

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**NEUROFILAMENTŲ LENGVŪJŲ GRANDINIŲ NUSTATYMAS SMEGENŲ
SKYSTYJE IR TAIKYMAS IŠSĖTINĖS SKLEROZĖS LABORATORINĖJE
DIAGNOSTIKOJE**

Magistrantė MAŽENA GILIUN

(parašas)

Darbo vadovas

doc. dr. Loreta Bagdonaitė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

doc. dr. Dovilė Karčiauskaite

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data

Registracijos Nr.

2019 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS.....	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Išsėtinės sklerozės epidemiologija	6
1.2. Išsėtinės sklerozės priežastys, klinikinis pasireiškimas, rizikos veiksniai.....	7
1.3. Eksperimentinis autoimuninis encefalomyelitas.....	8
1.4. Heterogeninė išsėtinės sklerozės prigimtis, patogenezė	8
1.4.1. Uždegimas ir neurodegeneracija.....	9
1.4.2. Oksidacinio streso poveikis, geležies kaupimasis	12
1.5. Išsėtinės sklerozės diagnostika.....	13
1.5.1. Smegenų skysčio punkto laboratorinis tyrimas	14
1.5.2. Biologiniai žymenys	14
1.5.3. Neurofilamentai	16
2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS	18
2.1. Tiriamoji medžiaga	18
2.2. Tiriamųjų imtis ir charakteristika.....	18
2.3. Tyrimo metodas	20
2.3.1. Tyrimui reikalingos priemonės.....	20
2.3.2. Darbinių tirpalų ruošimas	21
2.3.3. Imunofermentinės analizės eiga.....	22
2.3.4. Rezultatų vertinimas	23
2.3.5. Tyrimo charakteristikos	23
2.4. Statistinė duomenų analizė.....	23
3. TYRIMO REZULTATAI.....	24
3.1. Smegenų skysčio biocheminių rodiklių pokyčiai, jų ryšys su NF-L koncentracija.....	24
3.2. Biocheminių žymenų ryšys su tiriamųjų fiziologiniais rodikliais.....	27
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	28
IŠVADOS	32
SANTRAUKA.....	33
SUMMARY.....	34
LITERATŪROS ŠALTINIAI	36

SANTRUMPOS

- APIS – antrinė progresuojanti išsėtinė sklerozė
- APL – antigeną pateikianti ląstelė
- ATF – adenzintrifosfatas
- CD (angl. *Cluster of differentiation*) - diferenciacijos antigenas
- CNS – centrinė nervų sistema
- DNR - deoksiribonukleorūgštis
- EAE – eksperimentinis autoimuninis encefalomyelitas
- Fe - geležis
- IFN – interferonas
- IgG – imunoglobulinas G
- IL - interleukinas
- IS – išsėtinė sklerozė
- JCV - *John Cunningham* virusas
- KIS – kliniškai izoliuotas sindromas
- MHC (angl. *Major histocompatibility complex*) – didysis audinių suderinamumo kompleksas
- MOG - mielino oligodendrocitų glikoproteinas
- MRT – magnetinio rezonanso tomografija
- NF – neurofilamentai
- PLB – proteolipidinis baltymas
- PMB - pagrindinis mielino baltymas
- PPIS – pirminė progresuojanti išsėtinė sklerozė
- RIS – radiologiškai izoliuotas sindromas
- RRIS – recidyvuojanti remituojanti išsėtinė sklerozė
- SS – smegenų skystis
- Th – T ląstelė pagalbininkė
- TNF – naviko nekrozės veiksnys
- VZV – *Varicella zoster* virusas

ĮVADAS

Išsėtinė sklerozė (IS) yra lėtinė neurodegeneracinė liga, kliniškai pasireiškianti paūmėjimais bei negalios progresavimu. Sudėtingi uždegiminiai, demielinizuojantys, degeneraciniai procesai žalojančiai veikia centrinę nervų sistemą (CNS), pakitimai vystosi ir baltojoje, ir pilkojoje CNS medžiagoje. Pasaulyje yra apie 2,3 milijono sergančiųjų IS, Lietuvoje užregistruota apie 3500 atvejų. Moterys serga dvigubai dažniau negu vyrai, įprastai liga pasireiškia jauniems darbingo amžiaus asmenims.

IS pripažinta autoimunine liga, tačiau iki šiol nėra aišku, ar aksonų sunykimas ir/ar netekimas yra CNS vykstančio uždegimo pasekmė, ar vis dėlto autoimuniniai mechanizmai yra antriniai, inicijuoti neurodegeneracijos. Bet kokiu atveju, kraujo – CNS barjero vientisumo praradimas, židininis uždegimas, mielino irimas ir oligodendrocitų netekimas, reaktyvūs glijos ląstelių pokyčiai bei aksonų sunykimas yra pagrindiniai IS būdingi patologiniai procesai. Liga diagnozuojama remiantis surinkta anamneze bei atliktų instrumentinių ir laboratorinių tyrimų visuma. Visgi, IS kol kas dar neturi vienintelio specifinio laboratorinio žymens, kuris leistų nuspėti ligos progresavimą, stebėti ligos aktyvumą bei vertinti gydymo efektyvumą. Šiuo metu pagrindiniai IS laboratorinėje diagnostikoje naudojami biologiniai žymenys yra IgG oligokloninės juostos bei IgG indeksas, tačiau šie rodikliai gali būti pakitę ir kitų uždegiminių CNS būklių ar/ir lėtinių neuroinfekcijų atvejais.

Aksonų netekimas yra pagrindinė su laiku išsivystančios negalios priežastis, todėl itin svarbu atrasti tinkamus biožymenis, kurie įgalintų pastebėti pirmuosius neurodegeneracijos požymius bei sekti ligos progresavimą. Neurofilamentai (NF) yra sudėtingi baltymai, formuojantys neuronų citoskeletą. NF aksonams suteikia struktūrinį pamatą bei reguliuoja jų skersmenį. Vykstant aksonų pažeidimui, dideli kiekiai NF patenka į smegenų skystį (SS), taip pat jie gali būti nustatomi ir kraujyje. Pastaraisiais metais ypač daug dėmesio skiriama struktūrinio NF subvieneto – lengvųjų grandinių – tyrimams. Įvairūs tyrėjai yra nustatę ryšį su ligos paūmėjimais, negalios laipsniu, sąsajas su uždegimu bei nervinio audinio pažeidimais. Lietuvoje NF nustatymas nėra atliekamas, taip pat iki šiol nebuvo vykdyti moksliniai tyrimai ta tema. Šiame mokslo tiriamajame darbe pasirinkome plėtoti papildomo laboratorinio žymens paiešką, nagrinėjant NF-L ryšį su įprastiniais IS diagnostikoje laboratoriniais žymenimis ir fiziologiniais veiksniais (tokiais kaip lytis ir amžius) bei šio rodiklio reikšmę aptinkant ankstyvą demielinizacijos procesą.

DARBO TIKSLAS:

Nustatyti neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentraciją išsėtine skleroze sergančių ligonių smegenų skystyje, įvertinat pritaikymą ankstyvo demielinizacijos proceso diagnostikoje.

DARBO UŽDAVINIAI:

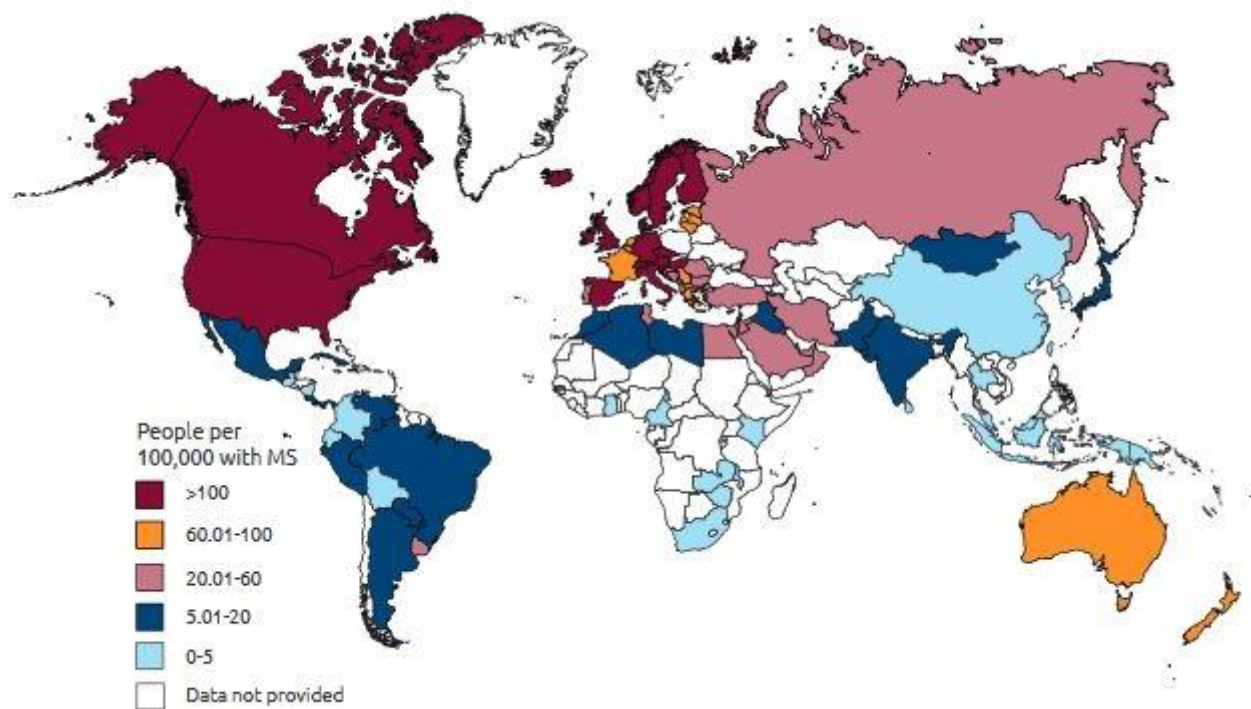
1. Nustatyti neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentraciją sergančiųjų išsėtine skleroze smegenų skystyje, vertinant ankstyvą demielinizacijos procesą.
2. Apibūdinti neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentracijos smegenų skystyje ir išsėtinės sklerozės įprastinių laboratorinių rodiklių pokyčius, įvertinant tirtų žymenų ryšį.
3. Įvertinti neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentracijos smegenų skystyje ryšį su tiriamųjų fiziologiniais veiksniais (lytis, amžius).

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Išsėtinės sklerozės epidemiologija

Išsėtinė sklerozė – lėtinė neurodegeneracinė liga, viena dažniausių darbingo amžiaus žmonių netrauminės negalios priežasčių. Sudėtingi uždegiminiai, demielinizuojantys procesai nulemia aksonų sunykimą bei neuronų žūtį, todėl sergant IS būdinga greitesnė smegenų atrofija, prasidedanti jau ankstyvoje ligos stadijoje. IS kliniškai pasireiškia paūmėjimais bei negalios progresavimu [1, 2]. Pirmą kartą šią ligą 1868 metais aprašė prancūzų mokslininkas Jean-Martin Charcot, iki 1921 metų IS vadinta Charcot liga [3].

Tarptautinės IS federacijos duomenimis, 2013 m. pasaulyje buvo apie 2,3 milijono sergančiųjų IS, ši liga labiausiai paplitusi Šiaurės Amerikoje ir Europoje (>100 atvejų/100 000 gyventojų) (1 pav.) [4]. Lietuvoje užregistruota apie 3500 sergančiųjų, kiekvienais metais nustatoma iki 200 naujų ligos atvejų [5].



1 pav. Išsėtinės sklerozės paplitimas pasaulyje 2013 m. [4]

Per pastarąjį dešimtmetį žmonių, sergančių IS, skaičius padidėjo beveik 10 proc., bet tikėtina, jog labiausiai tam įtakos turėjo didesnis išgyvenamumas, geresnė diagnostika bei dažnesnis pranešimas apie nustatytą ligą. Nepaisant progreso, netolygumai tarp ekonomiškai stiprių ir besivystančių šalių išlieka aktualūs ir dabar, vertinant sveikatos priežiūros specialistų skaičių (specializuotų neurologų ir slaugytojų), ligos eigą modifikuojančio gydymo kompensavimo ypatumus bei reabilitacijos prieinamumą sergantiesiems [4].

Paprastai liga pasireiškia darbingo amžiaus asmenims (dažniausiai 20-30 metų), visgi, nedidelei daliai pacientų IS diagnozuojama iki 18 metų. Moterys sudaro 2/3 sergančiųjų [1, 4]. Tikėtina, kad prie to prisideda vėlyvas nėštumas, oralinių kontraceptikų vartojimas, rūkymas, mažesnis fizinis aktyvumas, nutukimas bei stresas [6]. Nors vyrai IS serga rečiau, jiems būdinga sunkesnė ligos eiga, be to, pirmą kartą diagnozė nustatoma vyresniame amžiuje [7].

1.2. Išsėtinės sklerozės priežastys, klinikinis pasireiškimas, rizikos veiksniai

Centrinės nervų sistemos pažeidimus sukelia sudėtingi uždegiminiai, demielinizuojantys, degeneraciniai procesai, pakitimai vystosi ir baltojoje, ir pilkojoje CNS medžiagoje. Manoma, kad pirminis taikiny yra mielino dangalai ir/arba oligodendrocitai [2, 8, 9].

Neurologiniai simptomai priklauso nuo židinių lokalizacijos. Pastarieji dažniausiai išsidėsto baltojoje medžiagoje aplink smegenų skilvelius, regos nervą, didžiąją smegenų jungtį, smegenėles, stuburą, pailgąsias smegenis arba požievio pilkojoje medžiagoje [10]. Minėtieji patologiniai procesai nulemia klinikinius požymius, tokius kaip nuovargis, bendras silpnumas, sutrikusi rega, neįprasti jutimai (deginimo jausmas, tirpimas, dilgčiojimas). Su laiku paveikiamas gebėjimas vaikščioti, atsiranda nerangumas, sustingimas [1]. Ryškėja pažintiniai sutrikimai (ypač pažengus ligai): suprastėja atmintis, sunku susikaupti, spręsti problemas, sulėtėja mąstymas. Apie 60 proc. pacientų suseraga depresija [11]. Be viso to, sergančius IS vargina skausmai, ypač galvos ir apatinės nugaros dalies. Dažniau skausmais skundžiasi rūkantys, nutukę arba fiziškai neaktyvūs pacientai, o vidutinis ir didelis fizinis aktyvumas, sveika mityba bei saikingas alkoholio vartojimas įvardijami kaip apsauginiai veiksniai [12]. Pasirodžius pirmiesiems neurologiniams simptomams, dalis aksonų jau būna pažeisti ir (arba) žuvę, todėl svarbu kuo anksčiau nustatyti ligą ir pradėti gydymą [13].

Atsižvelgiant į ligos aktyvumą (kuris yra vertinamas pagal paūmėjimų dažnį arba/ir pažeidimo židinių atsiradimą CNS) bei negalios progresavimą, yra skiriamos 4 pagrindinės klinikinės būklės: kliniškai izoliuotas sindromas (KIS), recidyvuojanti remituojanti IS (RRIS), antrinė progresuojanti IS (APIS) bei pirminė progresuojanti IS (PPIS). RRIS būdingi periodiškai atsirandantys ūmūs neurologiniai simptomai, paprastai išsivystantys per kelias dienas, vėliau būklė stabilizuojasi (prasideda plato fazė) ir atsistato (remisija). Remisijos metu veikia centrinės nervų sistemos gijimo mechanizmai, naudojamas neurologinis rezervas. Remisija (būklės atsistatymas) trunka vieną mėnesį ir ilgiau. Visiškas pasveikimas negalimas, tad bet koks paūmėjimas prisideda prie negalios progresavimo. Su laiku negalia nesustabdomai progresuoja, ypač kai išsekę neurologinis rezervas ir gijimo mechanizmai daugiau nepajėgia kompensuoti žalos. 65-85 proc. RRIS atvejų per keletą ar keliolika metų nuo susirgimo pradžios pereina į APIS. Maždaug 10-15 proc. sergančiųjų asmenų iš karto pasireiškia progresuojanti ligos eiga, t.y.

sunkėja be recidyvų - PPIS. KIS į IS klasifikaciją įtrauktas nuo 2013 metų. Šiuo atveju pirmas paūmėjimas pasireiškia žmogui, turinčiam radiologiškai izoliuotą sindromą (RIS). RIS į klasifikaciją yra neįtrauktas dėl klinikinių požymių stokos – tai yra būklė, kuomet smegenyse yra židinių, tačiau klinikiniai simptomai dar neprasireiškę. Paprastai RIS nustatomas atsitiktinai, tiriantis dėl kitų priežasčių [1, 14, 15].

Tikslios ligos priežastys nėra žinomos, bet spėjama, kad neskaitant sudėtingų imuninių mechanizmų, ligos vystymąsi gali paskatinti ir tokie veiksniai, kaip organizmo mikroflora, virusinės infekcijos, aplinkos toksinai, rūkymas, stresas, vitamino D stoka. Tai ne genetinė liga, bet yra aptiktos ir toliau tiriamos sąsajos su žmogaus leukocitų antigenus koduojančiais genais, ypač *HLA-DRB1* [6, 11, 16].

1.3. Eksperimentinis autoimuninis encefalomyelitas

Tiriant IS imunopatogenezinius mechanizmus neretai yra remiamasi eksperimentiniais autoimuninio encefalomyelito (EAE) gyvūnų modeliais. Liga yra sukeliama sensibilizuojant laboratorinio gyvūno organizmą mieliniams CNS antigenais, tokiais kaip pagrindinis mielino baltymas (PMB), mielino oligodendrocitų glikoproteinas (MOG), proteolipidinis baltymas (PLB) [8, 10]. Po imunizacijos, antigeną pristatančios ląstelės (APL) pateikia nedidelius peptidus iš apdorotų antigenų naiviesiems T limfocitams, kurie, atpažinę antigeną, gali tapti efektorinėmis ląstelėmis. Gebėjimu pristatyti antigenus pasižymi dendritinės ląstelės, makrofagai, monocitai bei mikroglijos ląstelės [17]. EAE turi nemažai panašumų su IS klinikiniu ir patologiniu atžvilgiu [18]. Toks tyrimo modelis padėjo geriau suprasti IS atveju besivystančius imuninius mechanizmus, uždegiminius procesus, taip pat buvo naudingas kuriant priešuždegiminius ir ligos eigą modifikuojančius vaistus. Tačiau neišvengta ir nesėkmių – tam tikri vaistiniai preparatai, vertinti kaip daug žadantys EAE atveju, turėjo priešingą poveikį atliekant tyrimus su žmonėmis. Pavyzdžiui, interferonas gama (IFN- γ) arba naviko nekrozės veiksnys alfa (TNF- α) turėjo apsauginį poveikį vykdant EAE modeliu paremtus tyrimus, tačiau tiriamųjų, sergančių IS, būklę pablogino [18, 19].

1.4. Heterogeninė išsėtinės sklerozės prigimtis, patogenezė

Svarbiausi patologiniai procesai, būdingi IS, yra kraujo – CNS barjero vientisumo praradimas, židininis uždegimas, mielino irimas ir oligodendrocitų netekimas, reaktyvūs glijos ląstelių pokyčiai bei aksonų sunykimai [20]. Vis dėl to, iki šiol nėra vieningos nuomonės, kokia yra tikroji IS prigimtis. Ilgą laiką buvo manoma, kad tai – autoimuninė liga, išsivystanti dėl antikūnų, autoreaktyvių T limfocitų bei makrofagų infiltracijos CNS. Šią teoriją labai paremia EAE tyrimai [8, 10, 18, 21]. Vis dėl to, kad liga būtų klasifikuojama kaip autoimuninė, vienas iš

kriterijų – galimybė visiems pacientams nustatyti autoantigeną bei prieš jį nukreiptą imuninį atsaką [13]. Literatūroje aprašomi keli potencialūs autoantigenai, pavyzdžiui, MOG, PMB, PLB. Iš jų labiausiai tirtas mielino ir oligodendrocitų paviršiuje esantis mielino pagrindinis baltymas [13, 21, 22]. Imunizuojant laboratorinius gyvūnus MOG, pavyko atkartoti patologinius procesus, būdingus IS. Tačiau anti-MOG antikūnai nustatyti tik nedidelei daliai IS pacientų, o asmenims su KIS – išvis neaptikti [23-25]. Kol kas publikuota nedaug tyrimų, kur bandoma nustatyti ir kiekybiškai įvertinti antikūnus, nukreiptus prieš mielino ir nemielininius antigenus, o ir rezultatai nevienodi. Vis dar trūksta įrodymų, pagrindžiančių vien tik autoimuninę IS kilmę, be to, IS – labai įvairialypė liga patologiinių – histologinių radinių, ligos eigos bei atsako į gydymą atžvilgiu. Tad veikiausiai tai yra liga, išsivystanti tarpininkaujant imuninei sistemai, tačiau be vieno specifinio antigeno, kuris skatintų uždegimą [13, 22].

Atvirkštinės hipotezės šalininkai teigia, kad pirmiau prasideda neurodegeneraciniai procesai, o autoimuniniai mechanizmai yra antriniai. Plačiai aprašytas atvejis, kai jauna pacientė, sirgusi RRIS, prasidėjus recidyvui staiga mirė. Autopsijos metu buvo paimta nervinio audinio ištyrimui. Ankstyvuosiuose uždegiminiuose židiniuose rasta nedaug limfocitų, tačiau stebėta masyvi oligodendrocitų apoptozė, aktyvuota mikroglia. Todėl peršasi išvada, kad oligodendrocitų žūtis gali būti pagrindinis veiksnys, iššaukiantis imuninį atsaką [10, 26]. Svarbu paminėti ir tai, kad priešuždegiminiai vaistai, kuriuos vartoja RRIS pacientai, neturi jokio poveikio sergant PPIS. Ši žinia laikoma įrodymu, kad progresuojanti ligos eiga yra veikiausiai neurodegeneracinė būklė nei uždegiminė [26, 27].

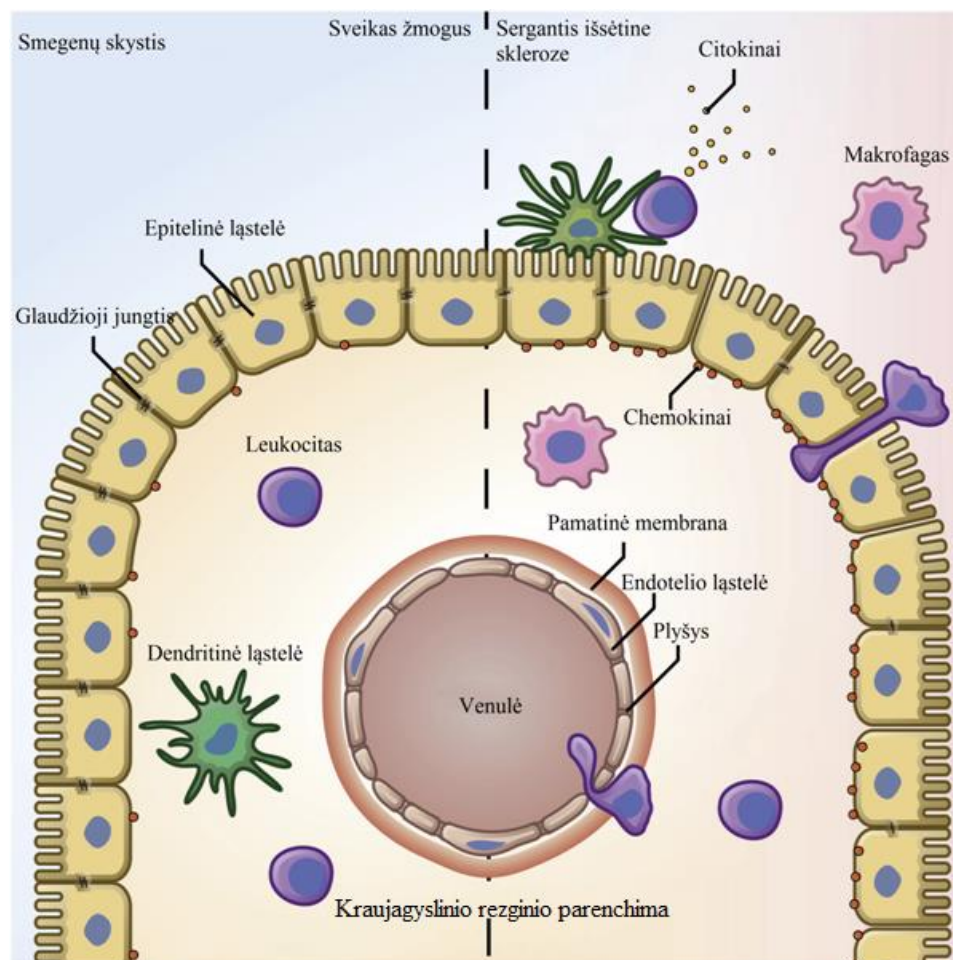
1.4.1. Uždegimas ir neurodegeneracija

Ankstyvoje ligos stadijoje, kai pasireiškia paūmėjimai ir remisijos, baltojoje medžiagoje formuojasi uždegiminiai židiniai. Tai - demielinizacijos proceso klinikinė išraiška. Aktyviuose židiniuose būdinga T limfocitų, B limfocitų ir monocitų/makrofagų infiltracija, mielino bei aksonų pažeidimo požymiai, astrocitų ir mikroglijos reaktyvūs pakitimai [8]. Ligai progresuojant, židininiai pažeidimai atsiranda ir smegenų žievės pilkojoje medžiagoje, taip pat galimas difuzinis smegenų audinio pažeidimas [8, 18].

IS atveju nervinio audinio patologija dalinai siejama su suaktyvėjusia mikroglia bei monocitų/makrofagų infiltracija [18, 20, 28, 29]. Makrofagai įprastai būna išsidėstę už kraujagyslių endotelio esančios pamatinės membranos, kad galėtų apsaugoti CNS nuo patogenų patekimo. Makrofagams būdinga stipresnė CD45 ir MHC II klasės molekulių raiška ir tai yra pagrindinis jų skirtumas nuo mikroglijos ląstelių. Mikroglijos aktyvacija įvyksta atpažinus pavojaus signalą. Vienas iš jų galėtų būti mielino suirimas. Aktyvuotos mikroglijos ląstelės kartu su monocitais/makrofagais fagocituoja apirusio mielino liekanas, tuo pačiu išskiria uždegiminius

citokinus (IL-1, IL-6, TNF- α), produkuoja reaktyvius deguonies ir azoto radikalus. Neskaitant fagocitinių savybių, mikroglija gali atlikti ir APL funkciją. Joms būdinga labai silpna MHC molekulių raiška. Tačiau vykstant uždegimui, sutrinka mikroglijos ir/ar makrofagų MHC molekulių raiška, dėl šių ląstelių išskiriamų citokinių skatinamas imuninių ląstelių susitelkimas CNS [28, 29]. Nepaisant to, kad mielino fagocitozė potencialiai iššaukia uždegimą, šis procesas yra būtinas oligodendrocitų pirmtakų brendimui ir diferenciacijai, mielino dangalo atsinaujinimui [30].

Lėtinis uždegimas yra vienas svarbiausių patologinių procesų IS mechanizme. Uždegimas prasideda smulkiose venose ir venulėse, židiniai pirmiau formuojasi srityse, kuriose gausu šių kraujagyslių. Smegenų skilveliuose yra išsidėstęs kraujagyslinis (choroidinis) rezginys – tankų kraujagyslių tinklą turinti struktūra. Čia yra gaminamas smegenų skystis. Kraujagyslinį rezginį supantis epitelinis sluoksnis formuoja standų kraujo – smegenų skysčio barjerą. Tam, kad patektų į SS, imuninės ląstelės turi pereiti pro kraujagyslinio rezginio epitelines ląsteles. Jos tarpusavyje sujungtos glaudžiomis jungtimis, tad kraujagyslinio rezginio vientisumas yra svarbus veiksnys, lemiantis leukocitų patekimą į SS (2 pav.). Be to, leukocitų migraciją reguliuoja epitelinių ląstelių išskiriami citokinai ir adhezijos molekulės [10, 31].



2 pav. Imuninių ląstelių judėjimas iš kraujo į smegenų skystį [10]

Ląstelių perėjimas iš kraujo vyksta sąveikaujant kraujagyslių endotelio paviršiuje esančioms adhezijos molekulėms kartu su limfocitų integriniais (pavyzdžiui, vykstant kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių (VCAM) sąveikai su α -4 integrinu (VLA-4) arba tarpląstelinės adhezijos molekulių (ICAM) - su limfocitų funkcija asocijuotu antigenu – 1 (LFA-1)). Sveikame organizme leukocitai nesunkiai praeina kraujagysles ir pasiekia kraujagyslinio rezginio parenchimą, bet į SS patenka retai. Manoma, kad parenchimoje susikaupusiems T limfocitams CNS antigenus gali pateikti čia pat lokalizuotos dendritinės ląstelės. Praradęs vientisumą kraujo – smegenų skysčio barjeras lengviau praleidžia T limfocitus ir kitas imuninės sistemos ląsteles (2 pav.) [9, 10].

Uždegiminiame infiltrate, be monocitų/makrofagų ir mikroglijos ląstelių, vyrauja limfocitai. 1 tipo T ląstelės pagalbininkės (Th1) išskiria IL-2, IFN- γ , TNF- α , jų vaidmuo svarbus aktyvinant uždegimines ląsteles. TNF- α ir IFN- γ gali tiesiogiai pažeisti mielina, be to, IFN- γ aktyvina mikroglijos APL savybes. Th2 limfocitų sekretuojami citokinai (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 ir kt.) skatina B limfocitų virsmą plazminėmis ląstelėmis bei pasižymi priešuždegiminiu veikimu. Didžiausią dalį limfocitų sudaro įvairaus subrendimo laipsnio CD8+ T limfocitai [9, 18]. Pastarųjų išskiriami perforinai ir granzimai gali papildomai žaloti mielino netekusius aksonus. Sveikame organizme MHC molekulių raiška nervų sistemoje yra slopinama, tačiau ją indukuoti gali virusinės kilmės neuroinfekcijos, autoimuniniai ir neurodegeneraciniai procesai [13, 32]. IS atveju, MHC I klasės molekulių raiška aptikta mikroglijos ir endotelio ląstelių paviršiuje; silpnesnė raiška, priklausomai nuo ligos sunkumo bei pažeidimo židinio aktyvumo, stebėta astrocitų, oligodendrocitų, neuronų ir aksonų paviršiuje. Vadinasi, IS pažeidimo židiniuose visos CNS ląstelės yra potencialūs citotoksinių T limfocitų taikiniai [33].

Formuojantis pažeidimo židiniams, stebimos 2 T limfocitų infiltracijos bangos. Pradinėse ligos stadijose, kuomet yra pažeidžiami oligodendrocitai, vyksta demielinizacija, stipriai suaktyvėja mikroglijos ląstelės, būdingas nedidelis T limfocitų kiekis, tarp kurių dominuoja CD8+ T limfocitai. Patekę į SS leukocitai išskiria daug uždegiminių citokinų, kurie galimai aktyvina smegenų kraujagyslių endotelio ląsteles – pastarųjų paviršiuje vyksta intensyvesnė adhezijos molekulių ir chemokinių raiška, taip papildomai skatinamas imuninių ląstelių susitelkimas. Kai mielinai suyra ir jį pradeda fagocituoti mikroglijos ląstelės bei makrofagai, prasideda antra leukocitų infiltracijos banga – šiuo atveju irgi vyrauja CD8+ limfocitai, taip pat gausėja CD4+ ir B limfocitų [10, 18, 26, 34, 35].

Daugeliui pacientų yra nustatomos oligokloninės juostos likvoro. Imunoglobulinų nulemtas pažeidimas išaiškintas tik dalinai. Nukreipti prieš mielino komponentus antikūnai demielinizaciją galimai sukelia vykstant šiems procesams: nuo antikūnų priklausomas ląstelinis citotoksiškumas, mielino opsonizacija ir komplemento aktyvacija [9, 11, 22]. Vis daugėja

įrodymų, kad didėjant oligokloninių juostų kiekiui bei imunoglobulinų koncentracijai likvoro, ligos prognozė blogėja [36-39].

Pastebėta, kad ligai progresuojant, uždegiminis CNS atsakas gali keistis. Pacientui senstant ir ilgėjant ligos trukmei, jo stiprumas mažėja. Be to, manoma, kad uždegimas gali būti dalinai izoliuojamas atsistačiusio kraujo - smegenų barjero. Toks reiškinys būdingas tik sergant pirmine arba antrine progresuojančia išsėtine skleroze, ir greičiausiai dėl šios priežasties pacientams priešuždegiminiai vaistai nėra efektyvūs [40].

1.4.2. Oksidacinio streso poveikis, geležies kaupimasis

Oksidacinis stresas pasižymi žalojančiu audinius poveikiu. CNS jį gali sukelti reaktyvūs deguonies ir azoto oksido radikalai, kuriuos daugiausiai išskiria mikroglijos ląstelės ir makrofagai. Galimi tiesioginiai pažeidimo mechanizmai (pavyzdžiui, lipidų, baltymų ar DNR oksidacija) arba netiesioginiai (mitochondrijų pakenkimas ir energijos apykaitos sutrikdymas). DNR pakenkimas gali inicijuoti ląstelių apoptozę [41].

Žalingam deguonies radikalų poveikiui ypač jautrios yra ląstelių mitochondrijos. Paveikus kvėpavimo grandinę, jos komponentų funkcija yra nuslopinama arba sustiprėja baltymų degradacija. Sutrikus energijos apykaitai, sumažėja ATF kiekis, o tai neigiamai veikia neuronų funkcijas [41-43]. Trūkstant energijos, sutrinka jonų apykaita aksonuose, būdingas viduląstelinio kalcio perteklius. Kalcis aktyvina proteazes, jos ardo struktūrinius neuronų baltymus – neurofilamentus [20, 43].

Neuronai pasižymi dideliu energijos poreikiu. Jų atsparumas oksidaciniam stresui yra ribotas, apsauginiai mechanizmai yra silpni. Mitochondrijų pažeidimas nulemtas energijos trūkumas sutrikdo elektrinį laidumą, kritiniu atveju tai gali tapti neuronų žūties priežastimi. Be to, pažeidus mitochondrijas, iš jų atsipalaiduoja citochromas C ir apoptozę sukeliantis veiksnys, kurie taip pat gali lemti oligodendrocitų žūtį ir demielinizaciją [41].

IS atveju, oksidacinio streso poveikis itin atsispindi mieline ir jį formuojančiuose oligodendrocituose. Pažeidimo židiniuose esančiose ląstelėse stebimi susikaupę oksiduoti lipidai ir branduolio DNR, kartais ryškėja apoptozės požymiai. Mieline yra daug riebalų, oligodendrocituose gausu viduląstelinės geležies, tad tai lemia didesnę jų jautrumą oksidaciniam poveikiui [41, 44]. Svarbu paminėti, kad oksidacinis stresas ir mitochondrijų kvėpavimo grandinės sutrikdymas slopina oligodendrocitų pirmtakų brendimą bei mielino atsinaujinimą [45].

Prie neurodegeneracijos prisideda ir su amžiumi susijęs geležies (Fe) kaupimasis. Fe būtina tinkamai smegenų funkcijai palaikyti, pavyzdžiui, jos reikia mielino formavimuisi, neuromediatorių sintezei. Daugiausiai sankaupę yra oligodendrocituose, mažesnis Fe kiekis

aptinkamas mikroglijos ląstelėse ir makrofaguose. Patologinį geležies kaupimąsi gali paskatinti kraujo - smegenų barjero funkcijos sutrikimai, susilpnėjęs geležies pasišalinimas dėl aksonų pakenkimo arba pernašos baltymų disfunkcija. Kai aktyviame uždegimo židinyje žūsta oligodendrocitai, iš jų atsipalaidavusi Fe^{3+} gali atsiskirti nuo feritino ir virsti Fe^{2+} . Laisva geležis yra linkusi sąveikauti su greta esančiomis molekulėmis, vykstant jonų mainams susidaro laisvieji radikalai. Fe^{2+} sąveikaujant su vandenilio peroksidu, susidaro labai reaktyvūs hidroksilo radikalai, todėl dar labiau sustiprėja žalojantis oksidacinio streso poveikis [18, 46, 47].

1.5. Išsėtinės sklerozės diagnostika

Pirmuosius IS klinikinius požymius apibrėžė Jean – Martin Charcot (1868 m.): nistagmas, tremoras, kalbos sutrikimas (tačiau oficialiais kriterijais pripažinti nebuvo). Nuo to laiko buvo pasiūlyta daugiau tikslesnių kriterijų, iš kurių plačiausiai taikyti – Poserio (1983 m.) ir McDonaldo (paskelbti 2001 m., atnaujinti 2005, 2010 ir 2017 m.) standartizuoti kriterijai. Skiriant ligos eigą keičiantį gydymą, reikėtų vadovautis naujausiais diagnostikos kriterijais, kad išvengti vėlyvos gydymo pradžios [1, 48].

Pagrindiniai asmens ištyrimo etapai: anamnezės surinkimas, neurologinė apžiūra, instrumentiniai/laboratoriniai tyrimai. Įtariant IS, pirmiausiai atliekamas magnetinio rezonanso tomografijos (MRT) tyrimas [49]. MRT tyrimas plačiai taikomas siekiant nustatyti židinius smegenų baltojoje medžiagoje, įvertinamas jų skaičius, apimtis bei išplitimas. Pagrindiniai MRT tipai: T1 ir T2. T1 tomogramos rodo naujai atsiradusius aktyvius pažeidimus bei uždegimo sritis. Gadolinis – į veną sušvirkščiamą kontrastinę medžiagą, padedanti atskirti naujus ir senus pažeidimus, ir taip įvertinti uždegimo aktyvumą. T2 tomogramos rodo ir aktyvius, ir neaktyvius pakenkimus, jų apimtį, be to, galima kiekybiškai įvertinti pažeistų galvos smegenų audinių tūrį [50]. Visgi, ši technologija dar nepakankamai išvystyta, kad galima būtų vertinti pažeidimus ir pilkojoje medžiagoje. Ieškant naujų diagnostinių žymenų, pasiūlytas reguliarus neurofilamentų smegenų skystyje nustatymas [51].

Pagal naujausius McDonaldo kriterijus, IS diagnozė gali būti nustatoma remiantis vienu paūmėjimu (kuris pasireiškia naujų simptomų atsiradimu arba senų sustiprėjimu, ir trunka ne mažiau nei 24 valandas) ir MRT duomenimis. Šiuo atveju reikalingi papildomi diagnozę paremiantys kriterijai, pavyzdžiui, CNS židinių išplitimo erdvėje ar/ir laike įrodymai [52]. Papildomų duomenų, patyrus 2 ir daugiau paūmėjimų bei esant objektyvių klinikinių pažeidimų įrodymų, nereikia, tačiau laukiant paūmėjimo tarsi leidžiama ir toliau progresuoti CNS pažeidimui, kuris bet kada gali tapti negrįžtamu. Deja, 2013 metų duomenimis, kai kuriose šalyse vis dar reikalaujama dviejų paūmėjimų diagnozuojant IS [1, 4].

1.5.1. Smegenų skysčio punkto laboratorinis tyrimas

IS diagnostikai svarbios informacijos suteikia ir laboratorinis smegenų skysčio ištyrimas. Didžiausią reikšmę turi oligokloninių juostų vertinimas bei IgG indekso apskaičiavimas [15]. Oligokloninės juostos nustatomos izoelektrinio fokusavimo metodu, tyrimo jautrumas - 85 proc., specifiškumas – 92 proc. (tiriant sergančiųjų IS smegenų skystį). Jos atspindi intratekalinę IgG sintezę, t.y. procesas vyksta tarpe, kuris yra po smegenų voratinkliniu dangalu [53, 54]. Jeigu asmeniui diagnozuotas KIS ir nustatytos teigiamos oligokloninės juostos SS, išlieka didelė tikimybė, kad su laiku išsivystys IS [55]. Imunoglobulinai yra didelės molekulės, todėl pro nepakitusių kraujo – CNS barjerą beveik neprasiskverbia. Intratekalinė IgG sintezė visada patologinė, bet šis rodiklis nėra specifinis IS – oligokloninės juostos likvoro aptinkamos sergant neuroborelioze, ŽIV infekcija, sisteminė raudonąja vilklige, CNS limfoma ir kt. [54, 56]. Tam, kad galima būtų nustatyti intratekalinės sintezės tipą (išskiriami 5 tipai), reikia tirti ne tik SS, bet ir kraujo serumą [57]. Pagal 2017 m. McDonaldo kriterijus, oligokloninių juostų nustatymas likvoro gali būti laikomas CNS židinių išplitimo laike įrodymu [52].

Kiti būdingi radiniai sergant IS – nežymiai padidėjęs leukocitų skaičius (5-50 ląstelių/ μ l), aktyvinti B limfocitai ir plazminės ląstelės. Be to, smegenų skystyje vyrauja CD4+ T limfocitai (palyginimui – uždegiminiuose židiniuose daugumą limfocitų sudaro CD8+ T limfocitai). Kraujo – CNS barjero vientisumą apibūdina albumino indeksas (SS ir serumo albumino koncentracijų santykis), kuris dažniausiai būna nepakitęs. Jokių pakitimų SS nenustatoma maždaug 10 proc. pacientų [58].

1.5.2. Biologiniai žymenys

Biologiniai žymenys leidžia nuspėti ligos progresavimą, stebėti ligos aktyvumą bei vertinti gydymo efektyvumą. IS kol kas dar neturi vieno specifinio biožymens, tačiau daugybė įvairių molekulių yra aktyviai tyrinėjamos (citokinai, adhezijos molekulės, chemokinai ir jų receptoriai, metaloproteinazės, antikūnai prieš MOG, MPB ir t.t.). IS biologinius žymenis galima suskirstyti į 4 grupes:

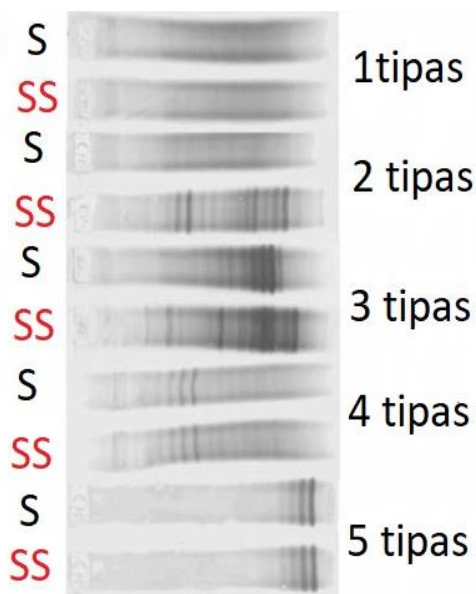
- predikciniai: padeda atskirti asmenis, turinčius didesnę riziką susirgti IS;
- diagnostiniai (D): taikomi diferencinei diagnostikai arba siekiant atskirti sergančius IS nuo sveikų individų;
- ligos aktyvumo (LA): atskirti IS pacientus pagal klinikinę ligos eigą (RRIS ir APIS);
- kiti (K): atsako į gydymą (efektyvumui vertinti), šalutinių poveikių stebėjimui.

Rutiniškai SS nustatomi biologiniai žymenys – IgG oligokloninės juostos, IgG indeksas, bei keletas antikūnų: priešvirusiniai (anti - *Varicella zoster* bei anti - *John Cunningham*), prieš

mielino oligodendrocitų glikoproteiną ir prieš akvaporiną-4 [59, 60]. Šių žymenų sąsajos su IS apibūdintos 1 lentelėje.

1 lentelė. Išsėtinės sklerozės diagnostikoje naudojami biologiniai žymenys ir jų apibūdinimas.

Biologinis žymuo	Apibūdinimas
IgG oligokloninės juostos (D)	Kokybinis intratekalinės sintezės rodiklis (3 pav.). SS nustatomos iki 95 proc. pacientų su kliniškai išreikšta IS, tačiau gali būti aptiktos ir kitų uždegiminių CNS būklių ar/ir lėtinių neuroinfekcijų atvejais. Siejamos su didesne IS išsivystymo rizika KIS turintiems pacientams [55, 61].
IgG indeksas (D)	Kiekybinis intratekalinės sintezės rodiklis. Apskaičiuojamas pagal formulę: (SS/serumo IgG):(SS/serumo albuminas). Būna padidėjęs iki 70 proc. IS pacientų, išskyrus atvejus, kai oligokloninių juostų SS nenustatoma [55].
Priešvirusiniai Ak (K): Ak prieš <i>Varicella zoster</i> virusą (anti-VZV), Ak prieš <i>John Cunningham</i> virusą (anti-JCV)	Kai kurios virusinės infekcijos, galinčios sukelti uždegimą CNS, siejamos su neurodegeneraciniais procesais. Tiriant IS sergančių pacientų serumą ar/ir likvorą, didžiausias VZV kopijų skaičius išmatuojamas paūmėjimo periodu, tačiau nustatant VZV DNR bei anti-VZV Ak paplitimo dažnį tarp sergančiųjų, nepriklausomų tyrimų rezultatai skiriasi [62-66]. Be to, fingolimodo naudojimas gydymo tikslais didina VZV ir kitų <i>Herpes</i> virusų sukeltų infekcijų riziką [67]. Natalizumabu gydomi pacientai turi didesnę riziką, kad jiems išsivystys progresuojanti daugiažidininė leukoencefalopatija, kurią sukelia JCV. 50-60 proc. IS pacientų nustatomi anti-JCV Ak [68-71].
Anti – MOG (D, LA)	MOG sudaro tik nedidelę dalį mielino dangalo, bet kadangi šio glikoproteino raiška vyksta mielino paviršiuje, MOG gali tapti Ak taikiniu. Anti-MOG Ak geba sukelti demielinizaciją. Vykdamas EAE modeliu paremtus tyrimus, T. Berger su bendraautorais nustatė reikšmingai didesnę IS išsivystymo riziką, kai dar esant KIS, serume randami anti-MOG Ak. Tačiau J. Kuhle su bendraautorais, atlikę didesnės apimties panašų tyrimą, reikšmingo ryšio tarp anti-MOG Ak ir KIS progresijos iki IS nenustatė [23, 72, 73].
Ak prieš akvaporiną-4 (D)	Specifinis optinio neuromielito žymuo, taikytinas diferencinei diagnostikai. Kadangi abi ligos yra uždegiminės demielinizuojančios, jos turi klinikinių panašumų [74].



1 tipas: normos atvejis – oligokloninių juostų nėra nei smegenų skystyje, nei serume.

2 tipas: klasikinė intratekalinė IgG sintezė – oligokloninės juostos yra tik SS.

3 tipas: būdingas intratekalinėi sintezei, susietai su sisteminiu uždegiminiu atsaku – oligokloninės juostos nustatomos ir SS, ir serume (SS žymiai daugiau).

4 tipas: neryškios juostos nustatomos SS ir serume. Atspindi periferinio uždegimo atsaką - į SS patenka iš kraujo. Intratekalinės IgG sintezės nėra.

5 tipas: būdingas paraproteinemijoms.

3 pav. Oligokloninių juostų vertinimas (S – serumas, SS – smegenų skystis) [56].

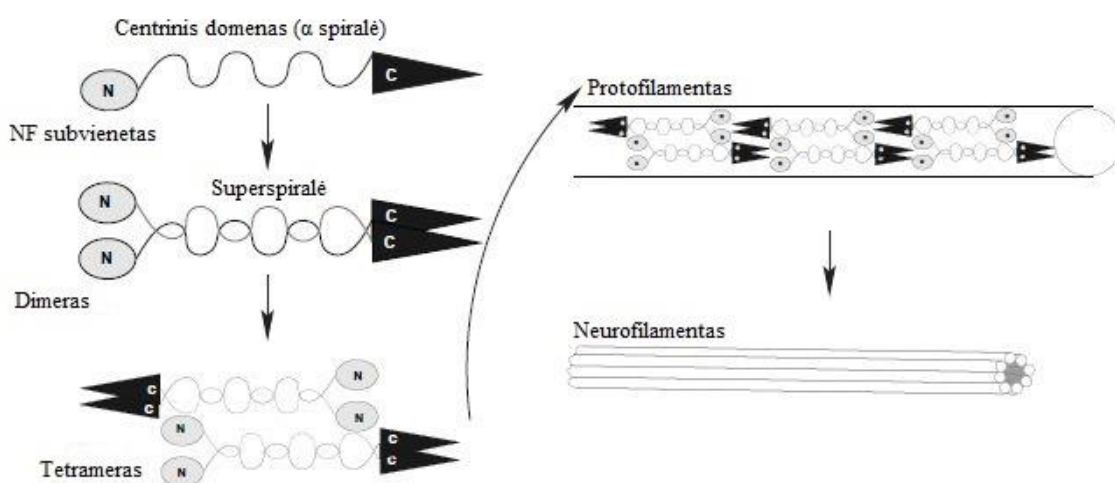
1.5.3. Neurofilamentai

Neuronų citoskeletą formuoja aktino filamentai, neurofilamentai ir mikrovamzdeliai. Neurofilamentai - sudėtingi baltymai, priklausantys tarpinių filamentų šeimai, jų skersmuo ~10 nm. Pagrindiniai NF sudarantys subvienetai yra lengvosios polipeptidinės grandinės (NF-L), vidutinės (NF-M) ir sunkiosios grandinės (NF-H) (2 lentelė). Taip pat neuronuose gali būti aptinkami α -interneksinas, periferinas ir kiti papildomi baltymai. Kiekvienas subvienetas turi tokią pat pamatinę struktūrą: globulės pavidalo galvą (N gale), uodegą (C gale), bei tarp šių domenu esančią α spiralę. Jungdamiesi tarpusavyje, subvienetai formuoja neurofilamentus [75-78]. Pirmiausiai susiveja dviejų polipeptidų centrinės α spiralės, kurios sudaro superspiralę - taip formuojasi dimerai. NF-L – būtinas dimero komponentas. Dimerai, išsidėstę priešingom kryptim, sudaro tetramerus, protofilamentus ir galiausiai tarpinius filamentus (4 pav.) [77, 78]. Svarbiausia NF funkcija – suteikti aksonams struktūrinį pamatą ir tuo pačiu reguliuoti jų skersmenį. Aksonų matmenys ypač svarbūs normaliai neuronų funkcijai palaikyti – kuo didesnis skersmuo, tuo greičiau perduodamas nervinis impulsas [79]. NF subvienetai pasižymi ilgaamžiškumu, o atsparumą endogeninių proteazių poveikiui sąlygoja neurofilamentus formuojančių polipeptidų fosforilinimas (dėl itin stipraus fosforilinimo, NF-H yra labiausiai atsparios) [77]. Didžiausią dalį neurofilamentų subvienetų sudaro NF-L, kurioms būdingas didelis tirpumas ir stabilumas [80].

2 lentelė. Neurofilamentus sudarančių subvienetų charakteristikos.

Neurofilamentų subvienetas	Aminorūgščių skaičius	Molekulinė masė*	Koduojantis genas, lokalizacija
Lengvosios grandinės (NF-L)	543	61-68 kDa	<i>NEFL</i> , 8p21
Vidutinės grandinės (NF-M)	916	103-150 kDa	<i>NEFM</i> , 8p21
Sunkiosios grandinės (NF-H)	1020	111-210 kDa	<i>NEFH</i> , 22q12.2

*Pastaba: dėl potransliacinių modifikacijų (ypač fosforilavimo ir glikozilavimo), atskiriant NF subvienetus elektroforezės metodu natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelyje, nustatoma didesnė molekulinė masė.



4 pav. Neurofilamentų formavimasis [77].

Aksonai nuolat netenka NF-L, tačiau tas kiekis nėra didelis. Fiziologinis NF-L netekimas siejamas su senėjimu. Dideli NF kiekiai atsipalaiduoja vykstant aksonų pažeidimui arba neuronų degeneracijai. NF patenka į viduląstelinį skystį, kuris sąveikauja su SS. Galiausiai perėję kraujo – CNS barjerą, NF patenka į kraują, tad šie baltymai gali būti nustatomi serume, plazmoje, likvore. Išsėtinė sklerozė būtent ir yra siejama su aksonų netekimu, nors tikslios to priežastys dar nėra išaiškintos. Yra žinoma, kad sergant IS, likvore nustatomos didelės NF-L ir NF-H koncentracijos, o apie NF-M vis dar trūksta duomenų. α -interneksinas pasižymi mažiausiu stabilumu, taip pat jį sunku išskirti, todėl jis nebūtų tinkamas žymuo [75, 76, 81-83].

Pastaraisiais metais ypač daug dėmesio skiriama NF-L tyrimams. Manoma, kad ateityje tai galėtų būti geras prognostinis žymuo ligos aktyvumui ir progresavimui stebėti, gydymo efektyvumui vertinti, kadangi yra pastebėtas ryšys su ligos pasikartojimais, negalios laipsniu, sąsajos su uždegimu bei galvos ir stuburo smegenų audinio pažeidimais [84-90]. NF-L nustatymas padeda aptikti aksonų pažeidimą, įvykusį ne vėliau nei prieš 3 mėnesius, jų

koncentracija atspindi pažeidimo mastą, tačiau patologinio proceso pobūdžio neapibūdina. Vykstant ūmiam ligos recidyvui, būdinga didžiausia NF-L koncentracija, kuri įprastai ne ilgiau nei per 2-3 mėnesius sumažėja [85, 90-92].

Kaip jau minėta, NF gali būti aptinkami kraujyje arba SS. Skirtingi tyrėjai nustatė, kad serumo ir likvoro NF-L koncentracijos koreliuoja [85-87, 89, 93]. Be to, parodyta, kad serumo NF-L tiesiogiai susijusios su pažeidimo židinių apimtimi ir skaičiumi, šio baltymo koncentracija didėja ligai recidyvuojant, o ją mažina sėkmingai parinktas ligos eigą modifikuojantis gydymas [85, 87, 89, 93]. Kadangi yra aptiktas ryšys tarp serumo NF-L koncentracijos ir ligos recidyvų, negalios laipsnio bei nervinio audinio pažeidimo masto, tiems pacientams, kuriems nustatoma didelė šio baltymo koncentracija, yra žymiai didesnė sparčios smegenų atrofijos bei negalios progresavimo rizika [87]. Visgi, teigiama, kad likvoro NF-L tiksliau atspindi ligos aktyvumą dėl stebėtos ryškesnės koreliacijos su naujai atsiradusiais T2 židiniiais bei smegenų tūrio mažėjimu [86]. Pagrindinė kliūtis, ribojanti NF-L nustatymo SS pritaikymą kasdieninėje praktikoje – sudėtingas tiriamosios medžiagos paėmimas, juolab kad išlieka kartotinių tyrimų poreikis [76, 82, 84-87].

NF-L yra aptinkamos ir kitų neurologinių ligų atvejais, pavyzdžiui, sergant šonine amiotrofine skleroze, Parkinsono liga, vystantis neurodegeneracinei demencijai, patyrus smegenų traumą [78], tad tai nėra ligai specifinis žymuo.

2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

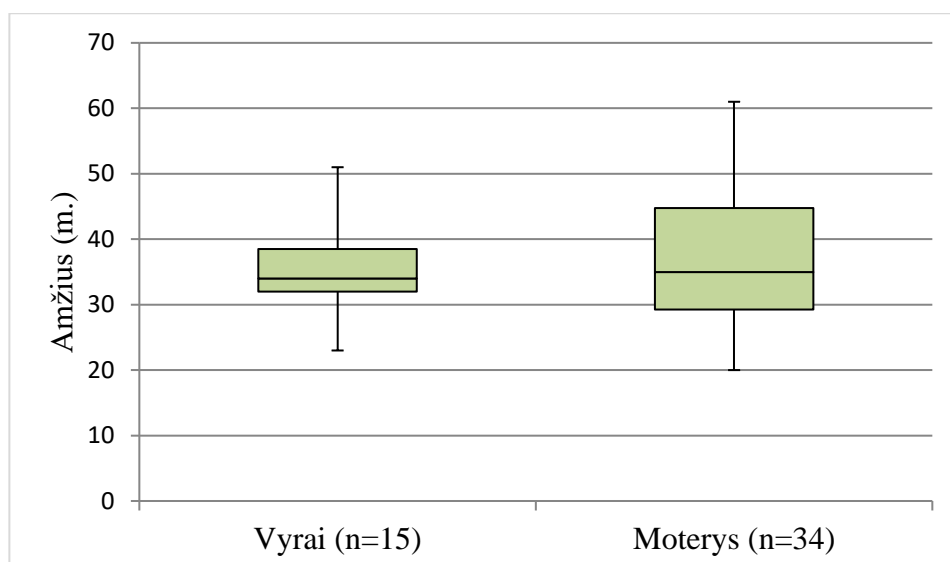
2.1. Tiriamoji medžiaga

Tiriamoji medžiaga – smegenų skystis. Ėminys paimamas juosmeninės punkcijos metu, procedūrą atlieka gydytojas. SS turi būti surenkamas į vakuuminį mėgintuvėlį be priedų ir kuo skubiau (ne ilgiau nei per 1 valandą) pristatomas į laboratoriją, laikant 18-25°C temperatūroje. Po juosmeninės punkcijos SS buvo užšaldomas ir laikomas -80°C temperatūroje.

Mėginiai mokslo tiriamajam darbui rinkti 2018 m. vasario – 2018 m. gruodžio mėnesiais, eksperimentinė tyrimo dalis atlikta 2018 m. gruodžio mėnesį, dviem etapais.

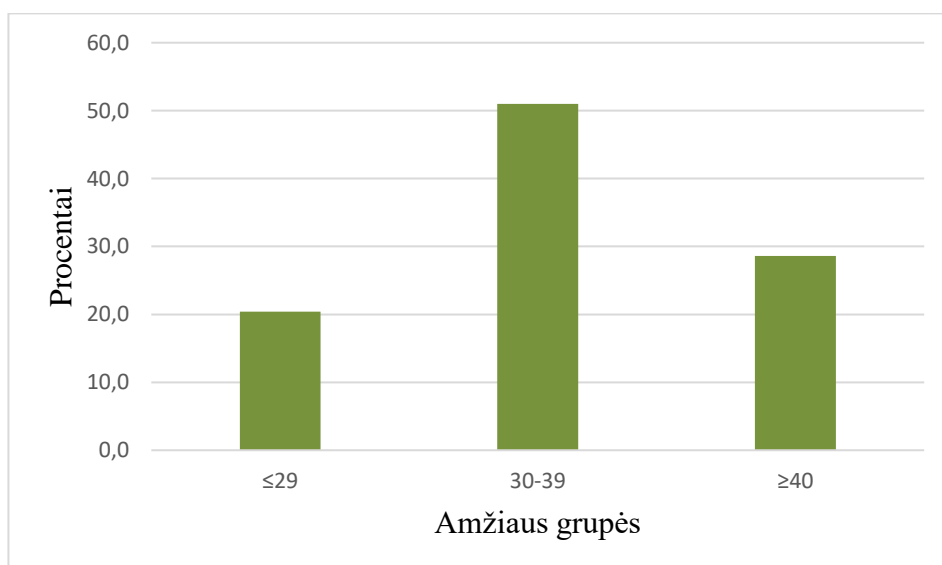
2.2. Tiriamųjų imtis ir charakteristika

Mokslo tiriamojo darbo tikslui ir išsikeltiems uždaviniams pasiekti buvo ištirti 49 pacientai, besigydantys Vilniaus Universiteto ligoninės Santaros klinikose (VUL SK). Tiriamųjų imtį sudarė VUL SK nervų ligų skyriaus pacientai, kuriems nustatyta išsėtinė skleroze (pradinė demielinizacijos stadija), gydymas netaikytas. Iš jų 69,4 % - moterys ir 30,6 % - vyrai. Pacientų amžiaus mediana - 34 (IQR = 32 – 41), tarp lyčių reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,68$) (5 pav.)



5 pav. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal amžių ir lytį.

Dėl sudėtingo tiriamosios medžiagos paėmimo iširti sveikų (nesergančių neurologinėmis ligomis) asmenų SS nebuvo galimybės. Vertinant neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentraciją, buvo remiamasi tyrimui skirtų reagentų gamintojo pateiktomis pamatinėmis biologinėmis vertėmis. Pagal rekomendacijas, tiriamieji suskirstyti į 3 amžiaus grupes: 20,4 proc. sudarė 29 metų ir jaunesni asmenys, 51,0 proc. – 30-39 metų tiriamieji, ir 28,6 proc. – 40 metų ir vyresni (6 pav.).



6 pav. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes.

Gavus VUL SK Etikos komisijos pritarimą, duomenų analizėje naudotasi jau iširtų likvoro biocheminių žymenų, taikomų IS diagnostikoje, rezultatais.

2.3. Tyrimo metodas

Neurofilamentų lengvosios grandinės žmogaus smegenų skystyje gali būti nustatomos atliekant daugiasluoksnę „sumuštinio“ tipo imunofermentinę analizę (*Sandwich ELISA*). Tyrime naudojami du skirtingi antikūnai, kurie atpažįsta nepersidengiančius skirtingus to paties antigeno (kurio koncentraciją reikia išmatuoti) epitopus. Pirmieji specifiniai antikūnai yra fiksuoti šulinėlių dugne – jie susiriša su likvore esančiais neurofilamentais. Po inkubacijos ir plovimo pridėdama detekcinių antikūnų, tad įvykus reakcijai, analizė lieka tarp dviejų pirminių antikūnų. Neurofilamentų lengvosios grandinės nustatomos pridėjus fermentu žymėtų antrinių monokloninių antikūnų, specifinių pirminiems detekciniams antikūnams. Pridėjus substrato, vyksta spalvinė reakcija, spalvos intensyvumas priklauso nuo likvore esančių neurofilamentų koncentracijos. Reakcijos tirpalo optinis tankis išmatuojamas spektrofotometru. Tiriamo antigeno koncentracija apskaičiuojama remiantis standartine kalibracine kreive.

Lietuvoje neurofilamentų nustatymas nėra vykdomas. Tyrimas atliktas remiantis viešai prieinamu NF-light® (*Neurofilament light*) ELISA procedūros aprašymu, kurį parengė *IBL International* (Vokietija). Tyrimui skirto rinkinio gamintojas – *UrmanDiagnostics* (Švedija), reagentų rinkinys tinka tik likvorui tirti (pastaba – kontroliniais mėginiais gamintojas neaprūpina). Naudotas prietaisas – imunofermentinių tyrimų analizatorius su priedais *Stratec Gemini*. Jame buvo sukurtas specialus NF-L tyrimo protokolas, sudarytas pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas. Nors analizatorius yra pilnai automatizuotas, jis pritaikytas tik plovimo ir sugerties nuskaitymo etapuose, o likusi dalis tyrimo buvo atliekama rankiniu būdu. Dėl riboto reagentų kiekio, mėginių ir standartinių tirpalų dubliai nebuvo naudojami.

2.3.1. Tyrimui reikalingos priemonės

UrmanDiagnostics NF-light® (*Neurofilament light*) ELISA rinkinys:

- Plokštelė (12 takelių po 8 šulinėlius)
- Plėvelė plokštei uždengti (2 vnt.)
- 15 ml mėgintuvėlis konjugatui ruošti (2 vnt.)
- Mėginio skiediklis (1x40 ml)
- Konjugatas (1x260 µl)
- Konjugato skiediklis (1x12 ml)
- Detekcinių antikūnų koncentratas (50x; 1x260 µl)
- Lengvųjų grandžių neurofilamentų standartas, išgautas iš jaučio (2 buteliukai)
- Substratas (tetrametilbenzidinas, 1x12 ml)
- Stop reagentas (H₂SO₄ 8 %; 1x6 ml)

- Buferinis koncentratas plovimui (10x; 2x40 ml)

Kitos reikalingos priemonės:

- Kintamo tūrio pipetės su vienkartiniais antgaliais
- Eppendorf tipo mėgintuvėliai (1,5 ml)
- Mini centrifuga/vorteksas
- Mikro plokštelių purtyklė
- Dejonizuotas vanduo
- Filtrinis popierius

2.3.2. Darbinių tirpalų ruošimas

1. Buferinis plovimo tirpalas: plovimui skirtas buferinis tirpalas yra 10x koncentratas. Ruošiant buferinį plovimo tirpalą, koncentratas skiedžiamas su dejonizuotu vandeniu iki galutinio 400 ml tūrio, t.y. 40 ml koncentrato skiedžiama su 360 ml dejonizuoto vandens.

2. Standartiniai NF-L tirpalai: gaminami prieš pat naudojimą. Didžiausia standarto koncentracija (10000 pg/ml) yra gaunama praskiedus 1 buteliuką liofilizuoto standarto su 1600 µl mėginio skiediklio. Tolesni praskiedimai yra atliekami pagal žemiau nurodytą 3 lentelę.

3 lentelė. Praskiedimai standartinių tirpalų paruošimui.

Mėgintuvėlis	Mėginio skiediklis	Standartas iš mėgintuvėlio	Koncentracija pg/ml
S0	Liofilizuotas standartas skiedžiamas su 1600 µl mėginio skiediklio		10000
S1	300 µl	300 µl (iš S0)	5000
S2	300 µl	300 µl (S1)	2500
S3	360 µl	240 µl (S2)	1000
S4	300 µl	300 µl (S3)	500
S5	240 µl	60 µl (S4)	100
S6	300 µl	0 µl	0

Pastaba: praskiestas bei paruoštas naudoti pradinis standartas negali būti naudojamas pakartotinai.

3. Detekciniai antikūnai: tai biotinu žymėti monokloniniai Ak prieš NF-L (50x koncentratas). Prieš pat naudojimą koncentratas praskiedžiamas su mėginio skiedikliu santykiu 1:50. Išmaišoma vartant mėgintuvėlį arba vorteksuojant.

4. Konjugatas (75x koncentratas): paruošiamas prieš pat naudojimą. Specialiame mėgintuvėlyje (pridedamas rinkinyje) streptavidino - krienų peroksidazės konjugato koncentratas praskiedžiamas su konjugato skiedikliu santykiu 1:75. Išmaišoma vartant mėgintuvėlį arba vorteksuojant.

2.3.3. Imunofermentinės analizės eiga

1. Užšaldytas smegenų skystis iš anksto atitirpinamas laikant mėginius šaldytuve (2-8°C). Prieš pradėdant tyrimą, reagentai ir mėginiai bent 30 minučių turi būti laikomi kambario temperatūroje (20-25°C).

2. SS praskiedžiamas su tokiu pat kiekiu mėginio skiediklio, pavyzdžiui, 110 µl ir 110 µl (mažiausias bendras tūris – 210 µl).

3. Pagal nurodytą skiedimų lentelę paruošimi standartiniai tirpalai.

4. Plokštelė išplaunama pasiroštu buferiniu tirpalu (3 ciklai po 300 µl plovimo tirpalo kiekvienam šulinėliui). Po kiekvieno plovimo plokštelė nusausinama filtriniu popieriumi.

5. Į šulinėlius pridedama po 100 µl kiekvieno standartinio tirpalo ir tiriamo mėginio. Inkubuojama 1 valandą kambario temperatūroje, purtant (800 apskū per minutę).

6. Plokštelė išplaunama pasiroštu buferiniu tirpalu (3x300 µl), nusausinama filtriniu popieriumi.

7. Į kiekvieną šulinėlį pridedama po 100 µl neseniai paruošto detekcinių antikūnų tirpalo. Inkubuojama 45 minutes kambario temperatūroje, purtant (800 aps/min).

8. Plokštelė išplaunama pasiroštu buferiniu tirpalu (3x300 µl), nusausinama filtriniu popieriumi.

9. Į kiekvieną šulinėlį pridedama po 100 µl naujai paruošto konjugato. Inkubuojama 30 minučių kambario temperatūroje, purtant (800 aps/min).

10. Plokštelė išplaunama pasiroštu buferiniu tirpalu (3x300 µl), nusausinama filtriniu popieriumi.

11. Į kiekvieną šulinėlį pridedama po 100 µl substrato (tetrametilbenzidino). Inkubuojama 15 minučių kambario temperatūroje, purtant (800 aps/min). Vyksta įvairaus intensyvumo spalvinė reakcija.

12. Į kiekvieną šulinėlį pridedama po 50 µl reakciją sustabdančio reagento – stebimas spalvos pokytis (iš mėsvos į gelsvą).

13. Analizatoriaus skaitytuvu vertinamas kiekvieno šulinėlio optinis tankis esant 450 nm bangos ilgiui, kuris, remiantis kalibracine kreive, vėliau perskaičiuojamas į NF-L koncentraciją (pg/ml) tiriamųjų likvoro.

2.3.4. Rezultatų vertinimas

4 lentelė. Gamintojo rekomenduojamos NF-L koncentracijos vertės skirtingose amžiaus grupėse.

Amžius (m.)	Rekomenduojama vertė
≤ 29	< 290 pg/ml (n=17)
30 - 39	< 380 pg/ml (n=15)
≥ 40	< 830 pg/ml (n=18)

Ištyrus 50 sveikų asmenų smegenų skystį, normalios NF-L vertės siekė 112 – 821 pg/ml. Tiriamieji padalinti į 3 amžiaus grupes, rekomenduojamos vertės apibrėžtos kaip vidutinė NF-L koncentracija + 2 standartiniai nuokrypiai (4 lentelė).

2.3.5. Tyrimo charakteristikos

NF-L aptikimo riba: 32 pg/ml, matavimo ribos: 100 pg/ml – 10000 pg/ml. NF-L tyrimo matavimo serijos vidutinis glaudumo koeficientas 4%, tarp matavimo serijų - 6%. Kryžminės reakcijos su NF-M ir NF-H nebūdingos.

2.4. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant *Microsoft Office Excel 2016*, *R* (3.5.2 versija) programinės įrangos paketus. Kokybiniai duomenys apibūdinti absoliučiais skaičiais ir procentine išraiška, duomenų analizei naudotas Fišerio tikslusis kriterijus. Kintamųjų skirstinio normalumui įvertinti pritaikytas Šapiro – Vilko testas. Pagal normalųjį dėsnį pasiskirstę duomenys apibūdinti aritmetiniu vidurkiu ir standartiniu nuokrypiu. Neparametrinių duomenų apibūdinimui naudota mediana, kvartilinis plotis (IQR). Statistinei analizei daugiausiai naudoti neparametriniai kriterijai. Palyginimui tarp dviejų grupių taikytas Mano – Vitnio - Vilkoksono rangų sumų kriterijus, daugiau nei dviejų grupių palyginimui – Kruskalo - Voliso kriterijus. Ryšiiui tarp biocheminių likvoro žymenų įvertinti naudotas Spirmeno koreliacijos koeficientas, atlikta tiesinės regresijos analizė. Tiriant statistines hipotezes, pasirinktas $\alpha = 0,05$ reikšmingumo lygmuo. Rezultatai vertinti kaip statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

3. TYRIMO REZULTATAI

3.1. Smegenų skysčio biocheminių rodiklių pokyčiai, jų ryšys su NF-L koncentracija

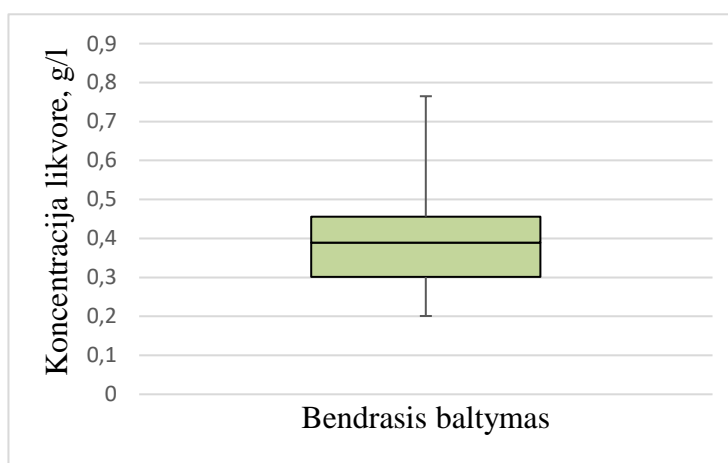
5 lentelėje pateikti pagrindiniai tiriamųjų laboratorinių tyrimų duomenys – bendrojo baltymo koncentracija (g/l), albumino ir IgG indeksai, IgG koncentracija (mg/l) bei išmatuota neurofilamentų lengvųjų grandinių (NF-L) koncentracija (pg/ml).

5 lentelė. Tiriamųjų smegenų skysčio biocheminių rodiklių duomenys.

Rodiklis	Vidurkis	SD
Bendrasis baltymas, g/l	0,391	0,12
Albumino indeksas	6,1	2,24
	Mediana	IQR
IgG, mg/l	40,2	26,7 - 58,5
IgG indeksas	0,605	0,506 - 0,729
NF-L, pg/ml	587,6	464,8 - 998,5

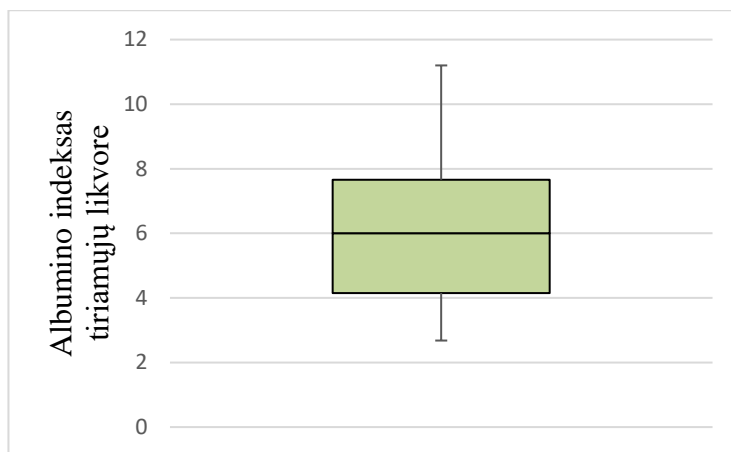
Pastaba: *Ig indeksas* = (SS IgG konc./SS albumino konc.) : (serumo IgG konc./serumo albumino konc.); *albumino indeksas* = SS albumino konc./serumo albumino konc.

Vidutinė bendrojo baltymo koncentracija SS - 0,391 g/l. (SD = 0,12) VUL SK nustatytą vidutinę rekomenduojamą vertę (< 0,45 g/l) viršijo 28,6 proc. tiriamųjų (7 pav.).



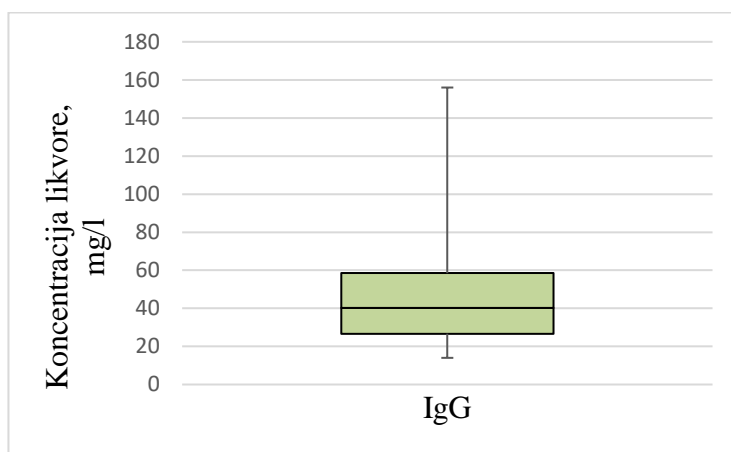
7 pav. Bendrojo baltymo koncentracija tiriamųjų likvoro (g/l).

Albumino indekso vidurkis – 6,1 (SD = 2,24). Rekomenduojamą vertę (< 9) viršijo 10,2 proc. pacientų (8 pav.).



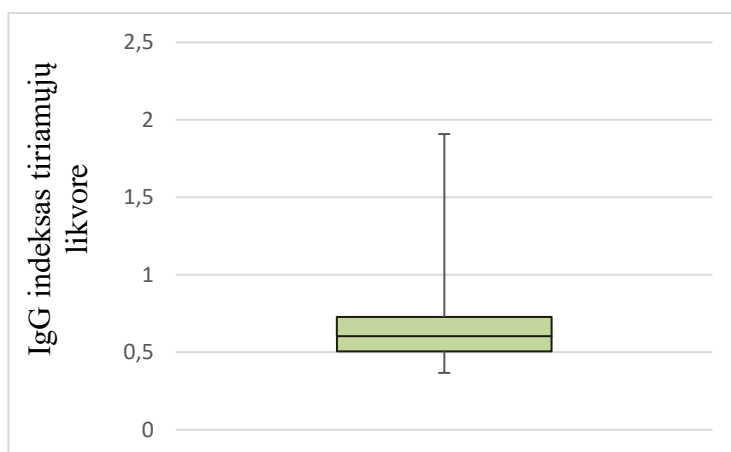
8 pav. Albumino indeksas tiriamųjų likvoro.

IgG koncentracijos tiriamųjų likvoro mediana – 40,2 (IQR = 26,7 - 58,5) mg/l (9 pav.). VUL SK numatyta pamatinę biologinių verčių intervalą (0 - 40 mg/l) viršijo 49 proc. tiriamųjų.



9 pav. IgG koncentracija tiriamųjų likvoro (mg/l).

IgG indekso mediana buvo 0,605 (IQR = 0,506 – 0,729) (10 pav.). 30,6 proc. tiriamųjų nustatytas IgG indeksas viršijo VUL SK numatyta pamatinę biologinių verčių intervalą (0,3 - 0,7).



10 pav. IgG indeksas tiriamųjų likvoro.

Nustatyta NF-L koncentracijos likvoro mediana buvo 587,6 (IQR = 464,8 – 998,5) pg/ml. Kadangi siūloma vidutinė NF-L koncentracijos reikšmė priklauso nuo tiriamųjų amžiaus, pokyčiai yra aptariami 3.2 poskyryje.

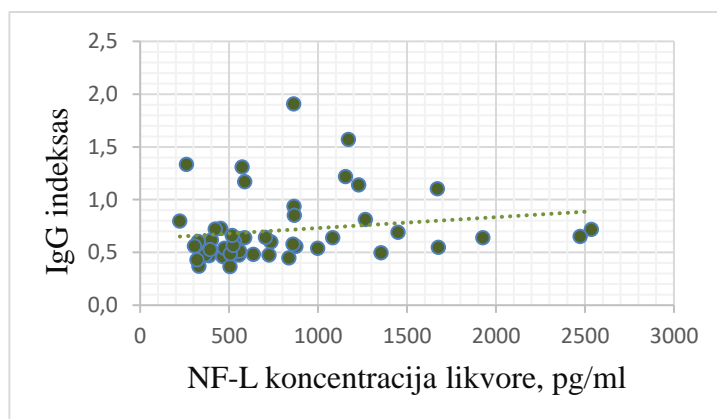
Oligokloninės juostos rastos 77,6 proc. pacientų. Iš 6 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad IgG ir NF-L koncentracijos bei IgG indekso medianos statistiškai patikimai didesnės tiriamųjų grupėje, kuriems rastos oligokloninės juostos ($p < 0,05$). Vertinant bendrojo baltymo koncentraciją ir albumino indeksą, reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta.

6 lentelė. Biocheminių rodiklių reikšmės grupėse pagal oligokloninių juostų nustatymą.

Rodiklis	Oligokloninės juostos		p reikšmė
	Teigiamos	Neigiamos	
Bendrasis baltymas, g/l	0,404 (0,121)	0,344 (0,106)	0,13
Albumino indeksas	6,26 (2,20)	5,63 (2,42)	0,45
IgG indeksas	0,64 (0,56 – 0,84)	0,47 (0,44 – 0,50)	$< 0,0001$
IgG, mg/l	46,95 (28,93 – 60,75)	26,70 (23,25 – 35,25)	0,01
Neurofilamentai, pg/ml	729,6 (520,6 – 1166,7)	505,5 (359,0 – 539,1)	0,005

Siekiant įvertinti ryšį tarp NF-L koncentracijos SS ir kitų tirtų biocheminių žymenų ryšį, taikytas Spirmeno koreliacijos koeficientas. Labai stiprus tiesioginis ryšys nustatytas tarp bendrojo baltymo koncentracijos ir albumino indekso ($r = 0,93$), stiprus tiesioginis ryšys – tarp bendrojo baltymo ir IgG koncentracijų ($r = 0,77$). Vidutinis ryšys sieja IgG koncentraciją su albumino indeksu ($r = 0,69$) bei IgG indeksu ($r = 0,50$). Visi šie paminėti ryšiai – statistiškai reikšmingi ($p \leq 0,0002$). Atlikus tiesinę daugialypę regresinę analizę, koreliacija pasitvirtino abiem atvejais (atitinkamai $r^2 = 0,86$ ir $r^2 = 0,83$; $p < 0,001$).

Tyrimo metu nustatyta, kad NF-L koncentraciją ir IgG indeksą sieja silpna tiesioginė priklausomybė ($r = 0,35$; $p = 0,01$) (11 pav.). Tarp NF-L koncentracijos ir IgG indekso koreliacija nepasitvirtino ($r^2 = 0,03$; $p = 0,24$). Reikšmingo ryšio tarp albumino indekso ir NF-L koncentracijos nustatyti nepavyko ($r = 0,07$; $p = 0,63$).



11 pav. NF-L koncentracijos likvoro koreliacija su IgG indeksu.

3.2. Biocheminių žymenų ryšys su tiriamųjų fiziologiniais rodikliais

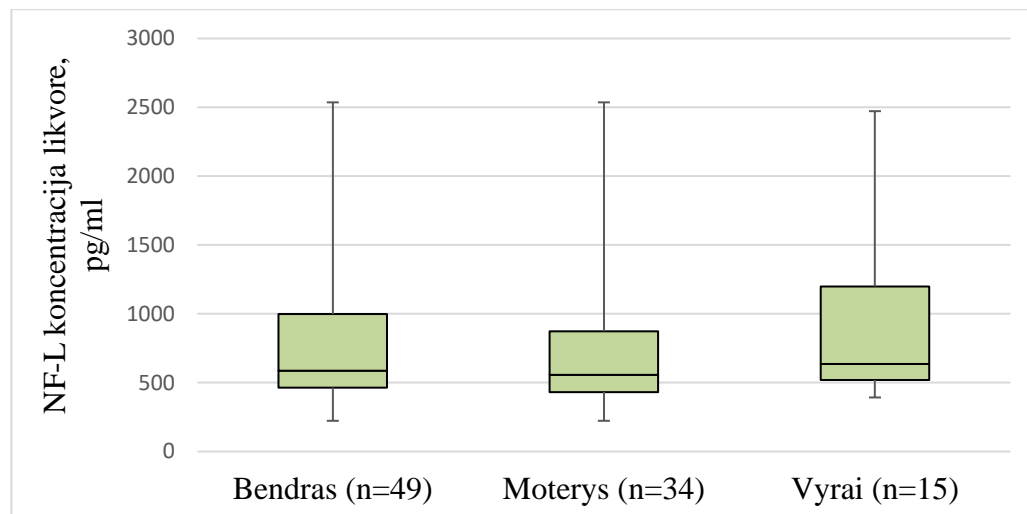
Net 77,6 proc. pacientų rastos oligokloninės juostos, dažniau – moterims (49,0 proc.). Proporcijos tarp vyrų ir moterų statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,14$) (7 lentelė). Dažniausiai oligokloninės juostos buvo nustatomos 30-39 metų tiriamųjų grupėje (40,8 proc.). Tačiau reikšmingų skirtumų tarp trijų amžiaus grupių irgi nebuvo nustatyta ($p = 0,39$).

7 lentelė. Oligokloninių juostų nustatymas pagal lytį (%).

Oligokloninės juostos	Moterys	Vyrai	Iš viso
Teigiamos	49,0	28,6	77,6
Neigiamos	20,4	2,0	22,4
Iš viso	69,4	30,6	100,0

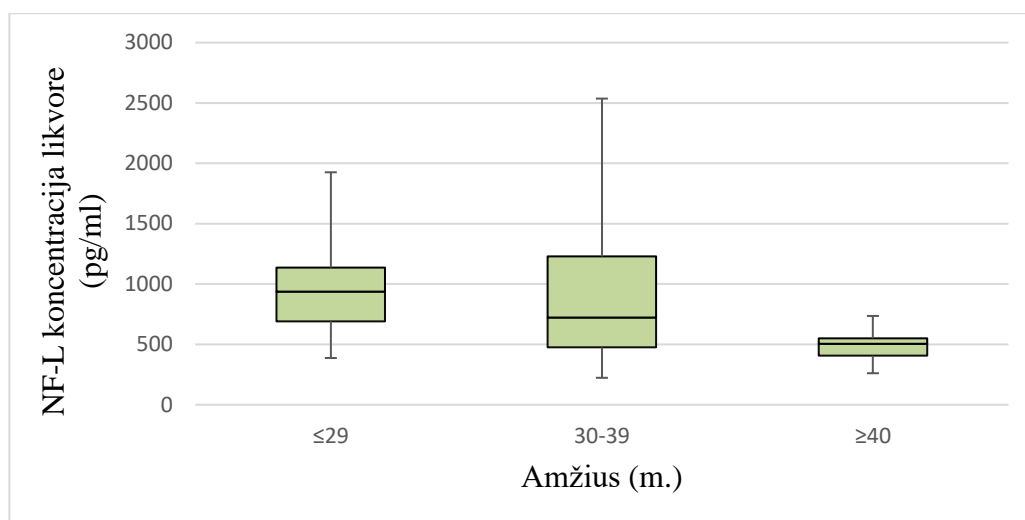
Statistiškai reikšmingų skirtumų nei tarp lyčių, nei tarp trijų amžiaus grupių nenustatyta bendrojo baltymo, IgG koncentracijos, albumino bei IgG indeksų medianų (vidurkių) atžvilgiu.

Nustatyta NF-L koncentracijos likvoro mediana buvo 587,6 (IQR = 464,8 – 998,5) pg/ml. Vyrų ir moterų NF-L koncentracijos likvoro medianų vertės statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,31$) (12 pav.). 63,3 proc. tiriamųjų NF-L koncentracija viršijo reagentų gamintojo rekomenduojamą vertę amžiaus grupei.



12 pav. Neurofilamentų lengvųjų grandinių (NF-L) koncentracija tiriamųjų likvoro.

Padidėjusi NF-L koncentracija nustatyta visiems pacientams iki 30 metų, o vyresnių nei 40 metų grupėje – gamintojo rekomenduojama vertė neviršyta. NF-L koncentracijos medianos tarp trijų amžiaus grupių statistiškai reikšmingai skiriasi ($p = 0,005$), didžiausia medianos reikšmė stebima jauniausių tiriamųjų (≤ 29 metų) grupėje. Aukščiausia NF-L koncentracija (2536,062 pg/ml) nustatyta 30 - 39 metų pacientų grupėje (13 pav., 8 lentelė).

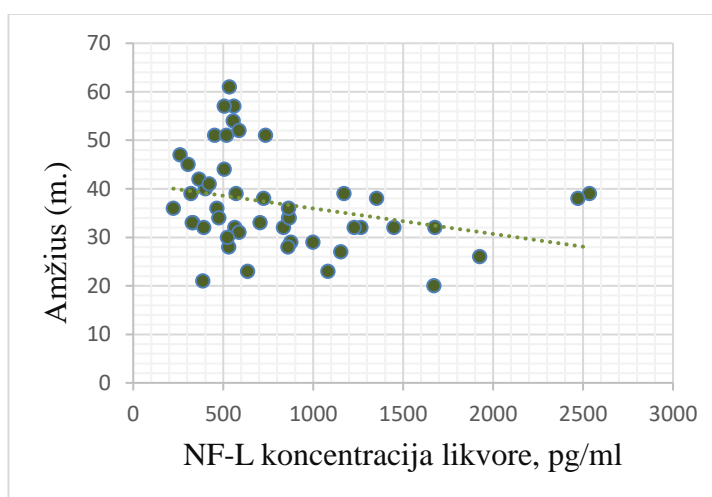


13 pav. NF-L koncentracijos likvoro (pg/ml) pasiskirstymas skirtingose amžiaus grupėse.

8 lentelė. NF-L koncentracijos likvoro (pg/ml) pasiskirstymas skirtingose amžiaus grupėse.

Amžius (m.)	n	Mediana	IQR	Minimali vertė	Maksimali vertė	p reikšmė
≤ 29	10	937,328	444,217	387,194	1925,685	0,005
30 - 39	25	723,641	753,275	223,135	2536,062	
≥ 40	14	505,725	143,937	260,935	735,495	

Nustatyta, kad NF-L koncentraciją SS ir amžių sieja silpna atvirkštinė priklausomybė ($r = -0,37$; $p = 0,01$) (14 pav.). Siekiant išsiaiškinti, ar vyresnis amžius lemia mažesnę NF-L koncentraciją, atlikta tiesinės regresijos analizė, gautas statistiškai reikšmingas modelis ($r^2 = 0,08$; $y = 1392,564 - 15,803x$; $p = 0,04$).



14 pav. NF-L koncentracijos likvoro koreliacija su amžiumi.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Išsėtinė sklerozė – gana seniai žinoma liga, tačiau dėl jos heterogeniškumo, vienintelis specifinis laboratorinės diagnostikos žymuo vis dar nėra atrastas. Šiame tyrime plėtojama

papildomo laboratorinio žymens, skirto ankstyvo demielinizacijos proceso diagnostikai, paieška. Nagrinėjamas neurofilamentų lengvųjų grandinių ryšys su IS diagnostikoje naudojamais laboratoriniais žymenimis bei pacientų fiziologiniais veiksniais (lytimi, amžiumi). Vykstant aksonų pažeidimui, dideli NF kiekiai patenka į smegenų skystį, taip pat šie baltymai gali būti nustatomi ir kraujyje. Tikimasi, kad ateityje NF-L galėtų būti geras prognostinis žymuo ligos aktyvumui ir progresavimui stebėti, gydymo efektyvumui vertinti.

Iš viso tyrime dalyvavo 49 asmenys. Tiriamieji buvo atrenkami tikslingai, t. y. į imtį įtraukti pacientai, kuriems diagnozuota išsėtinė sklerozė (pradinė demielinizacijos stadija) bei netaikytas gydymas. Lietuvoje kasmet nustatoma 150-200 naujų ligos atvejų [5], diagnostika vykdoma didžiuosiuose miestuose esančiuose IS centruose – Vilniuje, Kaune ir Klaipėdoje. Tad galima daryti prielaidą, kad ištyrėme apie trečdalį – ketvirtadalį 2018 metais naujai identifikuotų IS pacientų. Yra žinoma, kad pasaulyje šia liga moterys serga dvigubai dažniau negu vyrai, o lyčių pasiskirstymas tiriamųjų imtyje (69,4 % - moterys ir 30,6 % - vyrai) šį faktą dar kartą patvirtino. IS yra jaunų, darbingo amžiaus žmonių liga - ir net 71,4 proc. tiriamųjų buvo jaunesni nei 40 metų. Teiginys, kad vyrams liga nustatoma vyresniame amžiuje [7], nepasitvirtino – tirtų vyrų ir moterų amžiaus medianos (atitinkamai 34 ir 35) reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,68$), be to, vyriausia pacientė buvo moteris (61 metai).

Įprastai iki 20 proc. SS esančių baltymų yra sintetinami CNS, bet didžioji dalis į SS patenka iš kraujo [61]. 28,6 proc. tiriamųjų nustatyta padidėjusi bendrojo baltymo koncentracija. Pastebėta, kad jos didėjimas susijęs su IgG koncentracijos ir albumino indekso didėjimu ($r^2 = 0,86$; $p < 0,001$). IgG koncentracijos padidėjimas buvo būdingas beveik pusei tiriamųjų (49 proc.). Albuminai sudaro didžiausią dalį tiek serumo, tiek SS baltymų. Albuminų sintezė vyksta hepatocituose ir dalis šių baltymų pereina iš kraujo į smegenų skystį. Kai prasisunkimas suintensyvėja, didėja ir bendrojo baltymo koncentracija smegenų skystyje. SS ir serumo albumino koncentracijų santykis apibūdina kraujo – CNS barjero vientisumą, tačiau tik 10,2 proc. tiriamųjų nustatytas lengvai padidėjęs albumino indeksas. Žymaus ar vidutinio pralaidumo požymių neaptikta (aukščiausia reikšmė – 11,2, norma < 9). Visgi, net ir lengvas kraujo - CNS barjero vientisumo praradimas kartu su intratekaline IgG sinteze sąlygojo didesnę SS IgG koncentraciją ($r^2 = 0,83$; $p < 0,001$).

Padidėjusi IgG koncentracija ir oligokloninės juostos gali rodyti, kad smegenyse gausėja B limfocitų, tačiau šio tyrimo metu ląstelinė SS sudėtis vertinta nebuvo. Oligokloninių juostų aptikimas SS dažniausiai yra susijęs su intratekaline sinteze, tai atspindi patologinę būklę, kadangi įprastai Ak sintezė CNS nevyksta. Trečdaliui tiriamųjų nustatytas padidėjęs IgG indeksas (30,6 proc.) - tai yra CNS vykstančios IgG sintezės skaitinė išraiška. Oligokloninės juostos aptiktos 77,6 proc. tiriamųjų. Literatūros duomenimis, oligokloninės juostos būdingos iki

95 proc. pacientų su kliniškai išreikšta IS [37, 55, 61]. Pastebėta, kad pacientams, kuriems oligokloninės juostos nerastos, būdingos statistiškai reikšmingai mažesnės IgG ir NF-L koncentracijos (atitinkamai $p = 0,01$ ir $p = 0,005$) bei žemesnis IgG indeksas ($p < 0,0001$). Manoma, kad jeigu oligokloninės juostos nėra aptinkamos SS, tada pacientams būdinga švelnesnė ligos eiga, ypač negalios progresavimo atžvilgiu. Tokias išvadas padarė ir F. G. Joseph su kolegomis, retrospektyviai išnaginėję 200 IS atvejų - pacientai buvo parinkti pagal amžių ir lytį bei suskirstyti į dvi grupes po 100 tiriamųjų pagal tai, ar oligokloninės juostos buvo nustatytos, ar ne [37]. Tačiau S. Siritho bei M. S. Freedman paneigė šią nuomonę. Be to, šie tyrėjai irgi nustatė patikimai žemesnius IgG koncentracijos ir IgG indekso rodiklius, neturinčių oligokloninių juostų pacientų grupėje [94]. Nors vieningos nuomonės šiuo klausimu nėra, reikia turėti omeny, kad mūsų tiriamiesiems buvo dar tik pati ligos pradžia, ir kad intratekalinė IgG sintezė gali išryškėti vėlesniais etapais.

Jokių biocheminių rodiklių pakitimų nenustatyta 14,3 proc. pacientų. Literatūroje nurodoma, kad albumino indeksas dažniausiai būna nepakitęs, o normalūs SS rodmenys būdingi apie 10 proc. IS pacientų [59].

Vienas iš tyrimo apribojimų – kontrolinės grupės nebuvimas. Dėl sudėtingo tiriamosios medžiagos paėmimo, negalėjome nustatyti NF-L koncentracijos sveikų asmenų SS. Tačiau bent 5 nepriklausomi tyrėjai yra palyginę SS NF-L koncentraciją tarp sergančių IS ir neturinčių neurologinės patologijos asmenų, ir gavę statistiškai patikimai didesnes vidutines reikšmes sergančiųjų grupėje ($p < 0,001$) [80, 85, 87, 92, 95]. Pavyzdžiui, I. Hakansson su kolegomis nustatė, kad pacientų grupėje NF-L koncentracijos mediana buvo 895 (IQR = 300 – 2060) pg/ml, o sveikų žmonių grupėje – 212 (IQR = 151 – 289) pg/ml, šis skirtumas – statistiškai reikšmingas ($p < 0,001$) [86]. Mūsų tiriamųjų imtyje NF-L koncentracijos mediana buvo 587,6 (IQR = 464,8 – 998,5) pg/ml.

Literatūroje nurodoma, kad vyrams būdinga sunkesnė ligos eiga [7], A. Bhan su bendraautoriais nustatė reikšmingai didesnę NF-L koncentracijos medianą vyrų grupėje (vyrų – 1388 pg/ml, moterų – 245 pg/ml, $p < 0,01$) [84]. Tiriant lyties įtaką NF-L koncentracijai, moterų grupėje nustatyta NF-L koncentracijos mediana – 557,1 (IQR = 223,1 – 2536,1) pg/ml, vyrų grupėje – 635,7 (IQR = 392,7 – 2472,1) pg/ml, tačiau šis skirtumas tarp lyčių nebuvo reikšmingas ($p = 0,31$). Panašius rezultatus gavo ir L. Novakova, J. Lycke, C. Malmeström. su kolegomis [85, 91, 92]. Svarbu atsižvelgti į tai, kad paminėtų tyrėjų dauguma tiriamųjų jau sirgo IS ilgiau nei vienerius metus. J. Kuhle su bendraautoriais tyrė pacientus, kuriems IS buvo diagnozuota neseniai, tačiau reikšmingo NF-L koncentracijos skirtumo tarp lyčių irgi nenustatė (moterų – 691,5 pg/ml, vyrų – 939 pg/ml, $p = 0,53$) [93].

Įvertinus NF-L koncentracijos medianas skirtingose amžiaus grupėse, paaiškėjo, kad skirtumas tarp grupių yra statistiškai patikimas ($p = 0,005$). Didžiausia NF-L koncentracijos mediana nustatyta jauniausių tiriamųjų (≤ 29 metų) grupėje, be to, visiems šios grupės pacientams buvo būdinga padidėjusi NF-L koncentracija. Aukščiausia NF-L koncentracija (2536,1 pg/ml) nustatyta 30 - 39 metų pacientų grupėje, o vyresnių nei 40 metų grupėje – gamintojo rekomenduojama vertė nebuvo viršyta. Įvertinus ryšį tarp NF-L koncentracijos ir amžiaus, pastebėta silpna atvirkštinė priklausomybė ($r = -0,37$; $p = 0,01$). Tiesinės regresijos analizė parodė, kad vyresnis amžius iš tiesų lemia mažesnę NF-L koncentraciją, tačiau šis modelis nėra tinkamas nagrinėjamam ryšiui aprašyti ($r^2 = 0,08$; $p = 0,04$). Tad negalime teigti, kad visada vyresniame amžiuje bus nustatyta mažesnė NF-L koncentracija. Stebėtą koreliaciją tarp amžiaus ir NF-L koncentracijos galėjo paveikti rekomenduojama daugiau negu dvigubai didesnė NF-L koncentracijos vertė vyresnių pacientų amžiaus grupėje. Senstant fiziologiškai netenkama daugiau NF-L [81], tad siūlant ribines NF-L koncentracijos vertes, neabejotinai buvo atsižvelgta į šį faktą. Amžiaus įtakos NF-L koncentracijai nenustatė ir kiti mokslininkai [80, 84, 86, 91-93].

Vertinant intratekalinės sintezės įtaką NF-L koncentracijai, nustatytas silpnas tiesioginis ryšys su IgG indeksu ($r = 0,35$; $p = 0,01$). Tačiau atlikus tiesinės regresijos analizę, ši koreliacija nepasitvirtino ($r^2 = 0,03$; $p = 0,24$). Taip pat pastebėta, kad tiriamųjų grupėje, kuriems oligokloninės juostos nenustatytos, būdinga statistiškai patikimai žemesnė NF-L koncentracija ($p = 0,005$). Panašius rezultatus gavo ir C. E. Teunissen su kolegomis [90].

Albumino indeksas padeda įvertinti kraujo – CNS barjero integralumą, tačiau su NF-L koncentracija reikšmingo ryšio nustatyti nepavyko ($r = 0,07$; $p = 0,63$), jokie ryšio tarp šių rodiklių nenustatė ir J. N. Lycke bei C. Malmeström su bendraautorais [91, 92].

Apibendrinant gautus rezultatus, pacientų amžiaus ir lyties įtakos NF-L koncentracijai nenustatėme. Buvo aptiktas ryšys su intratekaline IgG sinteze, tačiau koreliacija nepasitvirtino. Ir nepaisant to, kad kraujo – CNS barjero vientisumo sutrikdymas gali turėti įtakos NF-L koncentracijai, tas poveikis irgi nėra reikšmingas. Tyrimo rezultatai rodo, kad NF-L koncentracijos nustatymas smegenų skystyje gali būti taikomas ankstyvai IS diagnostikai, o interpretuojant rezultatus pakanka atsižvelgti į paciento amžių. Kita vertus, panašių tyrimų, vertinančių NF-L koncentraciją ankstyvame ligos etape, beveik nėra atlikta. Rekomenduotina po metų ar/ir kelių pakartoti tyrimą, į analizę įtraukiant ligos eigos variantą bei jos trukmę, MRT duomenis, įvertinant galimą vartojamų vaistų įtaką bei įtraukiant duomenis apie ligos aktyvumą (paūmėjimas ar remisija) tiriamosios medžiagos paėmimo metu. Nors NF-L nustatymas smegenų skystyje negali pakeisti MRT tyrimo IS diagnostikoje, tačiau remiantis jau turimais duomenimis, ateityje tai gali būti vertingas pagalbinis rodiklis vertinant aksonų pažeidimo mastą.

IŠVADOS

1. Neurofilamentų lengvosios grandinės aptiktos visų tirtų pacientų smegenų skystyje, rekomenduojamą vertę amžiaus grupei viršijo 63,3 proc. tiriamųjų. Šio tyrimo rezultatai paremia NF-L koncentracijos diagnostinę svarbą, identifikuojant ankstyvą demielinizacijos procesą.
2. Statistiškai reikšmingos priklausomybės tarp NF-L koncentracijos ir bendrojo baltymo, IgG koncentracijos, albumino ar IgG indekso neaptikta. Tiriamiesiems, kuriems oligokloninės juostos nerastos, būdinga statistiškai patikimai žemesnė NF-L koncentracija - tai galėtų būti geresnės ligos prognozės požymis.
3. Neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentracija sergančiųjų išsėtine skleroze smegenų skystyje nėra statistiškai reikšmingai susijusi su tiriamųjų lytimi ir amžiumi. Vadinasi, šis biologinis žymuo galėtų būti naudojamas tiriant visus pacientus, nepriklausomai nuo aptartų fiziologinių veiksnių.

SANTRAUKA

Temos aktualumas: išsėtinės sklerozė (IS) – lėtinė neurodegeneracinė liga, žalojančiai veikianti centrinę nervų sistemą. Tai viena svarbiausių darbingo amžiaus žmonių netrauminės negalios priežasčių. Ligos eigą lemia sudėtingi uždegiminiai, demielinizuojantys procesai. Vykstant aksonų pažeidimui, neurofilamentų lengvosios grandinės (NF-L) yra aptinkamos smegenų skystyje. Tai potencialus biologinis žymuo ligos aktyvumui ir progresavimui stebėti.

Tyrimo tikslas: nustatyti neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentraciją išsėtine skleroze sergančių ligonių smegenų skystyje, įvertinat pritaikymą ankstyvo demielinizacijos proceso diagnostikoje.

Uždaviniai: 1. Nustatyti neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentraciją sergančiųjų išsėtine skleroze smegenų skystyje, vertinant ankstyvą demielinizacijos procesą. 2. Apibūdinti neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentracijos smegenų skystyje ir išsėtinės sklerozės įprastinių laboratorinių rodiklių pokyčius, įvertinant tirtų žymenų ryšį. 3. Įvertinti neurofilamentų lengvųjų grandinių koncentracijos smegenų skystyje ryšį su tiriamųjų fiziologiniais veiksniais (lytis, amžius).

Tyrimo metodika: tiriamųjų imtį sudarė 49 asmenys, kuriems nustatyta IS (pradinė demielinizacijos stadija), gydymas netaikytas. Tiriamieji pagal rekomendacijas suskirstyti į tris amžiaus grupes: jaunesni nei 30 metų, 30-39 metų, 40 metų ir vyresni. NF-L koncentracija smegenų skystyje nustatyta atlikus imunofermenitinę analizę.

Rezultatai ir išvados: NF-L nustatytos visiems tiriamiesiems, koncentracijos mediana - 587,6 pg/ml. Rekomenduojamą vertę amžiaus grupei viršijo 63,3 proc. tiriamųjų. Reikšmingos priklausomybės tarp NF-L koncentracijos ir bendrojo baltymo, IgG koncentracijos, albumino ar IgG indekso neaptikta. Tiriamiesiems, kuriems oligokloninės juostos nerastos, būdinga statistiškai patikimai žemesnė NF-L koncentracija, tai galėtų būti geresnės ligos prognozės požymis. Aukštesnė NF-L koncentracija labiau būdinga jaunesniems pacientams negu vyresniems. Tačiau reikšmingos amžiaus ar lyties įtakos NF-L koncentracijai neaptikta, vadinasi, šie fiziologiniai veiksniai rezultato neiškreipia ir NF-L gali būti tinkamas rodiklis, vertinant visus pacientus. Tyrimo rezultatai paremia NF-L koncentracijos diagnostinę svarbą identifikuojant ankstyvą demielinizacijos procesą, tačiau panašių tyrimų, vertinančių NF-L koncentraciją ankstyvame ligos etape, beveik nėra atlikta. Rekomenduotina po metų ar/ir kelių atlikti didesnės apimties tyrimą.

Raktažodžiai: išsėtinė sklerozė (IS), neurodegeneracija, neurofilamentų lengvosios grandinės (NF-L), biologiniai žymenys, smegenų skystis (SS).

SUMMARY

Detection of neurofilament light chains in cerebrospinal fluid as a diagnostic tool in multiple sclerosis

Background: multiple sclerosis (MS) is a chronic disease of the central nervous system, the leading cause of non-traumatic neurologic disability in young adults. The disease is characterized by inflammation, demyelination and axonal degeneration. Neurofilament light chains (NF-L) are detected in cerebrospinal fluid (CSF) as a result of axonal loss. It is a promising biomarker for monitoring the disease activity and progression.

The aim of the study was to analyze whether NF-L levels in MS patients could be useful CSF biomarker for early diagnosis of the demyelinating disease in routine clinical practice.

Objectives: 1. To measure NF-L concentration in CSF, evaluating the course of demyelination in early MS. 2. To evaluate changes in CSF NF-L concentration and other commonly used CSF biomarkers among MS patients, as well as determining the relationship between those biomarkers. 3. To evaluate the association between NF-L concentration in CSF and demographic characteristics of study participants (gender, age).

Materials and methods: levels of NF-L were determined in CSF of 49 patients with newly diagnosed MS. Patients were divided into three age groups: younger than 30 years old, 30-39 years old, 40 years of age and older. The analysis was performed using enzyme-linked immunosorbent assay technology.

Results and Conclusions: NF-L were detected in all MS patients, the median NF-L concentration was 587.6 pg/ml. 63.3% of study participants showed increased NF-L concentrations. There was no significant impact of IgG ratio, total protein or IgG concentrations, as well as albumin ratio on NF-L concentration. The NF-L concentration was lower in patients with negative oligoclonal bands, it may suggest a better long-term prognosis. NF-L levels were higher in young adults compared middle-aged patients. However, no significant influence of age or gender on NF-L levels was found, suggesting that determination of NF-L levels may be suitable for all patients. These results support the value of NF-L as a clinically significant CSF biomarker for early axonal damage detection, though further investigations are needed.

Keywords: multiple sclerosis (MS), neurodegeneration, neurofilament light chains (NF-L), biomarkers, cerebrospinal fluid (CSF).

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros doc. dr. Loretai Bagdonaitei už kantrybę, suteiktas žinias ir rekomendacijas rašant baigiamąjį darbą, VUL SK LMC biochemijos laboratorijos medicinos biologei Alinai Prodan už pagalbą ir patarimus atliekant praktinę tyrimo dalį.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Giovannoni G, Butzkueven H, Dhib-Jalbut S, Hobart J, Kobelt G, Pepper G, et al. Brain health: time matters in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2016 Sep;9 Suppl 1:S5–48.
2. Sukockienė E., Mickevičienė D. Galvos ir nugaros smegenų atrofija, sergant išsėtine skleroze. *Neurologijos seminarai* 2016; 20(69): 126-134.
3. Clanet M. Jean-Martin Charcot. 1825 to 1893. *Int MS J*. 2008 Jun;15(2):59–61.
4. Multiple Sclerosis International Federation: Atlas of MS. Prieiga per internetą <<https://www.msif.org/about-us/who-we-are-and-what-we-do/advocacy/atlas/>> [žiūrėta 2019-03-07]
5. Kastys J. Išsėtinės sklerozės gydymo naujovės. *Lietuvos gydytojo žurnalas* 2018; 7: 6-8, 10.
6. Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Revue Neurologique*. 2016 Jan 1;172(1):3–13.
7. Bove R, McHenry A, Hellwig K, Houtchens M, Razaz N, Smyth P, et al. Multiple sclerosis in men: management considerations. *J Neurol*. 2016 Jul;263(7):1263–73.
8. Kemežytė G., Kučinskienė Z. A. Autoagresyviųjų CD8 T limfocitų receptorių nustatymas sergančiųjų, išsėtine skleroze smegenų audinyje | *Laboratorinės medicinos žurnalas* 2012; t. 14, Nr. 2 (54), 59-63
9. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest*. 2001 Mar;81(3):263–81.
10. Lopes Pinheiro MA, Kooij G, Mizee MR, Kamermans A, Enzmann G, Lyck R, et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Mar;1862(3):461–71.
11. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):61–76.
12. Marck CH, De Livera AM, Weiland TJ, Jelinek PL, Neate SL, Brown CR, ir kt. Pain in People with Multiple Sclerosis: Associations with Modifiable Lifestyle Factors, Fatigue, Depression, Anxiety, and Mental Health Quality of Life. *Front Neurol*. 2017 Sep 5;8.
13. Lemus HN, Warrington AE, Rodriguez M. Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. *Neurol Clin*. 2018 Feb;36(1):1–11.
14. Lublin FD. New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification. *ENE*. 2014;72(Suppl. 1):1–5.

15. Kizlaitienė R. Kognityvinių funkcijų sutrikimai sergant išsėtine skleroze, jų ryšys su demografiniais klinikiniais rodikliais ir pakitimais magnetinio rezonanso tomografijos tyrime: Daktaro disertacija. Biomedicinos mokslai, medicina 06B. Vilnius; 2012.
16. Koriem KMM. Multiple sclerosis: New insights and trends. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016 May 1;6(5):429–40.
17. Ludewig P, Gallizioli M, Urra X, Behr S, Brait VH, Gelderblom M, et al. Dendritic cells in brain diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016 Mar 1;1862(3):352–67.
18. Lassmann Hans, van Horssen Jack. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Letters*. 2011 Aug 16;585(23):3715–23.
19. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2010 Oct;162(1):1–11.
20. Dutta R, Trapp BD. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology*. 2007 May 29;68(22 Suppl 3):S22-31; discussion S43-54.
21. Stadelmann C, Wegner C, Brück W. Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):275–82.
22. Weber MS, Hemmer B, Cepok S. The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):239–45.
23. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006 Aug;129(Pt 8):1953–71.
24. O'Connor KC, McLaughlin KA, De Jager PL, Chitnis T, Bettelli E, Xu C, et al. Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. *Nat Med*. 2007 Feb;13(2):211–7.
25. Haase CG, Guggenmos J, Brehm U, Andersson M, Olsson T, Reindl M, et al. The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls. *J Neuroimmunol*. 2001 Mar 1;114(1–2):220–5.
26. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*. 2004 Apr;55(4):458–68.
27. Hawker K. Progressive multiple sclerosis: characteristics and management. *Neurol Clin*. 2011 May;29(2):423–34.
28. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP. Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res*. 2005 Aug 1;81(3):363–73.

29. Chastain EML, Duncan DS, Rodgers JM, Miller SD. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):265–74.
30. Kotter MR, Li W-W, Zhao C, Franklin RJM. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci*. 2006 Jan 4;26(1):328–32.
31. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*. 2009 Nov;31(4):497–511.
32. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol*. 2001 Sep;159(3):809–15.
33. Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol*. 2004 Jan;14(1):43–50.
34. Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol*. 2009 Dec;66(6):739–53.
35. Marik C, Felts PA, Bauer J, Lassmann H, Smith KJ. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? *Brain*. 2007 Nov;130(Pt 11):2800–15.
36. Avasarala JR, Cross AH, Trotter JL. Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2001 Dec;58(12):2044–5.
37. Joseph FG, Hirst CL, Pickersgill TP, Ben-Shlomo Y, Robertson NP, Scolding NJ. CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 Mar;80(3):292–6.
38. Rinker JR, Trinkaus K, Cross AH. Elevated CSF free kappa light chains correlate with disability prognosis in multiple sclerosis. *Neurology*. 2006 Oct 10;67(7):1288–90.
39. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, et al. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest*. 2005 Jan 3;115(1):187–94.
40. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009 May;132(5):1175–89.
41. Lassmann H, van Horssen J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016 Mar 1;1862(3):506–10.

42. Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, Lax N, White K, Hanson PS, et al. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5):1161–74.
43. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006 Mar;59(3):478–89.
44. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2011 Jul;134(7):1914–24.
45. French HM, Reid M, Mamontov P, Simmons RA, Grinspan JB. Oxidative Stress Disrupts Oligodendrocyte Maturation. *J Neurosci Res*. 2009 Nov 1;87(14):3076–87.
46. Stankiewicz JM, Neema M, Ceccarelli A. Iron and multiple sclerosis. *Neurobiology of Aging*. 2014 Sep 1;35:S51–8.
47. Piñero DJ, Connor JR. Iron in the Brain: An Important Contributor in Normal and Diseased States. *The Neuroscientist*. 2000 Dec;6(6):435–53.
48. Poser CM, Brinar VV. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. *Clin Neurol Neurosurg*. 2004 Jun;106(3):147–58.
49. IS Mažasis žinynas. Prieiga per internetą: <http://www.issetine.lt/wp-content/uploads/2015/01/IS_mazasis_zinynas.pdf> [žiūrėta 2019-03-05].
50. National MS Society: Magnetic Resonance Imaging (MRI). Prieiga per internetą: <<https://www.nationalmssociety.org/Symptoms-Diagnosis/Diagnosing-Tools/MRI>> [žiūrėta 2019-03-07].
51. Hutchinson M. Neurodegeneration in multiple sclerosis is a process separate from inflammation: No. *Multiple Sclerosis Journal*. 2015 Nov 1;21:1628–31.
52. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162–73.
53. Bagdonas D. Oligokloninių juostų likvoro tyrimo interpretacija, ryšys su kitų laboratorinių tyrimų rezultatais bei reikšmė neurologinių ligų diagnostikoje: magistro darbas. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Kaunas; 2017. Prieiga per internetą: <<https://publications.lsmuni.lt/object/elaba:22417295/index.html>> [žiūrėta 2019-03-07]
54. Bourahoui A, De Seze J, Gutierrez R, Onraed B, Hennache B, Ferriby D, et al. CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *Eur J Neurol*. 2004 Aug;11(8):525–9.
55. Link H, Huang Y-M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006 Nov;180(1–2):17–28.

56. Mehling M, Kuhle J, Regeniter A. 10 Most Commonly Asked Questions About Cerebrospinal Fluid Characteristics in Demyelinating Disorders of the Central Nervous System. *The Neurologist*. 2008 Jan;14(1):60.
57. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 2005 Jun;62(6):865–70.
58. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stüve O, Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2013 May;9(5):267–76.
59. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2014 Jan;13(1):113–26.
60. Paul A, Comabella M, Gandhi R. Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019 Mar 1;9(3).
61. Sindic CJ, Van Antwerpen MP, Goffette S. The intrathecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med*. 2001 Apr;39(4):333–40.
62. Sotelo J, Ordoñez G, Pineda B. Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2007 Apr 1;254(4):493–500.
63. Sotelo J, Martínez-Palomo A, Ordoñez G, Pineda B. Varicella-zoster virus in cerebrospinal fluid at relapses of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2008;63(3):303–11.
64. Franciotta D, Bestetti A, Sala S, Perucca P, Jarius S, Price RW, et al. Broad screening for human herpesviridae DNA in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum. *Acta Neurol Belg*. 2009 Dec;109(4):277–82.
65. Najafi S, Ghane M, Yousefzadeh-Chabok S, Amiri M. The High Prevalence of the Varicella Zoster Virus in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in the North of Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Mar 12;9(3).
66. Sotelo J, Ordoñez G, Pineda B, Flores J. The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2014 Apr;119:44–8.
67. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung H-P, Khatri BO, Montalban X, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010 Feb 4;362(5):402–15.
68. Gorelik L, Lerner M, Bixler S, Crossman M, Schlain B, Simon K, et al. Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Ann Neurol*. 2010 Sep;68(3):295–303.

69. Bozic C, Richman S, Plavina T, Natarajan A, Scanlon JV, Subramanyam M, et al. Anti-John Cunningham virus antibody prevalence in multiple sclerosis patients: Baseline results of STRATIFY-1. *Annals of Neurology*. 2011;70(5):742–50.
70. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*. 2012 May 17;366(20):1870–80.
71. Trampe AK, Hemmelmann C, Stroet A, Haghikia A, Hellwig K, Wiendl H, et al. Anti-JC virus antibodies in a large German natalizumab-treated multiple sclerosis cohort. *Neurology*. 2012 May 29;78(22):1736–42.
72. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med*. 2003 Jul 10;349(2):139–45.
73. Kuhle J, Pohl C, Mehling M, Edan G, Freedman MS, Hartung H-P, et al. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2007 Jan 25;356(4):371–8.
74. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*. 2007 Sep;6(9):805–15.
75. Cai L, Huang J. Neurofilament light chain as a biological marker for multiple sclerosis: a meta-analysis study. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018 Sep 3;14:2241–54.
76. Gresle MM, Butzkueven H, Shaw G. Neurofilament Proteins as Body Fluid Biomarkers of Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Mult Scler Int*. 2011;2011:315406.
77. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci*. 2005 Jun 15;233(1–2):183–98.
78. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018 Oct;14(10):577–89.
79. Lobsiger CS, Cleveland DW. Neurofilaments: Organization and Function in Neurons. In: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press; 2009. p. 433–6.
80. Kuhle J, Plattner K, Bestwick JP, Lindberg RL, Ramagopalan SV, Norgren N, et al. A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS. *Mult Scler*. 2013 Oct;19(12):1597–603.
81. Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Filippo MD, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 Apr 9;jnnp-2018-320106.

82. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012 May;18(5):552–6.
83. Zetterberg H. Neurofilament Light: A Dynamic Cross-Disease Fluid Biomarker for Neurodegeneration. *Neuron*. 2016 Jul 6;91(1):1–3.
84. Bhan A, Jacobsen C, Myhr KM, Dalen I, Lode K, Farbu E. Neurofilaments and 10-year follow-up in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018 Sep;24(10):1301–7.
85. Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, Axelsson M, Khademi M, Gunnarsson M, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*. 2017 Nov 28;89(22):2230–7.
86. Håkansson I, Tisell A, Cassel P, Blennow K, Zetterberg H, Lundberg P, et al. Neurofilament levels, disease activity and brain volume during follow-up in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2018 Jul 18;15.
87. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain*. 2018 Aug 1;141(8):2382–91.
88. Quintana E, Coll C, Salavedra-Pont J, Muñoz-San Martín M, Robles-Cedeño R, Tomàs-Roig J, et al. Cognitive impairment in early stages of multiple sclerosis is associated with high cerebrospinal fluid levels of chitinase 3-like 1 and neurofilament light chain. *Eur J Neurol*. 2018;25(9):1189–91.
89. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017 Jun;81(6):857–70.
90. Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, Brundin L, Norgren N, Koel-Simmelink MJA, et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009 Apr 14;72(15):1322–9.
91. Lycke J, Karlsson J, Andersen O, Rosengren L. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998 Mar;64(3):402–4.
92. Malmeström C, Haghighi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology*. 2003 Dec 23;61(12):1720–5.
93. Kuhle J, Barro C, Disanto G, Mathias A, Sonesson C, Bonnier G, et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler*. 2016;22(12):1550–9.

94. Siritho S, Freedman MS. The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009 Apr 15;279(1-2):21-5.
95. Norgren N, Rosengren L, Stigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res.* 2003 Oct;987(1):25-31.