skleroza kompleksna je bolest uzrokovana abnormalnim autoimunim odgovorom u genski osjetljivih osoba pod utjecajem okolišnih čimbenika (6). Patogeneza nije potpuno razjašnjena, no smatra se da je riječ o napadu na antigene SŽS-a posredovanom CD4<sup>+</sup> limfocitima T reaktivnima na mijelin (20). Patološki, u demijelinizacijskim plakovima najbrojnije su stanice makrofagi i aktivirana mikroglia, dok su dominantna subpopulacija limfocita CD8<sup>+</sup> limfociti T. Limfociti B i plazma stanice rijetke su u aktivnim lezijama, a njihov broj raste s razvojem kroničnosti (6).

Hipoteza da je MS posredovan limfocitima T temelji se na sličnosti s eksperimentalnim autoimunim encefalitisom (EAE), životinjskim modelom upalne demijelinizirajuće bolesti. EAE nastaje imunizacijom životinja proteinima deriviranim iz mijelina, što dovodi do CD4<sup>+</sup> limfocitima T posredovane upale, demijelinizacije, oštećenja aksona i glioze. Nije poznato što u oboljelih dovodi do aktivacije limfocita T na periferiji, a za razliku od zdravih osoba, u oboljelih oni prelaze KMB (2,21). Ulaskom u SŽS, aktivirani limfociti T dolaze u dodir s autoantigenim peptidima vezanima na molekulu MHC klase II eksprimiranu na antigen-prezentirajućim stanicama. CD4<sup>+</sup> limfociti Th1 reaktivni na

mijelinske proteine stvaraju proupalne citokine kao što su interferon  $\gamma$ , interleukin 2 i faktor tumorske nekroze  $\alpha$  te su ključni u upalnome procesu MS-a. Kaskada otpuštanja citokina i kemokina dovodi do privlačenja dodatnih upalnih stanica te aktivacije mikroglije i makrofaga, što rezultira oštećenjem mijelina. Zbog demijelinizacije, autoreaktivnim limfocitima T izloženo je sve više mijelinskih autoantigena, što se naziva epitomskim širenjem (20). Novija istraživanja pokazuju veliku važnost limfocita Th17 (6). Smatra se da  $CD4^+$  limfociti Th2, koji proizvode interleukine 4, 5 i 10, imaju suprotnu ulogu ograničavajući oštećenje izazvano Th1-stanicama (20).

Simptomatologija MS-a ne može se objasniti isključivo demijelinizacijom, nego joj pridonosi i sekundarno oštećenje aksona, također posredovano upalnim procesima (22). Vjeruje se da  $CD8^+$  T-stanice patološki učinak ostvaruju oštećenjem stanica koje ekspimiraju molekule MHC klase I, kao što su neuroni i oligodendrociti (20). Nakon prepoznavanja MHC molekule klase I, sintetiziraju perforin, medijator stanične toksičnosti koji stvara membranske pore i propušta granzime, citolitičke proteaze, s posljedicom apoptoze (22,23).

Prisutnost oligoklonalnih vrpca (OCB) u cerebrospinalnome likvoru bolesnika upućuje na ulogu limfocita B u patogenezi MS-a (22). Limfociti B sazrijevaju u plazma stanice koje stvaraju imunoglobuline (Ig), uglavnom izotipa IgG. Većina se ovih stanica nalazi u perivaskularnim i meningealnim upalnim infiltratima, a upala moždanih ovojnica korelira s opsegom aktivne demijelinizacije i neurodegeneracije podležećega korteksa.

Limfocitna infiltracija dovodi do snažne aktivacije makrofaga i mikroglijalnih stanica. Za razliku od plakova aktivne demijelinizacije koji su prožeti makrofagima, u kronično aktivnim i inaktivnim lezijama njihov je broj puno manji. Smatra se da je uloga makrofaga primarno proupalna, a sastoji se od oštećenja tkiva pomoću prezentiranja antigena, stvaranja kisikovih i dušikovih radikala, sekrecije proupalnih citokina i fagocitoze (3).

## **1.5. Klinička slika multiple skleroze**

Tijek multiple skleroze može se opisati kao interakcija dvaju fenomena, relapsa i progresije, koji se u različitim stadijima bolesti mogu preklapati. Relapsom se smatra novi, akutni ili subakutni, događaj u obliku simptoma SŽS-a ili asimptomatskih lezija otkrivenih magnetnom rezonancom (MR), a predstavlja aktivnu bolest obilježenu akutnom upalnom demijelinizacijom. Progresija je dugotrajno, ireverzibilno pogoršanje neurološke funkcije zbog odgovarajućega postupnog oštećenja i gubitka aksona (23).

### 1.5.1. Klinički oblici multiple skleroze

Multipla skleroza sastoji se od visokorizične, relapsno-remitirajuće i progresivne faze (23). Prva, visokorizična faza, prethodi pretkliničkome i kliničkom obliku bolesti, a studije migracija i patološki nalazi ukazuju na višedesetljetni vremenski razmak između izlaganja okolišnim čimbenicima rizika i pojave bolesti (4).

Pretklinički stadij MS-a može se detektirati kao radiološki izolirani sindrom (RIS). Riječ je o slučajnome nalazu lezija bijele tvari na MR-u mozga i kralježnične moždine karakterističnih za MS u asimptomatskih osoba (2,24). Petogodišnje praćenje ovih pacijenata pokazalo je pojavu novih lezija u dvije trećine, a razvoj kliničkih simptoma MS-a u jedne trećine slučajeva RIS-a (25).

U 85% slučajeva MS započinje klinički izoliranim sindromom (CIS). To je prva klinička prezentacija MS-a, stoga predstavlja prvi relaps bolesti. Najčešće je izoliran u prostoru (monofokalan), a tipično se prezentira optičkim neuritisom, zahvaćenošću kralježnične moždine, moždanoga debla ili maloga mozga. Izoliran je u vremenu (monofazičan), akutnoga ili subakutnog početka s vrhuncem neurološkoga oštećenja unutar 2 do 3 tjedna. Da bi se epizoda proglasila CIS-om, simptomi moraju trajati najmanje 24 sata u odsutnosti febriliteta, infekcije i znakova encefalopatije (2,26).

Pojavom sljedećega relapsa, CIS evoluiru u relapsno-remitentnu multiplu sklerozu (RRMS) (23). Javljaju se akutne egzacerbacije u trajanju od najmanje 24 sata u obliku pogoršanja starih ili pojave novih neuroloških ispada, nakon čega slijede razdoblja remisije obilježena potpunim ili djelomičnim oporavkom. Relapsi mogu trajati danima i mjesecima, a oporavak može biti postupan ili nagao. Napadaj mogu provocirati infekcije, emocionalni stres, trudnoća i drugi okidači (6,27). Vrućica i bilo koji drugi stres za SŽS mogu prekoračiti već smanjen prag prijenosa impulsa ogoljenim aksonima i tako dovesti do slična stanja koje se naziva pseudorelaps (23). Razdoblja remisije s vremenom postaju sve kraća, a deficit sve veći, što u konačnici rezultira invalidnošću (2).

Nakon 10 do 15 godina, tijekom bolesti postupno se mijenja u sekundarno progresivnu multiplu sklerozu (SPMS) koja označava kontinuirano pogoršanje i akumulaciju neuroloških oštećenja (2,28). SPMS neovisna je o relapsima te može, ali i ne mora, biti praćena aktivnošću bolesti, kliničkim relapsima i novim lezijama (29). U preostalih 15% bolesnika bolest se od početka javlja kao primarno progresivni oblik multiple skleroze (PPMS) koji se najčešće ne razlikuje od SPMS-a, osim što mu ne prethodi RRMS (2,23). Iako imaju zajedničku patogenezu, fokalne upalne lezije glavna su oznaka RRMS-a, dok u slučaju progresivnih

oblika one ne mogu potpuno objasniti kliničko oštećenje. Dominantne su lezije kronične, a smatra se da difuzno oštećenje i gubitak moždanoga tkiva imaju važniju ulogu (29). Dijagnoza se obično postavlja retrospektivno, najčešće nakon kliničkih pogoršanja u obliku subjektivnoga pogoršanja ili promjena u neurološkome statusu zabilježenih tijekom jedne godine (23,29).

### 1.5.2. Simptomi multiple skleroze

Multipla skleroza može uzrokovati bilo koji simptom koji je posljedica oštećenja SŽS-a, no neki se simptomi tipično češće pojavljuju (2). Jedna je od najčešćih kliničkih prezentacija MS-a akutni parcijalni transverzalni mijelitis. Karakteristični su osjetni ispadi ispod razine oštećenja koji mogu biti raznoliki: parestezije u obliku trnjenja i žarenja, hipestezije, neugodne senzacije oticanja, zategnutosti i sl. Mogu se javiti motorički deficiti, najčešće u obliku slabosti, nespretnosti i poremećaja hoda. Česti su znakovi oštećenja piramidnoga puta spastičnost, hiperrefleksija i pozitivan Babinskijev znak. Javljaju se i poremećaji funkcije mokraćnoga mjehura i crijeva, a potpuni transverzalni mijelitis s paraplegijom rijetka je pojava (6,27).

Upala optičkoga živca prvi je simptom u 20% bolesnika (30). Optički neuritis u sklopu demijelinizacijske bolesti naziva se tipičnim, obično je unilateralan i prezentira se gubitkom vidne oštine, poremećenom percepcijom boja i bolnim očnim pokretima (31).

Simptomi moždanoga debla također su česti. Najčešće su dvoslike zbog internuklearne oftalmoplegije, iako one mogu biti posljedica paralize živca abducensa (27). Mogu se javiti i osjetni i motorički poremećaji lica, vrtoglavica, mučnina, povraćanje, trigeminalna neuralgija, dizartriya, hipoakuzija, miokimija, somnolencija, disfagija i dr. (32). Cerebelarne lezije rezultiraju ataksijom u obliku cerebelarnoga tremora (6).

Oko 40 do 65% oboljelih od MS-a pati od određenoga stupnja kognitivne disfunkcije koja se javlja već u početku bolesti, često prije karakterističnih fizikalnih simptoma. Najčešće zahvaćene kognitivne domene jesu pozornost, izvršavanje zadataka i dugoročno pamćenje (33). Umor se javlja u 90%, a depresija u 50 do 60% bolesnika. Česta je i seksualna disfunkcija (6).

Veće lezije moždanih polutki mogu se očitovati afazijom, encefalopatijom, simptomima povišenoga intrakranijalnog tlaka te osjetnim i motoričkim ispadima (27).

Za MS karakteristični su paroksizmalni simptomi, odnosno nagle, kratkotrajne i stereotipne epizode u trajanju od nekoliko sekundi do nekoliko minuta. Ponavljanje ovih epizoda može potrajati nekoliko dana do nekoliko mjeseci, a smatraju se relapsom ako se



ponove unutar 24 sata (34). U ove simptome ubrajaju se osjećaj udara struje kroz leđa prilikom fleksije vrata (Lhermitteov znak), toničke konvulzije, paroksizmalna dizartrija ili ataksija, trigeminalna neuralgija i drugi, manje karakteristični simptomi (6,24).

## 1.6. Dijagnostika multiple skleroze

Klinička i radiološka raznolikost MS-a te nedostatak specifičnoga i osjetljivog biomarkera čine dijagnozu ove bolesti izazovnom. Mnoge je bolesti mogu imitirati i pogrešne su dijagnoze danas važan problem sa značajnim posljedicama za pacijente (35). Za postavljanje dijagnoze koriste se McDonaldovi kriteriji koji se temelje na dva postulata. Prvi je diseminacija u prostoru, a označava klinički ili neuroradiološki nalaz oštećenja u najmanje dvije regije SŽS-a. Drugi, kriterij diseminacije u vremenu, ispunjen je postojanjem kliničkoga ili slikovnog dokaza da su oštećenja nastala u različito vrijeme (2). Nakon revizije McDonaldovih kriterija 2017. godine, kod tipične kliničke prezentacije CIS-a s dokazom diseminacije u prostoru na MR-u, ako postoje pozitivne OCB u likvoru, dijagnoza može biti postavljena bez dokaza diseminacije u vremenu (Tablica 1) (36).

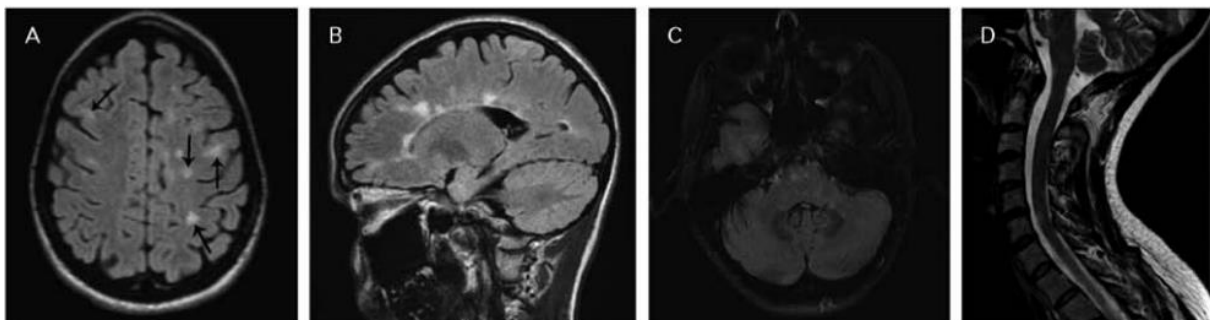
**Tablica 1.** McDonaldovi kriteriji za dijagnozu multiple skleroze

| Broj napadaja           | Broj lezija s objektivnim kliničkim dokazom | Dodatni kriteriji potrebni za dijagnozu multiple skleroze   |
|-------------------------|---|---|
| $\geq 2$                | $\geq 2$                                    | Nema  |
| $\geq 2$                | 1   | Diseminacija u prostoru (napadaj ili lezija na MR-u)  |
| 1                       | $\geq 2$                                    | Diseminacija u vremenu (napadaj ili lezija na MR-u) ili pozitivne OCB u likvoru   |
| 1                       | 1   | Diseminacija u prostoru i diseminacija u vremenu  |
| 0 (primarna progresija) |   | Jedna godina progresije i 2/3: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 1</math> moždana lezija: periventrikularna, jukstakortikalna/kortikalna ili infratentorijalna</li> <li>• <math>\geq 2</math> spinalne lezije</li> <li>• Pozitivne OCB u likvoru</li> </ul> |

Preuzeto i prilagođeno prema: McNicholas N, Hutchinson M, McGuigan C, Chataway J. 2017 McDonald diagnostic criteria: a review of the evidence. *Mult Scler Relat Disord.* 2018;24:48-54.

### 1.6.1. Dijagnostički algoritam multiple skleroze

Pri prezentaciji pacijenta sa simptomima ili znakovima MS-a, prvi je dijagnostički izbor MR mozga, budući da gotovo svi bolesnici s razvijenim MS-om te preko 80% bolesnika s CIS-om imaju abnormalan nalaz. U slučaju kliničke slike mijelopatije ili nalaza MR-a mozga nesugestivnoga za MS, potrebno je uključiti i MR kralježnične moždine. Spinalne demijelinizacijske lezije nalaze se u 80 do 90% bolesnika s MS-om i u 50% bolesnika s CIS-om (37). Tipičan je nalaz multifokalnih hiperintenzivnih lezija bijele tvari periventrikularno, jukstakortikalno i/ili infratentorijalno u T2 i FLAIR sekvencama, dok se u T1 sekvencama prikazuju hipointenzivno kao tzv. „crne rupe“ (2). Lezije su obično ovoidna oblika i dobro ograničene, a spinalne se najčešće protežu kroz jedan do dva vertebralna segmenta ne zauzimajući više od 50% poprečnoga presjeka moždine (Slika 1). Nove, aktivne lezije bojaju se gadolinijskim kontrastom tijekom 6 tjedana u prosjeku (27). Slikovni dokaz diseminacije u vremenu istovremeno je postojanje obojane i nebojane lezije ili pojava nove T2-hiperintenzivne lezije. Diseminacija u prostoru na MR-u označava prisutnost najmanje jedne T2-hiperintenzivne lezije u dvije od četiri regije SŽS-a: periventrikularnoj, kortikalnoj ili jukstakortikalnoj, infratentorijalnoj te u kralježničnoj moždini (35).



**Slika 1.** Tipičan nalaz lezija multiple skleroze na MR-u. a) FLAIR aksijalni prikaz jukstakortikalnih lezija. b) FLAIR sagitalni prikaz periventrikularnih lezija. Lezije korpusa kalozuma stvaraju sliku „Dawsonovih prstiju.“ c) FLAIR aksijalni prikaz infratentorijalnih lezija. d) T2 sagitalni prikaz lezija vratne kralježnične moždine (27).

U većine pacijenata s tipičnim kliničkim i radiološkim nalazom, lumbalna punkcija nije potrebna za dijagnozu, no pruža dodatan dokaz bolesti (37). Preporučena je pri atipičnoj kliničkoj prezentaciji, dobi pojave bolesti i nalazu MR-a, no u većini se europskih zemalja provodi rutinski (6). Zahvaljujući žarišnim i prolaznim oštećenjima KMB-a, tipičan nalaz likvora kod MS-a uključuje normalan ili blago povećan broj leukocita (do 25 stanica po  $\text{cm}^3$ ) i proteina (do 1 g/L) (37,38). Limfociti B dospjeli u SŽS sintetiziraju imunoglobuline intratekalno, a njihov doprinos količini imunoglobulina u likvoru može se izraziti

kvantitativno pomoću albuminsko-imunoglobulinskoga kvocijenta kao povećan IgG indeks, te kvalitativno, detekcijom oligoklonalnih IgG vrpce, najčešće metodom imunofiksacije (38,39). OCB se mogu naći u više od 90% bolesnika (6). Iz Tablice 2 vidljivo je da tipovi OCB-a 2 i 3 potvrđuju intratekalnu sintezu imunoglobulina (40). Većina pacijenata s MS-om ima tip 2 OCB-a, dok je rjeđi tip 3 (41). Njihov se broj tijekom bolesti ne mijenja i nije pod utjecajem terapije (6).

**Tablica 2.** Interpretacija nalaza oligoklonalnih vrpce u likvoru

| Tip oligoklonalnih vrpce | Interpretacija nalaza tipa OCB-a                                |
|--------------------------|---|
| 1                        | Normalan nalaz (nema OCB-a)                                     |
| 2                        | OCB prisutne samo u likvoru                                     |
| 3                        | OCB samo u likvoru i dodatne OCB identične u likvoru i serumu   |
| 4                        | Identične OCB u likvoru i serumu                                |
| 5                        | Monoklonalne vrpce u likvoru i serumu (monoklonalna gamapatija) |

Preuzeto i prilagođeno prema: Trbojevic-Cepe M. Detection of oligoclonal Ig bands: clinical significance and trends in methodological improvement. *EJIFCC*. 2004;31;15:86-94.

Iako je u posljednjim desetljećima značajan trud uložen u otkriće biomarkera MS-a koji bi omogućio poboljšanje dijagnostike, praćenja i ishoda bolesti, većina se rezultata nije pokazala korisnima. Polispecifični, intratekalni, humoralni imunološki odgovor na ospice, rubelu i virus varicella-zoster (VZV) poznat kao „MRZ reakcija“ prisutan je u većine oboljelih: u više od 80% bolesnika povišen je indeks antitijela za barem 1 od ova tri uzročnika. U usporedbi s OCB-om, „MRZ reakcija“ manje je osjetljiva, no više specifična za MS, što je trenutno čini najspecifičnijim dostupnim markerom MS-a. U 99% bolesnika pozitivne su ili OCB ili „MRZ reakcija“, što pojavu oba markera zajedno čini pouzdanom za MS. Međutim, oba biomarkera mogu biti pozitivna u drugim bolestima SŽS-a i trenutno nema konsenzusa o korisnosti antimikrobnih antitijela kao kliničkih biomarkera (42,43).

S obzirom na činjenicu da neke autoimune bolesti imitiraju MS, serološki testovi na autoantitijela kao što su antinuklearna antitijela (ANA), anti-SS/A i anti-SS/B često su dio dijagnostičke obrade MS-a (44). Neka su istraživanja pronašla povećanu učestalost pozitivnosti ANA među oboljelima (41), no rutinsko testiranje na autoimune bolesti rijetko je relevantno u pacijenata s tipičnom kliničkom slikom (37), stoga se smatra potrebnim samo u pacijenata čiji simptomi upućuju na drugu autoimunu bolest (44).

### 1.6.2. Diferencijalna dijagnoza multiple skleroze

S obzirom na nedostatak biomarkera, za dijagnozu MS-a potrebno je isključiti druge moguće uzroke bolesti. Neki se sindromi mogu prezentirati objektivnim dokazima MS-a i klinički ili radiološki demonstrirati diseminaciju u prostoru i vremenu, stoga je nužno razmotriti postojanje tzv. „crvenih zastavica,“ odnosno kliničkih, laboratorijskih ili radioloških znakova koji sugeriraju alternativnu dijagnozu (35).

Najučestalija bolest koju je potrebno diferencirati od MS-a rjeđa je, ali teža bolest, spektar poremećaja optičkoga neuromijelitisa (NMOSD) (27). Riječ je o idiopatskoj, imunoposredovanoj, demijelinizirajućoj i nekrotizirajućoj bolesti koja dominantno zahvaća optičke živce i kralježničnu moždinu (2). U 80% oboljelih detektiraju se antitijela na akvaporin 4, a od 20% seronegativnih bolesnika, dio ima IgG na mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (MOG) (45). Osim navedenih biomarkera, dijagnozu na NMOSD mogu usmjeriti teški ili obostrani optički neuritis, longitudinalno opsežan i kompletni transverzalni mijelitis te sindrom areje postreme obilježen tvrdokornim štućanjem, mućinom i/ili povraćanjem (2,35). Akutni diseminirani encefalomijelitis (ADEM) također je upalna demijelinizacijska bolest SŽS-a, a pojavljuje se pretežno u djece. Obilježen je multifokalnim neurološkim ispadima i encefalopatijom koja je, zbog kliničkoga, radiološkog i laboratorijskog preklapanja s MS-om, ključna za dijagnozu (37).

Opsežan mijelitis također može ukazati na neurosarkoidozu, mijelitis povezan s anti-MOG antitijelima, paraneoplastični sindrom i sistemske reumatološke bolesti. Mijelitis povezan s anti-MOG antitijelima obilježavaju prodromalni simptomi i abnormalnosti sive tvari na MR-u. Zahvaćenost većega broja kranijalnih živaca upućuje na neurosarkoidozu, a visoka pleocitoza u likvoru na druge infektivne i upalne bolesti SŽS-a. Reumatološke i paraneoplastične bolesti često su praćene sistemskim simptomima kao što su bol u zglobovima, kožne promjene i gubitak tjelesne težine (35). Iako su najčešće manifestacije sistemskoga eritemskog lupusa na SŽS-u cerebrovaskularna bolest i epilepsija, on se može prezentirati i demijelinizacijskim sindromom te radiološki ispuniti kriterije za MS. Neka od antitijela povezana s ovom bolešću jesu antitijela protiv dvostruke uzvojnice DNA (anti-dsDNA), antifosfolipidna antitijela (aPL) i antitijela protiv ribosomskog P proteina (anti-RPP). Antifosfolipidni sindrom karakteriziran je patološkim trudnoćama i prisutnošću aPL-a koji se sastoje od lupus antikoagulanta, antikardiolipinskih antitijela (aCL) i antitijela protiv beta-2-glikoproteina 1 (b-2-GPI 1). Antifosfolipidni sindrom može imitirati MS kliničkom slikom optičkoga neuritisa i transverzalnoga mijelitisa te radiološkim nalazima

MR-a. Zahvaćenost SŽS-a može biti prvi znak Sjögrenova sindroma koji je povezan s antinuklearnim antitijelima, posebno anti-Ro (SS-A) i anti-La (SS-B). U diferencijalnu dijagnozu MS-a ulaze i vaskulitis povezan s ANCA protutijelima kao što su antitijela na proteinazu 3 (PR3) i mijeloperoksidazu (MPO), Behçetova bolest te primarni vaskulitis SŽS-a kao rijetka i vrlo heterogena bolest (41).

Među infektivnim bolestima, u diferencijalnoj dijagnozi MS-a ističe se boreliozna (Lajmska bolest), zoonoza uzrokovana spirohetom *Borrelia* koju prenose krpelji iz vrste *Ixodes*. Više od 35% zaraženih osoba u Europi, osim klasičnog eritema i općih simptoma, prezentira se leukoencefalopatijom. Nalazi likvora i MR-a imitiraju MS, pa u diferenciranju od MS-a mogu pripomoći zahvaćenost moždanih ovojnica, kranijalnih živaca i mjerenje antitijela u serumu i likvoru (46).

### 1.6.3. EDSS

Za procjenu progresije bolesti i djelovanja terapije, najšira je uporaba proširene ljestvice statusa invaliditeta (EDSS) kojom se bolesnikovo stanje boduje brojkama od 0 (normalan neurološki status) do 10 (smrt zbog MS-a) s intervalima od 0,5 bodova nakon što dosegne EDSS 1 (47). Bodovanje se temelji na procjeni 8 funkcionalnih sustava: vidne funkcije, funkcije moždanoga debla, piramidne funkcije, funkcije maloga mozga, osjetne funkcije, funkcije mokraćnoga mjehura i crijeva, cerebralne funkcije i pokretnost (48). Za bodove od 1 do 4 vrednuje se neurološki status, EDSS u vrijednosti od 4 do 6 bodova ovisi o sposobnosti hodanja, dok dio ljestvice iznad 6 bodova mjeri hendikep pacijenta (47).

## 1.7. Liječenje multiple skleroze

Trenutno ne postoji konačan lijek za MS (49). Terapija se dijeli na liječenje relapsa, liječenje koje modificira tijek bolesti i simptomatsko liječenje (2).

### 1.7.1. Liječenje relapsa multiple skleroze

Standard za liječenje relapsa MS-a jest tzv. „pulsna“ kortikosteroidna terapija metilprednizolonom u visokim dozama od 500 do 1000 mg intravenski tijekom 3 do 5 dana (2). Postupno smanjenje doze nakon primijenjene terapije nije potrebno, budući da kratkotrajno liječenje ne suprimira hipotalamičko-hipofizno-adrenalnu os, a smanjenje doze ne pridonosi ishodu liječenja. Najčešće su nuspojave metalni okus, crvenilo lica i gastrointestinalne smetnje, dok rijetke, ali ozbiljne nuspojave uključuju avaskularnu nekrozu

kosti, pankreatitis, hepatitis i psihozu. Zbog nepredvidiva porasta serumskoga kortizola i neugodnosti intramuskularne primjene, rjeđe se za liječenje koristi adrenokortikotropni hormon (50). Ovi lijekovi ubrzavaju neurološki oporavak nakon relapsa, no nisu učinkoviti u sprječavanju relapsa i ne mogu poslužiti kao dugoročna terapija MS-a. Osim toga, fizikalna rehabilitacija široko je prihvaćena u liječenju MS-a. Zahvaljujući spontanome djelomičnom oporavku koji slijedi većinu relapsa, točan učinak liječenja teško je izdvojiti. U pacijenata s teškim relapsima refraktornima na steroidnu terapiju, plazmafereza se smatra korisnom drugom linijom liječenja. Blage relapse prihvatljivo je pratiti bez liječenja, a u odluci o liječenju u obzir se uzimaju klinička slika i nalaz MR-a (2,50).

### 1.7.2. Liječenje koje modificira tijek bolesti

Za liječenje RRMS-a odobreno je više od 10 lijekova koji djeluju na imunološki sustav (16) s ciljem smanjenja rane kliničke ili subkliničke aktivnosti bolesti (51). Oni smanjuju učestalost i težinu relapsa te akumulaciju lezija na MR-u, odgađaju, stabiliziraju, a u nekim slučajevima i umjereno smanjuju invalidnost (52). Dije se na lijekove umjerene učinkovitosti, ali dobrog sigurnosnog profila, i lijekove visoke učinkovitosti, ali slabije sigurnosti (2). Izbor lijeka ovisi o aktivnosti i težini zadnjega relapsa, stupnju onesposobljenosti, broju aktivnih lezija na MR-u, dostupnosti i cijeni terapije, komorbiditetima, mogućim nuspojavama i potrebama monitoriranja pacijenta. Najčešći je pristup liječenju sekvencijska ili eskalacijska strategija (53) koja započinje prvom linijom lijekova, odnosno lijekovima umjerene učinkovitosti i visoke sigurnosti. U navedene se ubrajaju interferoni  $\beta$ , glatiramer-acetat, teriflunomid i dimetil-fumarat (2). Ovaj pristup u većini slučajeva eskalira relapsom, kada se lijek mijenja drugom linijom lijekova koji su visoko učinkoviti, no lošijega sigurnosnog profila (53). Drugi je pristup induksijska strategija kojom se liječenje započinje visokoučinkovitim lijekovima u koje se ubrajaju natalizumab, fingolimod, alemtuzumab, kladribin i okrelizumab. Ovoj se strategiji pristupa u slučaju aktivnoga tijeka bolesti od početka i u prisutnosti negativnih prognostičkih čimbenika kao što su starija dob, multifokalna bolest, zahvaćenost moždanoga debla ili kralježnične moždine, dvije ili više aktivnih lezija na MR-u ili najmanje devet lezija na početku bolesti. U liječenju PPMS-a, jedini lijek koji pokazuje učinkovitost jest okrelizumab (2).

Interferon  $\beta$  prvi je odobreni lijek za liječenje RRMS-a (54). Prirodni je protuupalni citokin kompleksna mehanizma djelovanja koji uključuje povećanje produkcije drugih protuupalnih citokina, inhibiciju stvaranja proupalnih citokina, ograničavanje leukocitne migracije kroz KMB i sintezu medijatora popravka tkiva. Rekombinantne forme dostupne su

za supkutanu i intramuskularnu primjenu (55). U usporedbi s novijim lijekovima koji mijenjaju tijek bolesti, odgovor je na terapiju interferonom kratkotrajniji. Najčešće su nuspojave simptomi slični gripi, reakcija na mjestu primjene, depresija i povišeni jetreni enzimi (56).

Glatiramer-acetat, zahvaljujući strukturnoj sličnosti MBP-u, inhibira stvaranje limfocita T reaktivnih na mijelin te inducira specifičnu ekspresiju regulatornih T-stanica i produkciju protuupalnih citokina (20). Smatra se jednako učinkovitim kao interferon. Nuspojave uključuju reakciju na mjestu primjene, crvenilo, dispneju, palpitacije i, rjeđe, lipoatrofiju koja zahtijeva prekid liječenja (52).

Teriflunomid je peroralni inhibitor enzima dihidroorotat-dehidrogenaze koji sudjeluje u sintezi pirimidina, a vjeruje se da učinak na MS postiže inhibicijom proliferacije limfocita (20). Njegova je učinkovitost slična učinkovitosti interferona. Najčešće su nuspojave porast alanin-aminotransferaze, proljev, glavobolja, mučnina i gubitak kose (49), a rjeđe su neutropenija i hipertenzija. Osim toga, lijek ima teratogeno djelovanje (20).

Dimetil-fumarat prvi je peroralni lijek odobren za prvu liniju liječenja (57). Protuupalni i citoprotektivan učinak ostvaruje aktivacijom signalnoga puta transkripcijskog faktora nalik na nuklearni faktor 2 (Nrf2) (52). Nuspojave su blage, a najčešće su crvenilo i gastrointestinalni simptomi. Lijek je povezan s blago povećanim rizikom od progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML), koja je značajnija kod primjene natalizumaba (57).

Natalizumab je humano monoklonsko protutijelo koje inhibicijom integrina  $\alpha 4\beta 1$  na površini limfocita blokira njihovu transmigraciju preko endotela u SŽS. Primjenjuje se u intravenskoj infuziji i visoko je učinkovit u liječenju relapsa i dugotrajnome usporenju progresije bolesti. Dobro se podnosi, no dugotrajna terapija nosi rizik od PML-a (52), infektivne demijelinizirajuće bolesti uzrokovane reaktivacijom poliomavirusa John Cunningham (JCV). Primarna je infekcija obično asimptomatska i javlja se u ranim godinama života (58), a rizik od PML-a može se procijeniti na temelju razine antitijela na JCV u serumu. Natalizumab se uglavnom preporučuje samo seronegativnim pacijentima (52).

Fingolimod je prvi peroralni lijek odobren za RRMS. Vezanjem na receptor za sfingozin-1-fosfat na limfocitima sprječava njihov izlazak iz limfnoga tkiva, blokirajući na taj način njihov ulazak u SŽS. Visoko je učinkovit, no vezanjem na iste receptore na kardiomiocitima može dovesti do bradikardije i bloka atrioventrikulskoga čvora. Nadalje, povećava rizik od infekcije VZV-om, a prijavljeni su i slučajevi herpesnoga i kriptokoknog meningoencefalitisa te PML-a (57).

Alemtuzumab je humanizirano monoklonsko protutijelo za supkutanu primjenu koje veže molekulu CD52 izraženu na NK-stanicama, limfocitima, monocitima i drugim granulocitima (49). Značajno smanjuje učestalost relapsa i progresiju bolesti (54), no povezan je s ozbiljnim nuspojavama koje uključuju sekundarne autoimune bolesti i infekcije (53).

Kladribin je purinski nukleotid koji vezanjem za DNA proliferirajućih stanica dovodi do njihove apoptoze. Oralni je kemoterapeutik koji smanjenjem broja cirkulirajućih limfocita T i B značajno smanjuje rizik od invalidnosti i egzacerbacije. Njegova sigurnost i rizik od izazivanja karcinoma nisu do kraja istraženi (49).

Okrelizumab je humanizirano monoklonsko protutijelo usmjereno na molekulu CD20 koje putem antitijelima i komplementom posredovane citotoksičnosti smanjuje broj cirkulirajućih zrelih i nezrelih B-stanica uz poštedu plazma stanica negativnih na CD20 i T-stanica. Značajno je klinički učinkovit u liječenju RRMS-a, a pokazuje i dobre rezultate za PPMS. Najčešća je nuspojava infuzijska reakcija. Okrelizumab povećava rizik od infekcija, a povezanost s PML-om i neoplazmama još se istražuje (59,60).

### 1.7.3. Simptomatsko liječenje multiple skleroze

Simptomatska terapija vrlo je važan dio liječenja MS-a i može imati veći utjecaj na kvalitetu života bolesnika nego lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti. U liječenju poremećaja mokrenja mogu se koristiti antikolinergici, injekcija botulinum toksina u mišić detruzor i samokateterizacija. Konstipacija se liječi prikladnom prehranom i hidracijom te omekšivačima stolice, glicerolom ili laksativima. Za liječenje neuropatske boli izbor su triciklički antidepresivi, antiepileptici i blokatori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina. Amantadin je pokazao učinkovitost u liječenju umora. Lijekovi izbora u liječenju depresije jesu selektivni blokatori ponovne pohrane serotonina. U liječenju spastičnosti najčešće se primjenjuju baklofen i tizanidin, a ponekad i kanabinoidi. Muškarci sa seksualnom disfunkcijom liječe se sildenafilom (2,61). U uznapredovaloj fazi bolesti može se primijeniti rehabilitacija s fizioterapijom (62).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. Cilj istraživanja**

Primarni je cilj ovoga istraživanja utvrditi doprinos imunoloških i mikrobioloških pretraga dijagnostici multiple skleroze.

Sekundarni ciljevi istraživanja jesu:

- Prikazati učestalost patoloških nalaza u likvoru u pacijenata s MS-om te udio oligoklonalnih vrpca tipičnih za MS;
- Ispitati povezanost oligoklonalnih vrpca s tipičnom, odnosno atipičnom inicijalnom kliničkom prezentacijom MS-a;
- Prikazati rezultate imunološke i mikrobiološke dijagnostike te ispitati njihovu povezanost s kliničkom slikom i promjenama u likvoru.

## **2.2. Hipoteze**

1. Tip oligoklonalnih vrpca povezan je s inicijalnom kliničkom prezentacijom MS-a;
2. U obradi pacijenata s MS-om radi se velik broj imunoloških pretraga koje nemaju većeg utjecaja na promjene u likvoru niti na kliničku prezentaciju;
3. U pacijenata s MS-om postoji povećana seroprevalencija antitijela na EBV kao i značajno češća intratekalna sinteza IgG-a na viruse ospica, rubele i VZV;
4. Pozitivni nalazi mikrobioloških pretraga u likvoru ne utječu na rezultate ostale likvorske dijagnostike niti na kliničku prezentaciju MS-a.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

### **3.1. Ispitanici**

U ovo istraživanje uključeno je 100 pacijenata s dijagnozom multiple skleroze kojima je napravljena lumbalna punkcija i dodatna laboratorijska obrada prije definitivne potvrde dijagnoze. Kriteriji uključanja u istraživanje bili su dijagnoza multiple skleroze, dob veća od 18 godina i dostupni nalazi imunološke i/ili mikrobiološke obrade pacijenta.

### **3.2. Ustroj istraživanja**

Provedeno je retrospektivno kohortno istraživanje analizom podataka iz 2020. i 2021. godine prikupljenih u dnevnoj bolnici Klinike za neurologiju Kliničkoga bolničkog centra Split.

### **3.3. Etička načela**

Etičko povjerenstvo Kliničkoga bolničkog centra Split odobrilo je ovo istraživanje rješenjem br. 2181-147/01/06/M.S.-22-02 te su zaštićeni osobni podatci i prava ispitanika sukladno sa Zakonom o zaštiti prava pacijenata (NN169/04, 37/08) i Zakonom o provedbi Opće uredbe o zaštiti podataka (NN 42/18). Istraživanje je provedeno sukladno s odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN55/08, 139/15) i s pravilima Helsinške deklaracije WMA 1964-2013 na koje upućuje kodeks.

### **3.4. Postupci istraživanja**

Ulazni podatci bili su: godina rođenja, spol, prvi simptom, godina pojave prvoga simptoma, godina postavljanja dijagnoze MS-a, nalaz broja leukocita te koncentracije glukoze, laktata i proteina u likvoru, tip oligoklonalnih vrpca te rezultati imunoloških i mikrobioloških pretraga koje su učinjene metodom ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Od imunoloških pretraga, u ovo istraživanje nismo uračunali:

- antitijela ispitana radi druge suspektne ili postojeće autoimune bolesti,
- antitijela na akvaporin 4 i MOG, čija bi pozitivnost isključila dijagnozu MS-a i
- lupus antikoagulant, koji se ispituje testovima koagulacije.

### 3.3. Statističke metode

Prikupljeni podatci uneseni su u Tablicu na softverskome programu Microsoft Excel i obrađeni u statističkome softverskom paketu SPSS 20.0 (IMB Corp, Armonk, NY). Kvantitativni podatci prikazni su uz pomoć medijana (Q1-13; min-maks). Statistička usporedba dvaju skupina napravljena je Mann-Whitneyjevim U testom. Kvalitativne podatke prikazali smo pomoću apsolutnih i relativnih brojeva. Povezanost kvalitativnih podataka ispitali smo hi-hvadrat ( $\chi^2$ ) testom, a rezultate smo interpretirali na razini značajnosti od  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

Od ukupnoga broja ispitanika (N=100), bilo je 76 (76%) žena i 24 (24%) muškaraca. Dob ispitanika prikazana je u Tablici 3.

**Tablica 3.** Dob pacijenata u trenutku prikupljanja podataka, u vrijeme pojave prvoga simptoma i u trenutku postavljanja dijagnoze MS-a

| Parametri                 | Dob (godine)        |
|---------------------------|---------------------|
| Dob pacijenta             | 36,5 (29-48; 20-68) |
| Dob pojave prvih simptoma | 34,5 (27-44; 19-67) |
| Dob dijagnoze             | 35 (27-46; 19-67)   |

Podatci su prikazani kao medijan (Q1-Q3; min-maks)

Među 75 (75%) ispitanika s odgovarajućim podacima, za njih 51 (68%) dijagnoza je postavljena iste godine kada su se pojavili simptomi, za njih 11 (14,7%) sljedeće godine, za njih 8 (10,7%) nakon 3 do 5 godina od pojave simptoma, te za njih 5 (6,7%) između 8 i 13 godina od pojave prvih simptoma. Za 89 (89%) ispitanika pronašli smo anamnestički podatak o prvim simptomima MS-a koji su prikazani u Tablici 4.

**Tablica 4.** Klinička prezentacija prvih smetnji u sklopu MS-a

| Tipični simptomi                  | Broj (%) ispitanika (N=89) | Atipični simptomi   | Broj (%) ispitanika (N=89) |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|
| Smetnje vida                      | 28 (31,5)                  | Umor                | 1 (1,1)                    |
| Smetnje ravnoteže                 | 7 (7,9)                    | Glavobolja          | 6 (6,7)                    |
| Ispad osjeta                      | 19 (21,3)                  | Povraćanje          | 1 (1,1)                    |
| Poremećaji motorike               | 8 (8,9)                    | Smetnje govora      | 1 (1,1)                    |
| Poremećaji sfinktera <sup>a</sup> | 1 (1,1)                    | Poremećaji svijesti | 1 (1,1)                    |
| ≥2 tipičnih simptoma              | 16 (17,9)                  |                     |                            |
| Ukupno                            | 79 (88,7)                  | Ukupno              | 10 (11,2)                  |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

<sup>a</sup> U sklopu oštećenja u području kralježnične moždine

#### 4.1. Rezultati analize likvora

Broj leukocita te razine glukoze, laktata i proteina u likvoru podijelili smo na vrijednosti unutar referentnoga intervala i patološke vrijednosti (Tablica 5). Podatak o broju leukocita u likvoru bio je dostupan za 61 (61%) ispitanika, o razini glukoze za 59 (59%) ispitanika, razini laktata u 58 (58%) ispitanika i o razini proteina 85 (85%) ispitanika.

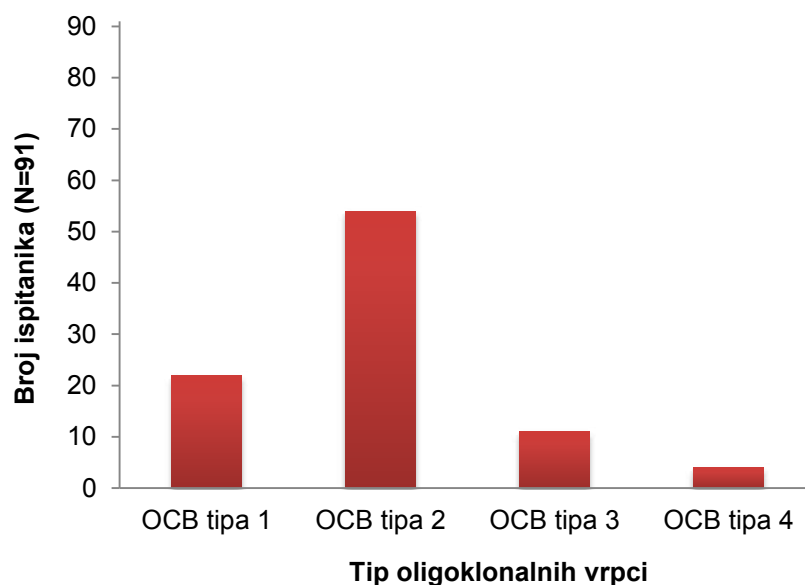
**Tablica 5.** Prikaz kvantitativne i kvalitativne analize nalaza iz likvora

| Varijable                                | Medijan                 | Broj (%) ispitanika |
|--|-------------------------|---------------------|
| Broj leukocita po mL<br>(N=61)           | 3 (1-6; 0-70)           |                     |
| 0-5                                      |                         | 45 (74)             |
| > 5                                      |                         | 16 (26)             |
| Koncentracija glukoze (mmol/L)<br>(N=59) | 3,4 (3,0-3,6; 2,8-6,2)  |                     |
| 2,49-4,44                                |                         | 57 (97)             |
| >4,44                                    |                         | 2 (3)               |
| Koncentracija laktata (mmol/L)<br>(N=58) | 1,34 (1,2-1,5; 0,9-1,7) |                     |
| 1.1-2.2                                  |                         | 53 (91)             |
| < 1.1                                    |                         | 5 (9)               |
| Koncentracija proteina (mg/L)<br>(N=85)  | 364 (287-450; 185-665)  |                     |
| 170-370                                  |                         | 44 (52)             |
| >370                                     |                         | 41 (48)             |

Podatci su prikazani kao medijan (Q1-Q3; min-maks) i kao brojevi (postotci)

Raspodjelu tipova OCB-a prikazali smo na Slici 2. Podatak o OCB-u imao je 91 (91%) ispitanik. Najveći broj pacijenata, njih 54 (59,3%), imao je OCB tipa 2, tip 3 OCB-a imalo je njih 11 (12,1%), tip 4 njih 4 (4,4%), dok je u potpunosti uredan nalaz (tip 1) bio prisutan u 22 (24,2%) ispitanika.





**Slika 2.** Raspodjela tipova oligoklonalnih vrpca u ispitanika  
OCB – oligoklonalne vrpce (engl. *oligoclonal bands*)

Tipične OCB (tip 2 i 3) i atipične (tip 1 i 4) usporedili smo s brojem leukocita i koncentracijom proteina u likvoru (Tablica 6).

**Tablica 6.** Povezanost vrste OCB s brojem leukocita i količinom proteina u likvoru

| Varijable                               | OCB tipa 2 ili 3 | OCB tipa 1 ili 4 | <i>P</i> * | $\chi^2$ * |
|---|------------------|------------------|------------|------------|
| Broj leukocita po mL<br>(N=61)          |                  |                  |            |            |
| 0-5                                     | 26 (62)          | 19 (100)         | 0,005      | 7,9        |
| > 5                                     | 16 (38)          | 0                |            |            |
| Koncentracija proteina (mg/L)<br>(N=85) |                  |                  |            |            |
| 170-370                                 | 31 (50)          | 13 (56)          | 0,772      | 0,084      |
| >370                                    | 31 (50)          | 10 (44)          |            |            |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

\* hi-kvadrat test

Utvrđen je statistički značajno manji broj leukocita u likvoru u pacijenata s OCB-om tipa 1 ili 4 ( $\chi^2=7,9$ ;  $P=0,084$ ).

Broj leukocita, kao ni količina proteina u likvoru i vrsta OCB-a, nisu pokazali statistički značajnu povezanost s prvom kliničkom prezentacijom MS-a (Tablica 7). Treba napomenuti da nijedan pacijent s atipičnom kliničkom slikom nije imao povišen broj leukocita u likvoru, uz ograničenje da se radi o vrlo malome broju ispitanika (N=6).

**Tablica 7.** Prikaz povezanosti promjena u likvoru s prvom kliničkom prezentacijom

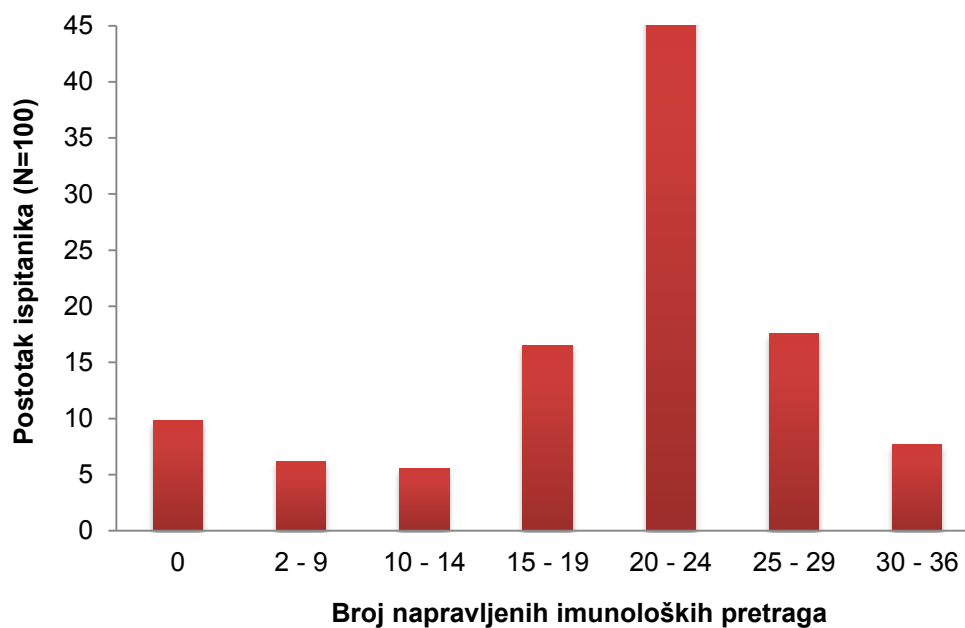
| Varijabla                               | Tipični prvi simptomi | Atipični prvi simptomi | <i>P</i> * | $\chi^2$ * |
|---|-----------------------|------------------------|------------|------------|
| Broj leukocita po mL<br>(N=56)          |                       |                        |            |            |
| 0-5                                     | 34 (68)               | 6 (100)                | Nema       |            |
| > 5                                     | 16 (32)               | 0 (0)                  |            |            |
| Koncentracija proteina (mg/L)<br>(N=76) |                       |                        |            |            |
| 170-370                                 | 34 (51)               | 5 (56)                 | Nema       |            |
| > 370                                   | 33 (49)               | 4 (44)                 |            |            |
| Tip OCB<br>(N=82)                       |                       |                        |            |            |
| 2, 3                                    | 55 (76)               | 5 (50)                 | 0,166      | 1,9        |
| 1, 4                                    | 17 (24)               | 5 (50)                 |            |            |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

\* hi-kvadrat test

#### 4.2. Rezultati analize imunološke obrade ispitanika

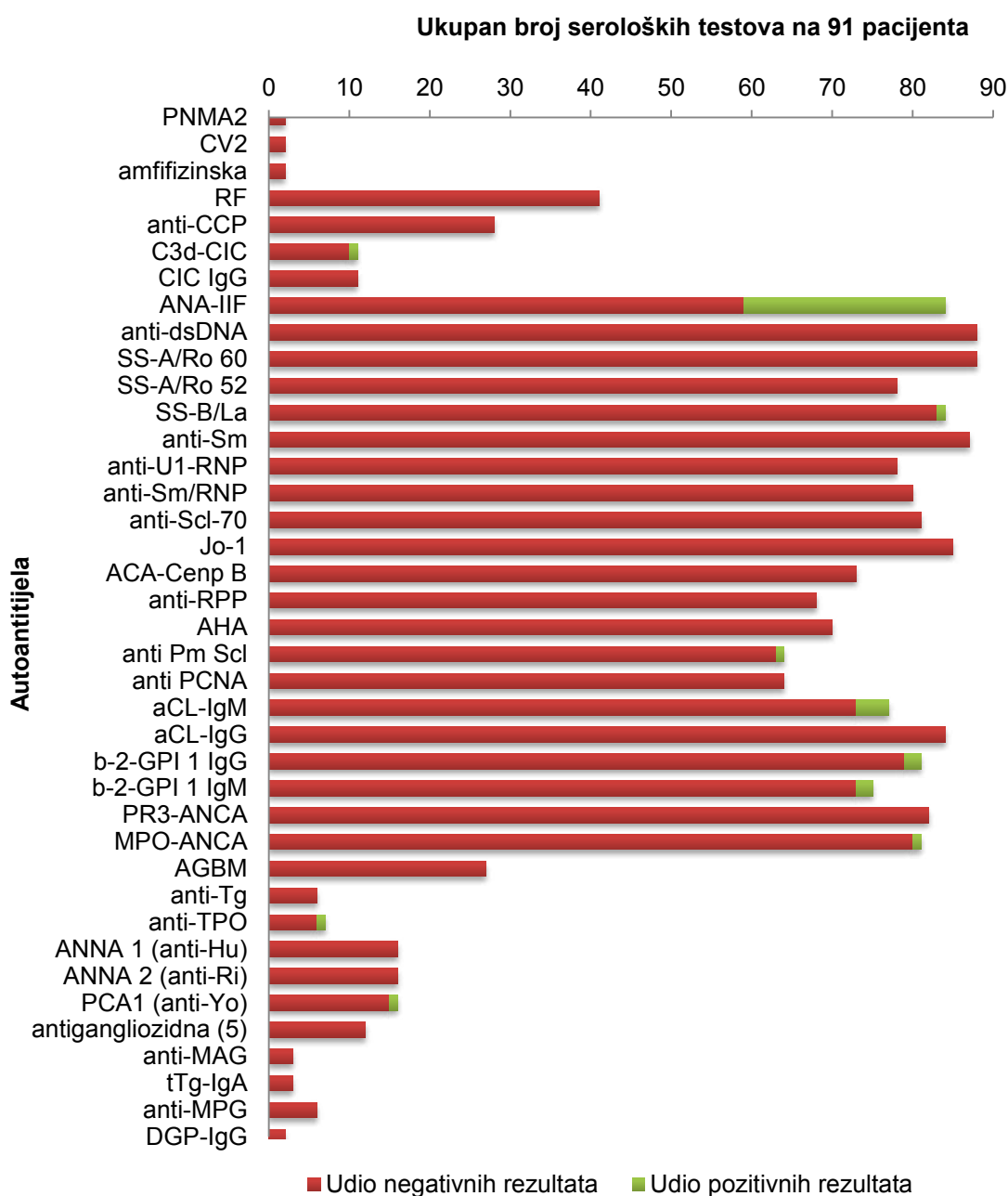
Imunološke pretrage obavljene su u 91 ispitanika. Medijan broja ispitanih autoantitijela iznosi 21 (Q1-Q3: 17-24; min-maks 0-36) (Slika 3).



**Slika 3.** Prikaz broja traženih autoantitijela u serumu

Medijan broja ispitanih autoantitijela u skupini ispitanika s tipičnim prvim simptomima iznosi 21 (Q1-Q3: 20-25; min-maks 5-33), a u skupini ispitanika s atipičnim prvim simptomima 20 (Q1-Q3: 9-27; min-maks: 2-36). Nema statistički značajne razlike broja imunoloških pretraga između skupine s tipičnom i atipičnom kliničkom prezentacijom ( $Z=1,22$ ;  $P=0,224$ ).

Između svih ispitanih, obavljene su imunološke pretrage na ukupno 43 autoantitijela (Slika 4). U 32 (35,2%) ispitanika barem je jedno autoantitijelo u serumu bilo pozitivno. U 6 (6,5%) ispitanika bilo je pozitivno više od jednog antitijela.



**Slika 4.** Ukupan broj pretraga i udio pozitivnih rezultata za svako ispitano autoantitijelo

Među svim ispitanicima, pronađen je pozitivan rezultat na ukupno 10 različitih autoantitijela. Sva ostala antitijela bila su negativna u svih ispitanih pacijenata.

Nije pronađena statistički značajna povezanost rezultata imunoloških pretraga i prve kliničke prezentacije MS-a, niti njihova povezanost s brojem leukocita i koncentracijom proteina u likvoru ili tipom OCB-a (Tablica 8).

**Tablica 8.** Povezanost pozitiviteta autoantitijela s prvim simptomima MS-a i osnovnom analizom likvora

| Parametri   | Ispitanici bez ijednoga pozitivnog antitijela | Ispitanici s barem 1 pozitivnim antitijelom | <i>P</i> * | $\chi^2$ * |
|---|---|---|------------|------------|
| Prvi simptom<br>(N=80)                            |   |   |            |            |
| Tipični   | 48 (91)                                       | 24 (89)                                     | 0,813      | 0,056      |
| Atipični  | 5 (9)   | 3 (11)                                      |            |            |
| Broj leukocita po mL u likvoru<br>(N=57)          |   |   |            |            |
| 0-5   | 31 (77)                                       | 11 (65)                                     | 0,500      | 0,455      |
| > 5   | 9 (23)  | 6 (35)                                      |            |            |
| Koncentracija proteina u likvoru (mg/L)<br>(N=77) |   |   |            |            |
| 170-370   | 27 (56)                                       | 12 (41)                                     | 0,303      | 1,06       |
| > 370   | 21 (44)                                       | 17 (59)                                     |            |            |
| TipOCB<br>(N=82)                                  |   |   |            |            |
| 2 ili 3   | 35 (66)                                       | 22 (76)                                     | 0,501      | 0,453      |
| 1 ili 4   | 18 (34)                                       | 7 (24)                                      |            |            |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

\* hi-kvadrat test

Od antitijela smo zasebno analizirali ANA i njenu eventualnu povezanost s prvim simptomima, brojem leukocita i količinom proteina u likvoru te tipom OCB-a. Nije pronađena statistički značajna povezanost ni s jednim od parametara (Tablica 9).

**Tablica 9.** Povezanost ANA s prvim simptomima MS-a i nalazima likvora

| Parametri                               | Ispitanici negativni<br>na ANA | Ispitanici pozitivni<br>na ANA | <i>P</i> * | $\chi^2$ * |
|---|--------------------------------|--------------------------------|------------|------------|
| Prvi simptomi<br>(N=80)                 |                                |                                |            |            |
| Tipični                                 | 53 (90)                        | 19 (90)                        | 0,932      | 0,007      |
| Atipični                                | 6 (10)                         | 2 (10)                         |            |            |
| Broj leukocita po mL<br>(N=57)          |                                |                                |            |            |
| 0-5                                     | 35 (78)                        | 7 (58)                         | 0,322      | 0,981      |
| > 5                                     | 10 (22)                        | 5 (42)                         |            |            |
| Koncentracija proteina (mg/L)<br>(N=77) |                                |                                |            |            |
| 170-370                                 | 32 (58)                        | 7 (32)                         | 0,066      | 3,4        |
| > 370                                   | 23 (42)                        | 15 (68)                        |            |            |
| Tip OCB<br>(N=82)                       |                                |                                |            |            |
| 2, 3                                    | 39 (65)                        | 18 (82)                        | 0,232      | 0,143      |
| 1, 4                                    | 21 (35)                        | 4 (18)                         |            |            |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

\* hi-kvadrat test

### 4.3. Rezultati analize mikrobiološke obrade

Serum i likvor 90 ispitanika poslani su na mikrobiološku analizu koja uključuje mjerenje imunoglobulinskih antitijela na 8 mikroorganizama prikazanih u Tablici 10. Na EBV ispitano je 87 (87%) pacijenata, na CMV 86 (86%), na HSV i *B. burgdoferi* 85 (85%), na virus rubele 61 (61%), na virus ospica 67 (67%), na VZV 80 (80%) i na *M. pneumoniae* 30 (30%) pacijenata.

**Tablica 10.** Rezultati mikrobioloških pretraga u serumu i likvoru

| Uzročnik                                    | Broj (%) ispitanika s pozitivnim nalazom |                       |                            |
|---|--|-----------------------|----------------------------|
|   | IgM u serumu                             | IgG u serumu          | Intratekalna sinteza IgG-a |
| EBV<br>(N=87)                               | 4 (4,6)                                  | 87 (100) <sup>a</sup> | 4 (4,6)                    |
| CMV<br>(N=86)                               | 0 (0)                                    | 54 (62,8)             | 0 (0)                      |
| HSV tip 1 i 2<br>(N=85)                     | 4 (4,7)                                  | 68 (80)               | 10 (11,8)                  |
| <i>B. burgdoferi</i><br>(N=85)              | 5 (5,9)                                  | 3 (3,5)               | 0 (0)                      |
| Virus rubele<br>(N=61)                      | 0 (0)                                    | 53 (86,9)             | 14 (22,9)                  |
| Virus ospica<br>(N=67)                      | 0 (0)                                    | 50 (74,6)             | 8 (11,)                    |
| VZV<br>(N=80)                               | 0 (0)                                    | 72 (90)               | 20 (25)                    |
| <i>M. pneumoniae</i><br>(N=30) <sup>b</sup> | 3 (1)                                    | 13 (43,3)             | /                          |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

<sup>a</sup> Odnosi se na VCA i na EBNA1 IgG

<sup>b</sup> Ispituje se samo u serumu

Intratekalnu sintezu na barem jednoga uzročnika pokazalo je 32 (36%) ispitanika, a povezanost intratekalne sinteze antiviralnoga IgG-a s prvom kliničkom prezentacijom i nalazima likvora prikazana je u Tablici 11.

**Tablica 11.** Povezanost intratekalne sinteze s prvom kliničkom prezentacijom MS-a i promjenama u likvoru

| Parametri                            | Ispitanici bez intratekalne sinteze antiviralnog IgG-a | Ispitanici s intratekalnom sintezom IgG-a na barem 1 virus | <i>P</i> * | $\chi^2$ * |
|--------------------------------------|--|--|------------|------------|
| Prvi simptomi (N=78)                 |  |  |            |            |
| Tipični                              | 40 (82)  | 28 (97)  | 0,120      | 2,42       |
| Atipični                             | 9 (18)   | 1 (3)  |            |            |
| Broj leukocita po mL (N=59)          |  |  |            |            |
| 0-5                                  | 30 (81)  | 14 (67)  | 0,468      | 0,526      |
| > 5                                  | 8 (21)   | 7 (33)   |            |            |
| Koncentracija proteina (mg/L) (N=82) |  |  |            |            |
| 170-370                              | 30 (58)  | 14 (47)  | 0,463      | 0,540      |
| >370                                 | 22 (42)  | 16 (53)  |            |            |
| OCB (N=86)                           |  |  |            |            |
| 2 ili 3                              | 31 (56)  | 31 (100)   | <0,001     | 16,7       |
| 1 ili 4                              | 24 (44)  | 0  |            |            |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

\* hi-kvadrat test

Nije pronađena statistički značajna povezanost intratekalne sinteze antiviralnoga IgG-a s prvim simptomima, brojem leukocita i razinom proteina u likvoru. Napravljena je i analiza povezanosti tipa OCB-a s intratekalnom sintezom IgG-a na neurotropne uzročnike. Statistički je značajno više pacijenata s tipom OCB-a 2 ili 3 u skupini ispitanika u kojoj je detektirana intratekalna sinteza. Svi pacijenti s intratekalnom sintezom imali su OCB tipa 2 ili 3.

Od 60 pacijenata ispitanih na MRZ reakciju, intratekalna sinteza IgG-a na sva 3 uzročnika pronađena je u svega dva (3,3%) ispitanika. Osmam (13,3%) ispitanika imalo je intratekalnu sintezu na dva, a 16 (28,3%) ispitanika na jedan od ova tri virusa. Od 85 pacijenata ispitanih na barem jedan od njih, intratekalna sinteza IgG-a pronađena je u 30 (35,3%) ispitanika. U Tablici 12 prikazana je usporedba intratekalne sinteze s prvim simptomima i nalazima likvora.

**Tablica 12.** Utjecaj MRZ pozitiviteta na prvu kliničku prezentaciju MS-a i na promjene u likvoru

| Parametri                                   | Ispitanici bez intratekalne sinteze IgG-a na „MRZ“ | Ispitanici s intratekalnom sintezom IgG-a na „MRZ“ | <i>P</i> * | $\chi^2$ * |
|---|--|--|------------|------------|
| <b>Prvi simptomi (N=77)</b>                 |  |  |            |            |
| Tipični                                     | 40 (82)  | 27 (96)  | 0,132      | 2,27       |
| Atipični                                    | 9 (18)   | 1 (4)  |            |            |
| <b>Broj leukocita po mL (N=57)</b>          |  |  |            |            |
| 0-5   | 30 (83)  | 13 (62)  | 0,135      | 2,23       |
| > 5   | 6 (17)   | 8 (38)   |            |            |
| <b>Koncentracija proteina (mg/L) (N=80)</b> |  |  |            |            |
| 170-370                                     | 29 (57)  | 14 (48)  | 0,612      | 0,257      |
| >370  | 22 (43)  | 15 (52)  |            |            |
| <b>OCB (N=84)</b>                           |  |  |            |            |
| 2 ili 3                                     | 31 (57)  | 30 (100)   | <0,001     | 15,5       |
| 1 ili 4                                     | 23 (43)  | 0  |            |            |

Podatci su prikazani kao brojevi (postotci)

\* hi-kvadrat test.

Pronađena je statistički značajna povezanost intratekalne sinteze IgG-a na MRZ s tipom OCB-a. Svi pacijenti s intratekalnom sintezom IgG-a na MRZ imali su OCB tipa 2 ili 3.



## **5. RASPRAVA**

MS je „bolest s tisuću lica“ za koju još uvijek ne postoji jedinstveni test kojim se sa sigurnošću može postaviti dijagnoza. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike i uz pomoć parakliničkih testova, u prvome redu MR-a i likvorske dijagnostike, stoga je postavljanje dijagnoze pri atipičnoj kliničkoj prezentaciji posebno izazovno. Cilj ovoga istraživanja bio je prikazati imunološka i mikrobiološka obilježja u pacijenata s MS-om, istražiti kolika je njihova važnost pri postavljanju dijagnoze i utvrditi postoji li njihova povezanost s prvom kliničkom prezentacijom i promjenama u likvoru.

Osnovne demografske karakteristike u ovome istraživanju, kao što su spolna distribucija, dob pojave prvih simptoma i dob postavljanja dijagnoze, podudaraju se s onima opisanima u literaturi (4,63). Za 68% ispitanika u našem istraživanju dijagnoza je postavljena iste godine kada su se pojavili simptomi, dok se za njih 14,7% dijagnoza postavila sljedeće godine, a za preostale (17,4%) tek godinama nakon prvih simptoma. Aires i sur. naveli su 9 mjeseci kao medijan vremena od pojave prvih simptoma do dijagnoze (64), što je ranije nego u naših pacijenata. Danas je, s obzirom na brojne terapijske opcije i na sve brojnije podatke koji govore u prilog boljega ishoda kod ranijeg započinjanja terapije, rano postavljanje dijagnoze iznimno važno. Ponekad je pri prvoj manifestaciji bolesti nemoguće postaviti dijagnozu jer nisu zadovoljeni kriteriji diseminacije bolesti u prostoru ili vremenu, ali jedan dio „kasne dijagnoze“ zasigurno bi se mogao poboljšati boljom edukacijom naših pacijenata i naglašavanjem važnosti što ranijeg započinjanja liječenja. Većina prvih tegoba u naših pacijenata manifestira se tipičnim simptomima (88,7% ispitanika), a najčešći prvi simptomi bili su smetnje vida (31,5%) i osjetni ispadi (21,3%). Atipičnu prvu kliničku prezentaciju imalo je 11,2% ispitanika. Distribucija prvih simptoma u skladu je s rezultatima drugih istraživanja (27).

Rezultati analize osnovnih pretraga likvora (broj leukocita te koncentracija glukoze, laktata i proteina) bili su u skladu s ranije opisanima u literaturi (65). S druge strane, dobiveni udio tipova OCB-a tipičnih za MS (2 i 3) od 71,4% manji je nego u drugim istraživanjima koja pokazuju udio od gotovo 90% (42). Moguće objašnjenje za ovakvu distribuciju dali su Imrell i sur. koji su utvrdili da postoje geografske razlike u prisutnosti OCB-a u vidu povezanosti OCB-negativnoga MS-a (tip 1) s HLA-DRB1\*04 koji se smatra uobičajenom varijantom u mediteranskim zemljama, a koji je rijetkost u sjevernoj Europi. U svome istraživanju utvrdili su peterostruko veću učestalost OCB-negativnih slučajeva MS-a u Sardiniji u odnosu na sjevernu Europu (66).

Sukladno rezultatima istraživanja koje su proveli Lotan i sur. (67), i u našem istraživanju pronašli smo statistički značajnu povezanost broja leukocita u likvoru s tipom

OCB-a ( $P=0,005$ ). Naime, svi su ispitanici s tipom 1 ili 4 OCB-a imali uredan broj leukocita, dok je 38% ispitanika s pozitivnim OCB-om (tip 2 ili 3) imalo povišen broj leukocita u likvoru. Beseler i sur. opovrgnuli su, međutim, povezanost broja limfocita s brojem OCB-a u likvoru, što navodi na zaključak da limfociti B nisu jedini izvor intratekalne sinteze imunoglobulina (68) te može objasniti veći broj vrpca i u pacijenata s urednim brojem leukocita. Budući da proteini iz seruma prelaze u likvor difuzijom kroz oštećenu KMB (69), ne začuđuje činjenica da nismo pronašli povezanost koncentracije proteina u likvoru s tipom OCB-a ( $P=0,772$ ). Nismo utvrdili ni statistički značajnu povezanost pozitivnosti OCB-a u likvoru s tipičnom, odnosno atipičnom prvom kliničkom prezentacijom bolesti ( $P=0,166$ ), što se podudara s rezultatima Lua i sur. (70). Potrebno je naglasiti da je uzorak ispitanika s atipičnim prvim simptomima bio vrlo malen i da će tek buduće studije dati pravu sliku o ovoj temi.

Iz našega istraživanja vidljivo je da se koristi jako velik broj imunoloških testova na različita autoantitijela neovisno o tome radi li se o tipičnoj ili atipičnoj kliničkoj prezentaciji MS-a. Naime, broj napravljenih imunoloških pretraga nije se statistički značajno razlikovao između skupina s tipičnim i atipičnim prvim simptomima ( $P=0,224$ ), što nije u skladu s podacima iz literature gdje se navodi da bi se dodatna imunološka testiranja trebala provoditi samo u slučaju atipične kliničke slike koja bi mogla sugerirati neku drugu dijagnozu (44).

U usporedbi s ostalim autoantitijelima, najviši je bio udio pozitivnih ANA (29,8%) koja su vrlo nespecifična i mogu se javiti u zdravoj populaciji ili kao nespecifičan pokazatelj autoreaktivnosti (71). Nismo pronašli statistički značajnu povezanost ni općenite pozitivnosti na autoantitijela, ni pozitivnosti ANA, s prvom kliničkom prezentacijom, brojem leukocita i razinom proteina u likvoru niti s tipom OCB-a. Ovi se rezultati podudaraju sa studijom Negrotte i sur. koja opovrgava povezanost kliničkih i laboratorijskih nalaza te OCB-a u likvoru s pozitivitetom na serumska autoantitijela (44). Sve to upućuje na potrebu za racionalnijim korištenjem imunoloških pretraga u pacijenata s MS-om.

Što se tiče mikrobiološke analize, EBV je jedan od najistraživanijih okolišnih čimbenika rizika za MS (2). U našem istraživanju, svih 87 (100%) pacijenata ispitanih na EBV bilo je IgG seropozitivno, a isti udio dobili su i Abrahamyan i sur. (72). Druge studije također potvrđuju rijetkost seronegativnosti na EBV u osoba s MS-om i veći titar antitijela na EBV u odnosu na opću populaciju (73), iako ima i studija koje nisu utvrdile značajne razlike u seropozitivnosti oboljelih i kontrolnih skupina (74). Naime, seroprevalencija EBV-a u općoj populaciji iznosi više od 90% (13), stoga je potreban oprez pri interpretaciji rezultata. Udjeli seropozitivnosti ispitanika na IgG na ostale uzročnike odgovarali su udjelima u općoj

populaciji (75–79). Postoje brojna istraživanja o svim navedenim uzročnicima koja potvrđuju i negiraju razlike u seroprevalenciji u oboljelih od MS-a i kontrolnih skupina, što naglašava kompleksnost etiopatogeneze MS-a.

U naših 5,9% ispitanika pronađeno je antitijelo IgM na *B. burgdoferi*, a dobiveni udio u skladu je s rezultatima Ildiza i sur. (80). S obzirom na preklapanje kliničke slike (46), neuroboreliozu je u pacijenata s MS-om vrlo važno isključiti, posebno zbog mogućnosti izlječenja. Važnost dijagnostike neuroborelioze ističe se u područjima gdje se Lajmska bolest smatra endemskom, kojima pripada i Republika Hrvatska (81).

Intratekalna sinteza IgG-a na jedan ili više ispitivanih uzročnika potvrđena je u 36% ispitanika, a najčešće se pojavljivala na VZV (25% ispitanika), viruse rubele (22,9%), ospica (11,9%) i HSV (11,8%). S obzirom na rastuću važnost „MRZ reakcije“ u dijagnostici MS-a, izdvojili smo 60 ispitanika testiranih na intratekalnu sintezu IgG-a za virus ospica, rubele i VZV; u 27,2% ispitanika pronađena je reaktivnost na jedan, u 13,6% ispitanika na dva, a u 3,4% ispitanika na sva tri uzročnika. Ovi su postotci dosta manji u odnosu na druga istraživanja (43), što se možda može pripisati tehničkim razlikama u laboratorijskim testovima, no svakako su potrebna daljnja istraživanja specifičnosti pojedinih biomarkera u različitim skupinama ljudi.

U skladu s podacima u literaturi, nismo dobili statistički značajnu povezanost intratekalne sinteze antiviralnoga IgG-a s prvim simptomima, brojem leukocita i koncentracijom proteina u likvoru (81–83). S druge strane, pronašli smo statistički značajnu povezanost intratekalne sinteze antiviralnoga IgG-a s tipom OCB-a ( $P < 0,001$ ). Naime, tipovi 2 i 3 OCB-a rezultat su intratekalne sinteze IgG-a, stoga bi bilo očekivano da njihovu broju pridonose intratekalno sintetizirani antiviralni IgG (82,83). Zanimljivo je da u našoj studiji ni u jednoga ispitanika s OCB tipom 1 ili 4 nije detektirana intratekalna sinteza IgG-a ni na jedan mikroorganizam, što bi donekle bilo očekivano da ne postoje i studije koje pokazuju prisutnost intratekalne sinteze IgG-a na MRZ čak i u OCB-negativnih pacijenata s MS-om (84). Sve to još jednom naglašava kompleksnost etiopatogeneze i nepotpuno razumijevanje OCB-a, za što je potrebno uložiti daljnje napore u budućnosti.

Ograničenja ovoga istraživanja jesu retrospektivni oblik istraživanja, nedovoljno velik uzorak ispitanika i provedba istraživanja samo u jednome centru. Manjkavost je i u nedostatku kontrolne skupine, odnosno nedostatku podataka o pacijentima koji su se klinički i radiološki prezentirali kao MS, ali im je nakon likvorske, mikrobiološke i/ili imunološke obrade postavljena druga dijagnoza. Unatoč nedostacima, dobiveni su rezultati vrijedni i

mogu doprinijeti boljem zbrinjavanju pacijenata s MS-om. Također su otvorena i neka pitanja za daljnja istraživanja s ciljem što boljeg razumijevanja etiopatogeneze MS-a.

## **6. ZAKLJUČCI**

Iz rezultata ovoga istraživanja moguće je donijeti sljedeće zaključke:

1. Za sada ne postoji nalaz likvora karakterističan samo za MS. Broj leukocita može biti normalan ili blago povišen, a isto vrijedi i za razinu proteina, dok su koncentracije glukoze i laktata uglavnom uredne. Najčešće su oligoklonske vrpce tipa 2 ili 3, ali se mogu javiti i tipovi 1 i 4.
2. Tip oligoklonalnih vrpca nije povezan s inicijalnom kliničkom prezentacijom MS-a.
3. U obradi pacijenata s MS-om radi se velik broj imunoloških pretraga koje nemaju utjecaja na kliničku prezentaciju, promjene u likvoru ili konačnu dijagnozu.
4. U osoba s MS-om povećana je učestalost pozitivnih ANA antitijela u serumu.
5. Vrlo je rijetka seronegativnost na EBV IgG u bolesnika s MS-om.
6. U pacijenata s MS-om povećana je učestalost intratekalne sinteze IgG-a na viruse ospica, rubele i VZV.
7. Pozitivni nalazi mikrobioloških pretraga u likvoru ne utječu na nalaze ostale likvorske dijagnostike niti na inicijalnu kliničku prezentaciju MS-a.
8. Intratekalna sinteza antiviralnoga IgG-a povezana je s tipom oligoklonalnih vrpca.

## **7. LITERATURA**



1. Morell P, Quarles RH. The myelin sheath. U: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, urednici. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Šesto izdanje. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
2. Habek M, Brinar V. Demijelinizacijske bolesti središnjega živčanoga sustava. U: Brinar V, urednik. Neurologija za medicinare. Drugo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 323-54.
3. Höftberger R, Lassmann H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handb Clin Neurol.* 2018;145:263-83.
4. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol.* 2019;26:27-40.
5. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L i sur. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol.* 2006;13:700-22.
6. Bašić Kes V. Neuroimunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. 442 str.
7. Van der Mei I, Lucas RM, Taylor BV, Valery PC, Dwyer T, Kilpatrick TJ i sur. Population attributable fractions and joint effects of key risk factors for multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2016;22:461-9.
8. Nourbakhsh B, Mowry EM. Multiple sclerosis risk factors and pathogenesis. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2019;25:596.
9. Axisa PP, Hafler DA. Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. *Curr Opin Neurol.* 2016;29:345-53.
10. Baranzini SE, Oksenberg JR. The genetics of multiple sclerosis: from 0 to 200 in 50 years. *Trends Genet TIG.* 2017;33:960-70.
11. Ascherio A, Munger K. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention – an update. *Semin Neurol.* 2016;36:103-14.
12. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2017;13:25-36.
13. Tarlinton RE, Khaibullin T, Granatov E, Martynova E, Rizvanov A, Khaiboullina S. The interaction between viral and environmental risk factors in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* 14. 2019;20:303.
14. Bar-Or A, Pender MP, Khanna R, Steinman L, Hartung HP, Maniar T i sur. Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: theory and emerging immunotherapies. *Trends Mol Med.* 2020;26:296-310.
15. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Vitamin D and multiple sclerosis: an update. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;14:35-45.

16. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy. *Neuron*. 2018;97:742-68.
17. Correale J, Farez MF. Smoking worsens multiple sclerosis prognosis: two different pathways are involved. *J Neuroimmunol*. 2015;281:23-34.
18. Arneth B. Multiple sclerosis and smoking. *Am J Med*. 2020;133:783-8.
19. Schreiner TG, Genes TM. Obesity and multiple sclerosis – a multifaceted association. *J Clin Med*. 2021;10:2689.
20. Garg N, Smith TW. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav*. 2015;5:e00362.
21. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164:1079-106.
22. Lemus HN, Warrington AE, Rodriguez M. Multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2018;36:1-11.
23. Kantarci OH. Phases and phenotypes of multiple sclerosis: Contin Lifelong Learn Neurol. 2019;25:636-54.
24. Barboza AG, Carnero Contentti E, Curbelo MC, Halfon MJ, Rojas JI, Silva BA i sur. Radiologically isolated syndrome: from biological bases to practical management. *Neurol Sci*. 2021;42:1335-44.
25. Hosseiny M, Newsome SD, Yousem DM. Radiologically isolated syndrome: a review for neuroradiologists. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2020;41:1542-9.
26. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol*. 2012;11:157-69.
27. Katz Sand I. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2015;28:193-205.
28. Torkildsen Ø, Linker RA, Sesmero JM, Fantaccini S, la Rosa RS de, Seze J de i sur. Living with secondary progressive multiple sclerosis in Europe: perspectives of multiple stakeholders. *Neurodegener Dis Manag*. 2021;11:9-19.
29. Ontaneda D. Progressive multiple sclerosis: Contin Lifelong Learn Neurol. 2019;25:736-52.
30. Hoff JM, Dhayalan M, Midelfart A, Tharaldsen AR, Bø L. Visual dysfunction in multiple sclerosis. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2019. doi: 10.4045/tidsskr.18.0786.
31. Toosy AT, Mason DF, Miller DH. Optic neuritis. *Lancet Neurol*. 2014;13:83-99.

32. Habek M. Evaluation of brainstem involvement in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2013;13:299-311.
33. Korakas N, Tsolaki M. Cognitive Impairment in multiple sclerosis: a review of neuropsychological assessments. *Cogn Behav Neurol.* 2016;29:55-67.
34. Freiha J, Riachi N, Chalah MA, Zoghaib R, Ayache SS, Ahdab R. Paroxysmal symptoms in multiple sclerosis – a review of the literature. *J Clin Med.* 2020;9:3100.
35. Solomon AJ. Diagnosis, differential diagnosis, and misdiagnosis of multiple sclerosis. *Contin Minneap Minn.* 2019;25:611-35.
36. McNicholas N, Hutchinson M, McGuigan C, Chataway J. 2017 McDonald diagnostic criteria: a review of the evidence. *Mult Scler Relat Disord.* 2018;24:48-54.
37. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *The Lancet.* 2017;389:1336-46.
38. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Front Immunol.* 2019;10:726.
39. Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, Bellia C, Ciaccio M. Cerebrospinal fluid analysis in multiple sclerosis diagnosis: an update. *Medicina (Mex).* 2019;55:245.
40. Trbojevic-Cepe M. Detection of oligoclonal Ig bands: clinical significance and trends in methodological improvement. *EJIFCC.* 2004;15:86-94.
41. Wildner P, Stasiołek M, Matysiak M. Differential diagnosis of multiple sclerosis and other inflammatory CNS diseases. *MSARD.* 2019. doi: 10.1016/j.msard.2019.101452
42. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2015;161:51-8.
43. Hottenrott T, Dersch R, Berger B, Rauer S, Eckenweiler M, Huzly D i sur. 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.
44. Negrotto L, Tur C, Tintoré M, Arrambide G, Sastre-Garriga J, Río J i sur. Should we systematically test patients with clinically isolated syndrome for auto-antibodies? *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2015;21:1802-10.
45. Flanagan EP. Neuromyelitis optica spectrum disorder and other non–multiple sclerosis central nervous system inflammatory diseases: *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2019;25:815-44.
46. Sarbu N, Shih RY, Jones RV, Horkayne-Szakaly I, Oleaga L, Smirniotopoulos JG. White matter diseases with radiologic-pathologic correlation. *RadioGraphics.* 2016;36:1426-47.

47. Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2014;14:58.
48. Şen S. Neurostatus and EDSS calculation with cases. *Arch Neuropsychiatry.* 2018;55:80-3.
49. Gholamzad M, Ebtekar M, Ardestani MS, Azimi M, Mahmodi Z, Mousavi MJ i sur. A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflamm Res.* 2019;68:25-38.
50. Repovic P. Management of multiple sclerosis relapses: Contin Lifelong Learn *Neurol.* 2019;25:655-69.
51. Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care.* 2016;22:159-70.
52. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of multiple sclerosis: a review. *Am J Med.* 2020;133:1380-90.
53. Wingerchuk DM, Carter JL. Multiple Sclerosis: Current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. *Mayo Clin Proc.* 2014;89:225-40.
54. Comi G, Radaelli M, Soelberg Sørensen P. Evolving concepts in the treatment of relapsing multiple sclerosis. *The Lancet.* 2017;389:1347-56.
55. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- $\beta$  in relapsing multiple sclerosis: CNS drugs. 2011;25:491-502.
56. Jakimovski D, Kolb C, Ramanathan M, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B. Interferon  $\beta$  for multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8:a032003.
57. Ingwersen J, Aktas O, Hartung HP. Advances in and algorithms for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2016;13:47-57.
58. Clerico M, Artusi CA, Di Liberto A, Rolla S, Bardina V, Barbero P i sur. Natalizumab in multiple sclerosis: long-term management. *Int J Mol Sci.* 2017;18:940.
59. Bigaut K, De Seze J, Collongues N. Ocrelizumab for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2019;19:97-108.
60. Mulero P, Midaglia L, Montalban X. Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Ther Adv Neurol Disord.* 2018;11:1756286418773025.
61. Tobin WO. Management of multiple sclerosis symptoms and comorbidities. *Contin Minneap Minn.* 2019;25:753-72.

62. Rønning OM, Tornes KD. Need for symptomatic management in advanced multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2017;135:529-32.
63. Yamout B, Alroughani R. Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2018;38:212-5.
64. Aires A, Barros A, Machado C, Fitas D, Cação G, Pedrosa R i sur. Diagnostic delay of multiple sclerosis in a portuguese population. *Acta Med Port.* 2019;32:289-94.
65. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G i sur. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol.* 2005;62:865-70.
66. Imrell K, Landtblom AM, Hillert J, Masterman T. Multiple sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology.* 2006;67:1062-4.
67. Lotan I, Benninger F, Mendel R, Hellmann MA, Steiner I. Does CSF pleocytosis have a predictive value for disease course in MS? *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2019;6:e584.
68. Beseler C, Vollmer T, Graner M, Yu X. The complex relationship between oligoclonal bands, lymphocytes in the cerebrospinal fluid, and immunoglobulin G antibodies in multiple sclerosis: indication of serum contribution. *PLOS ONE.* 2017;12:e0186842.
69. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci.* 2001;184:101-22.
70. Lu T, Zhao L, Sun X, Au C, Huang Y, Yang Y i sur. Comparison of multiple sclerosis patients with and without oligoclonal IgG bands in South China. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas.* 2019;66:51-5.
71. Sur LM, Floca E, Sur DG, Colceriu MC, Samasca G, Sur G. Antinuclear antibodies: marker of diagnosis and evolution in autoimmune diseases. *Lab Med.* 2018;5;49:e62-e73.
72. Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi MM, Aly L, Luessi F, Groppa S i sur. Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020;91:681-6.
73. Ascherio A, Munger K, Lennette E, Spiegelman D, Hernán M, Olek M i sur. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA J Am Med Assoc.* 2002;286:3083-8.
74. Kofahi RM, Kofahi HM, Sabaheen S, Qawasmeh MA, Momani A, Yassin A i sur. Prevalence of seropositivity of selected herpesviruses in patients with multiple sclerosis in the north of Jordan. *BMC Neurol.* 2020;20:397.

75. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* 2010;20:202-13.
76. Malkin JE, Morand P, Malvy D, Ly TD, Chanzy B, Labareyre C de i sur. Seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 infection in the general French population. *Sex Transm Infect.* 2002;78:201-3.
77. Kalmár Z, Briciu V, Coroian M, Flonta M, Rădulescu AL, Topan A i sur. Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato in healthy blood donors in Romania: an update. *Parasit Vectors.* 2021;14:596.
78. Tuuminen T, Varjo S, Ingman H, Weber T, Oksi J, Viljanen M. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* immunoglobulin G and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by Quantitative Enzyme Immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7:734-8.
79. Bonnan M. Intrathecal immunoglobulin synthesis in MS – a complete reappraisal. U: Gonzalez-Quevedo A, urednik. *Trending topics in multiple sclerosis* [Internet]. London: IntechOpen; 2016 [citirano 07. srpnja 2022.]. doi: 10.5772/63201. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/50603>
80. Ildız N, Özerol İH, Özcan AC, Çelik H. Investigation of *Borrelia burgdorferi* antibodies in patients with multiple sclerosis. *Asian J Med Sci.* 2020;11:21-4.
81. Mulic R, Petkovic B, Klismanic Z, Jeroncic I. Tick-borne diseases in the Republic of Croatia. *Lijec Vjesn.* 2011;133:89-95.
82. Salmi A, Reunanen M, Ilonen J, Panelius M. Intrathecal antibody synthesis to virus antigens in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1983;52:241-9.
83. Feki S, Gargouri S, Mejdoub S, Dammak M, Hachicha H, Hadiji O i sur. The intrathecal polyspecific antiviral immune response (MRZ reaction): a potential cerebrospinal fluid marker for multiple sclerosis diagnosis. *J Neuroimmunol.* 2018;321:66-71.
84. Robinson T, Abdelhak A, Bose T, Meinel E, Otto M, Zettl UK i sur. Cerebrospinal fluid biomarkers in relation to MRZ reaction status in primary progressive multiple sclerosis. *Cells.* 2020;9:2543.

## **8. SAŽETAK**

**Ciljevi:** Cilj je istraživanja prikazati imunološka i mikrobiološka obilježja MS-a na temelju nalaza likvorske dijagnostike te serološke i mikrobiološke obrade ispitanika.

**Ispitanici i postupci:** Provedeno je retrospektivno kohortno istraživanje na 100 ljudi oboljelih od MS-a s nalazima likvorske, imunološke i mikrobiološke obrade. Podatci iz 2020. i 2021. godine prikupljeni u dnevnoj bolnici Klinike za neurologiju KBC-a Split uključivali su podatke o spolu, godini rođenja, prvome simptomu, godini njegove pojave i godini postavljanja dijagnoze te nalaze likvorske, imunološke i mikrobiološke obrade. Rezultati su prikazani uz pomoć apsolutnih i relativnih brojeva, a statistička povezanost interpretirana je na razini značajnosti od  $P < 0,05$ .

**Rezultati:** U istraživanju je sudjelovalo 76% žena i 24% muškaraca. Medijan dobi ispitanika pri pojavi prvih simptoma iznosio je 34,5, a pri postavljanju dijagnoze 35 godina. U 82,7% ispitanika dijagnoza je postavljena unutar prve 2 godine od pojave simptoma. Najčešći su bili ispadi vida i osjeta, a atipične prve simptome imalo je 11,2% ispitanika. Povećan broj leukocita u likvoru imalo je 26%, a povećanu koncentraciju proteina 48% ispitanika. Koncentracije glukoze i laktata većinom su bile unutar referentnih vrijednosti. Pozitivne OCB u likvoru imalo je 71,4% ispitanika, a statistički su značajno povezane s brojem leukocita u likvoru. Medijan broja serološki testiranih autoantitijela po ispitaniku iznosio je 21, a povećan je samo udio pozitivnih ANA (29,8%). Autoantitijela nisu povezana s prvim simptomom niti s nalazima likvora. Svi su ispitanici seropozitivni na IgG na EBV, a intratekalna sinteza IgG-a na EBV prisutna je samo u 4,6% ispitanika. Virus s najčešćom intratekalnom sintezom IgG-a jesu VZV (25%), virus rubele (22,9%), ospica (11,9%) i HSV (11,8%). Intratekalna sinteza antiviralnoga IgG-a nije povezana s prvim simptomima niti s nalazima likvora, no povezana je s tipom OCB-a ( $P < 0,001$ ).

**Zaključci:** MS karakteriziraju normalne ili blago povišene vrijednosti leukocita i proteina te uredne vrijednosti glukoze i laktata u likvoru. OCB prisutne su u likvoru većine bolesnika, no nisu povezane s prvim simptomima. U obradi pacijenata s MS-om radi se velik broj imunoloških pretraga koje nemaju utjecaja na promjene u likvoru niti na kliničku prezentaciju. ANA su češće povišena u MS-u, no serumska autoantitijela nisu povezana s inicijalnom prezentacijom i nalazima likvora. Stopostotna seropozitivnost na EBV IgG upućuje na njegovu moguću patogenetsku ulogu. Intratekalna sinteza IgG-a najčešća je na VZV, rubele, ospice i HSV i povezana je s tipom OCB-a.



## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Immunological and Microbiological Characteristics of Multiple Sclerosis Patients in University Hospital of Split

**Objectives:** The aim of this research was to show the immunological and microbiological characteristics of MS based on cerebrospinal fluid (CSF), serological and microbiological findings. The main goal was to point out the contribution of immunological and microbiological analysis to the diagnosis of MS.

**Subjects and methods:** A retrospective cohort study was conducted on 100 MS patients who underwent CSF, immunological and microbiological processing. Data from 2020 and 2021 collected in the daily clinic of the Department of Neurology at University Hospital of Split included gender, year of birth, first symptom, year of onset and year of diagnosis, as well as CSF, immunological and microbiological findings. The results are presented with the help of absolute and relative numbers, and the statistical association is interpreted at the significance level of  $P < 0.05$ .

**Results:** In this research, there was 76% of women and 24% of men. The median age of patients when the first symptoms appeared was 34.5 years, and 35 years when the diagnosis was made. In 82.7% of subjects, the diagnosis was made within the first 2 years from symptoms onset. The most common were visual and sensory disturbances, while 11.2% of respondents had atypical first symptoms. In 26% of participants leukocyte count in CSF was increased, while 48% of participants had increased protein levels. Glucose and lactate levels were mostly within reference values. Positive oligoclonal bands (OCBs) were detected in 71.4% of patients. The OCBs were significantly related to the number of leukocytes in the CSF. The median number of serologically tested autoantibodies per subject was 21, with only ANA showing an increased proportion of positive results (29.8%). Autoantibodies were not associated with clinical onset or CSF findings. All subjects were EBV IgG seropositive, but intrathecal synthesis of EBV IgG was present only in 4.6% of them. The viruses against which intrathecal IgG synthesis was most common were VZV (25%), rubella (22.9%), measles (11.9%) and HSV (11.8%). Intrathecal synthesis of antiviral IgG was not associated with first symptoms or with CSF findings, but was associated with the OCB type ( $P < 0.001$ ).

**Conclusions:** MS is characterized by normal or slightly elevated values of leukocytes and proteins and normal values of glucose and lactate in the CSF. OCBs are present in the CSF of most patients, but are not related to the first clinical presentation. In the processing of patients

with MS, a large number of immunological tests are performed, which have no effect on the changes in the CSF or on the clinical presentation. The frequency of positive ANA is increased in MS, but with no clear association with initial symptoms and CSF findings. A 100% seropositivity for EBV IgG points to its possible role in the pathogenesis of MS. Intrathecal IgG synthesis is most common against VZV, rubella, measles and HSV viruses, and it is significantly related to the OCB type.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **Osobni podatci**

Ime i prezime: Ana Čikara

Datum rođenja: 18. lipnja 1997.

Mjesto rođenja: Sinj, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

## **Obrazovanje**

2004.–2012. Osnovna škola Marka Marulića u Sinju

2006.–2012. Glazbena škola Jakova Gotovca u Sinju, smjer violina

2012.–2016. Gimnazija Dinka Šimunovića u Sinju s općim programom

2016.–2022. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program medicina

## **Znanja i vještine**

Prvo mjesto na državnoj maturi iz hrvatskoga jezika (viša razina) u generaciji 2015./2016.

Strani jezici: engleski jezik (razina B2)

Ostale vještine: violina, glasovir

## **Aktivnosti**

Članica Pjevačkoga zbora Župe Gospe Sinjske

Članica orkestra „The Rajner's Orchestra“ Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Splitu