Slobodni laki lanci imunoglobulina u likvoru i serumu bolesnika s klinički izoliranim sindromom

Ćurlin, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:709788

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARINA ĆURLIN

SLOBODNI LAKI LANCI IMUNOGLOBULINA U LIKVORU I SERUMU BOLESNIKA S KLINIČKI IZOLIRANIM SINDROMOM

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARINA ĆURLIN

SLOBODNI LAKI LANCI IMUNOGLOBULINA U LIKVORU I SERUMU BOLESNIKA S KLINIČKI IZOLIRANIM SINDROMOM

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Nada Vrkić
Vanja Bašić Kes

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

MARINA ĆURLIN

FREE LIGHT IMMUNOGLOBULIN CHAINS IN CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM IN PATIENTS WITH CLINICALLY ISOLATED SYNDROME

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Nada Vrkić
Vanja Bašić Kes

Zagreb, 2019

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za kemiju te Klinici za neurologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ .

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici ***prof. dr. sc. Nadi Vrkić****, izuzetnoj osobi na usmjeravanju, pomoći i prije svega na moralnoj potpori tijekom izrade i pisanja ovog rada. Svojim dobronamjernim savjetima, konstruktivnom kritikom i izvrsnim idejama doprinijela je istraživanju i izradi ove disertacije.*

Zahvaljujem i svojoj komentorici ***prof. dr. sc. Vanji Bašić Kes*** *na stručnim savjetima, strpljenju i razumijevanju pri izradi ove doktorske disertacije.*

Veliko hvala svim djelatnicima Kliničkog zavoda za kemiju te Klinike za neurologiju KBC Sestre milosrdnice, posebno kolegici ***bacc. med. lab. dg. Sanji Brajković*** *bez koje tehnički dio ne bi bio zadovoljen.*

Zahvaljujem i ***prof. dr. sc. Ljerki Ostojić*** *koja mi je ukazala povjerenje i bila velika potpora u ovom cjelokupnom projektu.*

Zahvaljujem ***prof. dr. sc. Zori Pilić*** *na pomoći u nabavci kemikalija i materijala za izradu ove doktorske disertacije.*

Veliko hvala ***prof. dr. sc. Mili Bošnjaku*** *na savjetima i stručnoj pomoći u statistici.*

Zahvaljujem i mojoj obitelji, a posebice ***roditeljima Ivanu i Vesni*** *koji su me tijekom niza godina s jednakim žarom, ljubavlju i poticanjem pratili i usmjeravali od prve stepenice mog školovanja te bili podrška u svakom segmentu mog života.*

Konačno, i najvažnije, zahvaljujem mom ***suprugu Anti*** *kojem i posvećujem ovu disertaciju jer je neiscrpni izvor moje snage i pozitivne energije, potpora koju mi je davao tijekom studija i izrade disertacije je neprocjenjiva i nemjerljiva, bez njega ne bih došla do ove faze moga života, a samo s njim svaki trud i žrtva ima smisao.*

Zahvaljujem Bogu za sve navedene, ali i one koje nisam spomenula, bez njih bi ovo bila samo crtica u životopisu, s njima sve ima drugi smisao.

SAŽETAK

Multipla skleroza (MS) je kronična upalna bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS), a prvi napad bilježi se kao klinički izolirani sindrom (CIS). Dijagnostika uključuje u prvom redu nalaz magnetske rezonancije (MR) te dokazivanje intratekalne sinteze oligoklonskih IgG vrpci metodom izoelektričnog fokusiranja (IEF) s imunofiksacijom. Novija istraživanja pokazala su da likvor takvih bolesnika sadrži visoku koncentraciju slobodnih lakih lanaca, osobito kapa tipa (KFLC, *engl. kappa free light chain).*

Svrha istraživanja bila je ispitati dijagnostičku i prediktivnu vrijednost određivanja slobodnih lakih kapa lanaca u cerebrospinalnoj tekućini (CSF) u usporedbi s kvalitativnim postupkom određivanja oligoklonskih vrpci (OB, *engl. oligoclonal bands*) u pacijenata s CIS-om koji su kroz dvije godine konvertirali u MS.

U 151 pacijenta primljenih na Klinici za neurologiju sa sumnjom na CIS mjereni su imunonefelometrijskom metodom KFLC, ukupni IgG i albumin u CSF-u i serumu, izračunati kvocijenti CSF/serum (Q_{KFLC}, Q_{IgG} i Q_{Alb}) i indeksi $KFLC_{indeks}$ (Q_{KFLC}/Q_{Alb}) te IgG_{indeks} (Q_{IgG}/Q_{Alb}) u odnosu na albumin, te je izoelektričnim fokusiranjem s imunofiksacijom procijenjeno prisustvo OB-a. Na temelju kliničke slike, OB-a i magnetske rezonancije (MR) 50 pacijenata svrstano je u ostale neurološke bolesti (ONB), a 101 u CIS od kojih je 50 konvertiralo u MS (D-MS) unutar 2 godine. Analizom i usporedbom ROC (*engl. Receiver Operating Characteristic*) krivulja te usporedbom medijana KFLC parametara tražena je optimalna granična vrijednost u odnosu na dijagnozu CIS-a i konverziju u MS. ROC analiza za točnost detekcije intratekalne sinteze pokazala je najbolje rezultate za Q_{KFLC} s površinom ispod krivulje (AUC *engl. Area under curve*) od 0,891 uz graničnu osjetljivost od 0,027 s dijagnostičkom osjetljivošću od 73,2 % i specifičnošću od 96,0 %. Dijagnostička točnost $KFLC_{indeksa}$ za konverziju CIS-a u MS pokazala je AUC 0,840 i graničnu vrijednost 9,092. Vrijednosti Q_{KFLC} ispod 0,0148 i iznad 0,0270 upućuju da nije potrebno raditi metodu IEF-a s imunofiksacijom za dokazivanje OB-a. Vrijednost $KFLC_{indeksa}$ manja od 4,44 ne upućuje na konverziju u MS unutar dvije godine dok vrijednost $KFLC_{indeksa}$ iznad 104,54 upućuje na moguću dijagnozu MS. Primjena KFLC parametara mogla bi poslužiti kao pretražna metoda, a OB bi se mogao koristiti samo u nerazjašnjenim kliničkim slučajevima. KFLC parametri u bolesnika koji su konvertirali u MS značajno su viši te svojom prediktivnom ulogom mogu pridonijeti ranoj dijagnozi i pravodobnoj terapiji.

Ključne riječi: slobodni laki kapa lanci, multipla skleroza, klinički izolirani sindrom, oligoklonske IgG vrpce, izoelektrično fokusiranje, imunofiksacija

SUMMARY

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) caused by an autoreactive lymphocite-mediated inflammatory autoimmune disorder, with the first relapse recorded as clinically isolated syndrome (CIS). Other diseases of the CNS have similar symptoms and a reliable differential diagnostic is lacking. The diagnostic primarily includes MRI findings and demonstration of intrathecal synthesis of oligoclonal IgG bands with a qualitative method of isoelectric focusing with immunofixation. The evaluation of intrathecal synthesis with the qualitative determination of oligoclonal immunoglobulin G bands supports the diagnostic of clinically isolated syndrome (CIS) and prediction of conversion to multiple sclerosis (MS). Recent studies have shown high concentrations of free light chains in CSF in these patients, especially kappa type. Determination of free light chains in CSF and serum, and their ratio (kappa quotient) with an immunonephelometric method, could be a more reliable and precise diagnostic and prognostic marker wherefore quantification of KFLC IgG could represent a possible alternative method which could be standardized and become an objective laboratory component in the diagnostic algorithm in these patients.

Objective: The objective of the study was to evaluate diagnostic and predictive value of determination of KFLC in CSF compared to the qualitative procedure of OB in patients with CIS who have converted to MS during a two-year period.

Methods: For 151 patients with suspected CIS, who were admitted to Clinic of Neurology, concentrations of KFLC, total IgG and albumin in CSF and serum were measured by an immunonephelometric method. CSF/serum quotients (Q_{KFLC}, Q_{IgG} and Q_{Alb}) and indices were also calculated with regards to albumin, and the presence of OB was assessed with isoelectric focusing. Based on the clinical picture, OB and MRI findings, 50 patients were classified as „other neurological diseases (OND)“ and 101 patients were classified as CIS, 50 of which converted to MS (D-MS) in a two-year period. An optimal cut-off was determined with analysis and comparison of ROC curve, and with median comparison of KFLC parameters, with regards to CIS diagnosis and conversion to MS.

Results: The median for $KFLC_{CSF}$ was 2.01 mg/L in MS group as opposed to 0.68 mg/L and 0.17 mg/L for CIS and OND group, respectively. $KFLC_{index}$ was 33.52 mg/L for MS group as opposed to 9.68 mg/L for CIS and 3.71 mg/L for OND group ($p < 0,0001$). ROC analysis for accuracy of intrathecal synthesis detection for Q_{KFLC} showed AUC of 0.891 and cut-off of 0.027 (sensitivity 73.2 % and specificity 96.0 %; +PV 97.4 %). The diagnostic accuracy of

$KFLC_{index}$ for conversion of CIS to MS showed AUC of 0.840 and cut-off of 9.092 (sensitivity 90.0 %, specificity 73.3 %; -PV 93.7 %). Life age significantly correlates with KFLC in serum ($r=0.34$; $p < 0.0001$) and through aging process, lower KFLC indices can be expected, such as possibility of false negative diagnoses. Q_{KFLC} values could be used in screening for demonstration of intrathecal synthesis and its values below 0.0148 and above 0.0270 indicate needlessness for a qualitative, technically demanding method of IEF with immunofixation for demonstration of OB. $KFLC_{index}$ value below 4.44 in patients with CIS does not indicate conversion to MS inside a two-year period while values of $KFLC_{index}$ above 104.54 are very indicative of this diagnosis.

Conclusion: With regard to the gold standard, KFLC parameters did not show significantly higher accuracy in detection of intrathecal synthesis, but Q_{KFLC} could be used as a screening tool in detection of intrathecal synthesis and could reduce determination of OB with a technically demanding IEF method with immunofixation for 65%. $KFLC_{index}$ showed diagnostic value for CIS and MS, and patients with $KFLC_{index}$ value above 4.44 could promptly be given therapy. The application of KFLC parameters could serve as a screening method, and OB could be used in undefined clinical cases only. KFLC parameters are significantly higher in patients who converted to MS, and can contribute to an early diagnosis and prompt therapy with their predictive role.

Key words: free light kappa chains, multiple sclerosis, clinically isolated syndrome, oligoclonal IgG bands, isoelectric focusing, immunofixation

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Anatomija središnjeg živčanog sustava 1
1.1.1. Cerebrospinalna tekućina 1
1.2. Multipla skleroza 5
1.2.1. Patofiziologija 6
1.2.2. Klinička slika 7
1.3. Klinički izolirani sindrom 10
1.3.1. Radiološki izolirani sindrom 11
1.4. Dijagnostika multiple skleroze 14
1.4.1. Magnetna rezonancija 15
1.4.2. Laboratorijska dijagnostika 20
1.4.2.1. Očuvanost krvno-likvorske barijere 21
1.4.2.2. Intratekalna sinteza proteina 23
1.4.2.3. Matematički model za procjenu očuvanosti krvno-likvorske barijere i intratekalne sinteze 25
1.4.2.4. Dokazivanje oligoklonskih imunoglobulina u likvoru 27
1.4.2.5. Slobodni laki lanci imunoglobulina u krvi i likvoru 30
1.4.2.6. Imunosni odgovor na neurotropne viruse i Borreliu Burgdorferi 32
1.5. Ukratko o ulozi laboratorija u dijagnostici, predikciji i prognozi multiple skleroze 34
2. OBRAZLOŽENJE TEME 35
2.1. Ciljevi i hipoteze 35
3. ISPITANICI I METODE 36
3.1. Ispitanici 36
3.1.1. Protokol prikupljanja uzoraka 37
3.2. Metode 39
3.2.1. Magnetska rezonancija 39
3.2.2. Metode za biokemijske i hematološke analize u krvi 40
3.2.3. Metode za biokemijske i hematološke analize u likvoru 41
3.2.4. Procjena očuvanosti krvno-likvorske barijere 41
3.2.5. Dokazivanje oligoklonskih imunoglobulina G 42
3.2.6. Ispitivanja na neurotropne viruse 42
3.2.7. Određivanje koncentracije slobodnih kapa lakih lanaca IgG 43
3.2.8. Statističke metode 44

4. REZULTATI 46
4.1. Biokemijske i hematološke analize u krvi i likvoru 46
4.2. Očuvanost krvno-likvorske barijere 50
4.3. Ukupni, oligoklonski i slobodni laki lanci imunoglobulina G u krvi i likvoru 51
4.4. ASI kvocijent za neurotropne viruse i Borreliju Burgdorferi 52
4.5. Nalazi magnetske rezonancije 53
4.6. Usporedbe i korelacije 54
4.7. Dijagnostička točnost imunoglobulinskih parametara 59
4.8. Matematički model za predviđanje konverzije klinički izoliranog sindroma 64
5. RASPRAVA 67
5.1. Valjanost slobodnih kapa lakih lanaca IgG-a u procjeni intratekalne sinteze 67
5.2. Dijagnostička vrijednost slobodnih kapa lakih lanaca IgG 72
5.3. Predviđanje konverzije klinički izoliranog sindroma u multiplu sklerozu 76
6. ZAKLJUČCI 79
7. LITERATURA 80
8. POPIS KRATICA 93
9. ŽIVOTOPIS 95

1. UVOD

1.1. Anatomija središnjeg živčanog sustava

Središnji živčani sustav (SŽS) je najsloženiji organ ljudskog tijela koji se sastoji od mozga i kralježničke moždine. Mozak je izuzetno složen u svojim različitim anatomskim regijama te vrlo osjetljiv i na male žarišne ozljede koje mogu dovesti do potpunog ispada određene funkcije kao što su govor, vid, ravnoteža i motorika. SŽS je zaštićen čvrstim koštanim oklopom, vezivnim ovojnicama (*pia mater, arachnoidea mater, dura mater*), cerebrospinalnim likvorom i serijom anatomskih i funkcionalnih barijera. Cerebrospinalna tekućina (CSF, *engl. cerebrospinal fluid*) pruža mehaničku zaštitu mekom moždanom tkivu i služi očuvanju njegove homeostaze. Specijalizirane stanice koje tvore sustav krvno-moždane barijere (KMB) i krvno-likvorske barijere (KLB) odvajaju SŽS od periferije (1).

1.1.1. Cerebrospinalna tekućina

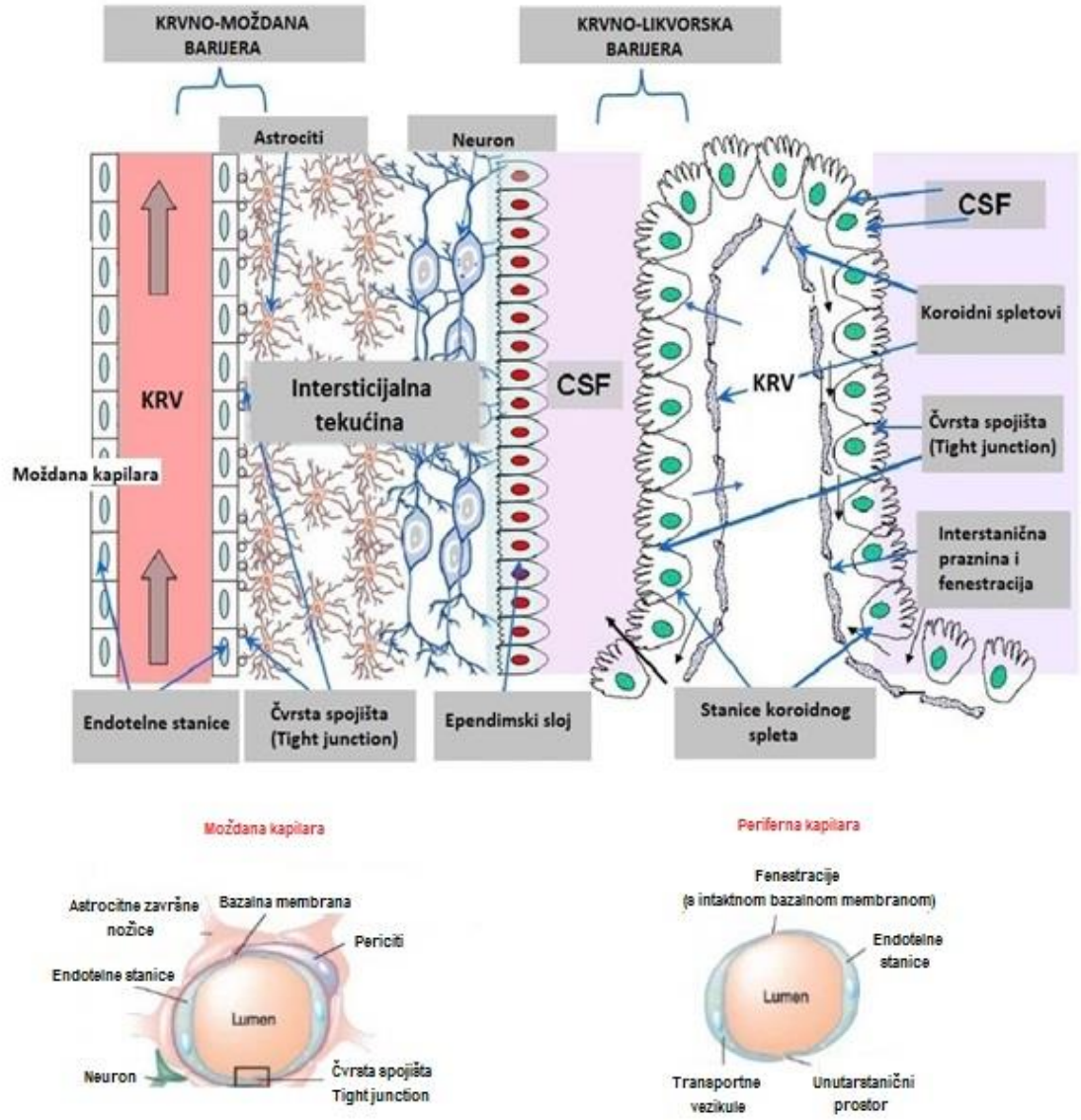
CSF, odnosno likvor, bistra je bezbojna tekućina koja ispunjava moždane komore, središnji kanal kralježničke moždine, te prostore između *pia mater* i *arachnoidea mater* (subarahnoidni prostor). Moždanih komora ima četiri od kojih su prva i druga smještene lateralno, treća razdvaja međumozak, a četvrta je šupljina između malog mozga i moždanog debla koji povezuje mali mozak s kralježničkom moždinom. Unutar svake moždane komore nalazi se koroidni splet (*plexus choroideus)* (1). Koroidni spletovi smješteni u lateralnim komorama te u krovu treće i četvrte moždane komore, procesima sekrecije i filtracije stvaraju 70 % CSF-a (2), dok ostatak CSF-a potječe od izvanstanične tekućine mozga koja difuzijom ulazi u likvorske prostore kroz ependim, pija-glijalnu membranu na površini mozga i kroz perivaskularne prostore (3). Kroz tri otvora četvrte moždane komore većina CSF-a dospijeva u veliku cisternu *(cisterna magna),* koja je povezana sa subarahnoidnim prostorom koji okružuje cijeli mozak i kralježničku moždinu. Najveći dio CSF-a se apsorbira preko arahnoidnih resica, koje tvore arahnoidne granulacije, u venske sinuse ovojnice *dura mater*. Sinusi *dure* ispunjeni su krvlju (1, 4).

Koroidni pleksus je splet krvnih žila koji je prekriven tankim slojem epitelnih stanica. Lučenje tekućine iz koroidnog pleksusa ovisi o aktivnom prijenosu natrijevih iona kroz epitelne stanice koje oblažu vanjsku površinu pleksusa. Natrijevi ioni za sobom vuku veliku količinu kloridnih iona jer pozitivni naboj natrijevih iona privlači negativni naboj kloridnih

iona, što povećava količinu osmotski aktivnog natrijevog klorida u CSF-u. Zbog stvorenog osmotskog gradijenta između krvi i CSF-a, dolazi do pasivnog ulaska vode u likvorske prostore (4).

CSF je bistra, bezbojna tekućina koja se neprekidno stvara i reapsorbira pa se cjelokupni volumen CSF-a izmijeni 3-4 puta tijekom 24 sata (1). Ukupni volumen CSF-a u odraslih osoba iznosi između 140 i 150 mL (4, 5, 6). U moždanim komorama se nalazi oko 30-40 mL, 30 mL oko kralježničke moždine te 70-80 mL u subarahnoidnom prostoru oko mozga (7). CSF i mozak imaju približno istu gustoću, pa se smatra da mozak jednostavno lebdi u tekućini. Najvažnija zadaća CSF-a je da štiti mozak od krutog prostora (4). Osim mehaničke zaštite koju pruža mekom moždanom tkivu, CSF ima važnu ulogu i u raznošenju različitih bioaktivnih tvari. Svojstva CSF-a su sljedeća: osmotski tlak je približno jednak onom u plazmi, koncentracija natrijevih iona također je približno jednaka onoj u plazmi, koncentracija klorida je oko 15 % veća nego u plazmi, kalija oko 40 % manja, a glukoze oko 30 % manja (4). Koncentracije nekih važnih sastojaka CSF-a nisu iste kao u izvanstaničnoj tekućini drugdje u tijelu. Mnoge velike molekule teško prelaze iz krvi u CSF ili u međustaničnu tekućinu mozga. Sastav CSF-a nadziru procesi koji omogućuju izmjenu tvari između mozga, krvi i CSF-a, a najvažniju ulogu u tome imaju KMB i KLB. KMB i KLB su veoma propusne za vodu, ugljikov dioksid, kisik i većinu tvari topljivih u lipidima. Slabo su propusne za elektrolite poput natrija, kalija i klorida, a gotovo posve nepropusne za plazmatske proteine i većinu velikih organskih molekula netopljivih u mastima (4). KMB čine endotelne stanice moždanih kapilara koje su jedna s drugom usko povezane čvrstim spojištima, pa među njima nema mnogo pukotinastih pora kao u većini ostalih kapilara u tijelu. Čvrsta spojišta (*engl. tight junctions*) među endotelnim stanicama podržavaju završne nožice (*engl. end feet*) astrocita. Iz ovakve strukture endotelnih stanica moždanih kapilara proizlazi i njihova osnovna funkcionalna karakteristika koja podrazumijeva izrazito nizak unutarstanični prolaz makromolekula, staničnih elemenata, ali i različitih patogenih klica (1).

Na određenim mjestima nabori meke moždane opne *pia mater* strše u moždane komore i tvore koroidne spletove (8). Vezivno tkivo *pia mater* prekriveno je jednoslojnim kubičnim epitelom, podrijetlom iz ependimskih stanica koje oblažu površinu moždanih komora. Svojim apikalnim dijelom koroidne stanice su spojene čvrstim spojevima i time čine morfološku osnovu KLB-a. Čvrsti spoj koji spaja rubove endotelnih stanica dubokih moždanih kapilara i apikalna područja koroidnog epitela čine morfološku osnovu KMB-a odnosno KLB-a. Upravo ove dvije barijere imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze u mozgu (Slika 1.) (9).



Slika 1. *Prikaz KMB-a i KLB-a; adaptirano prema (10, 11).*

Prikazane su dvije glavne imunosne barijere, KMB i KLB. Osnovu KMB-a čini čvrsta veza što spaja rubove endotelnih stanica moždanih kapilara bez fenestracija i s vrlo malim brojem citoplazmatskih vezikula. Endotelne stanice ojačane su pericitima i bazalnom membranom. Završne nožice astrocita pokrivaju abluminalnu površinu bazalne membrane i samim tim podržavaju čvrstu vezu među endotelnim stanicama. Osnovu KLB-a čini čvrsti spoj koji spaja apikalne dijelove epitelnih stanica koroidnog spleta. Koroidni splet ima fenestrirane kapilare. S obzirom da tvari iz krvi prolaze kroz fenestrirane endotelne stanice kapilara u koroidnom spletu, KLB u epitelu koroidnog spleta ima važnu ulogu u kontroli ulaska tvari iz krvi u CSF. Za razliku od moždanih kapilara, endotelne stanice kapilara koroidnog spleta su povezane slabijim vezama (9, 10, 11). KMB - krvno-moždana barijera; KLB - krvno-likvorska barijera

Između CSF-a i izvanstanične tekućine moždanog tkiva nema barijera pa tvari slobodno difundiraju između tih odjeljaka. Zbog toga CSF može poslužiti kao „ogledalo“ SŽS-a (1).

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

Likvorska dijagnostika se počela razvijati nakon što je Quincke 1891. godine uveo lumbalnu punkciju koja se i danas izvodi (12). Normalni CSF je gotovo acelularna tekućina koju čini uglavnom voda (99 %), ali također sadrži puno soli i malu količinu proteina (13). Po svom kemijskom sastavu sličan je serumu, ali se koncentracije pojedinih tvari uvelike razlikuju, kao što su koncentracije proteina i ostalih makromolekula. Iako su koncentracije ukupnih proteina u CSF-u vrlo niske u odnosu na serum (od 200-300 puta niže), što je posljedica otežanog prolaza makromolekula iz krvi kroz zdravu KMB i KLB, procjenjuje se da je 80 % proteina u CSF-u krvnog podrijetla, a 20 % ih se dodatno stvara unutar SŽS-a što predstavlja intratekalnu sintezu. 1-2 % proteina u CSF čine tzv. nervno-specifični proteini. Ulazak plazmatskih proteina u CSF kroz sustav barijera ovisi o veličini proteina, odnosno o hidrodinamskom volumenu makromolekula, gdje u većini slučajeva hidrodinamski radijus korelira s molekulskom masom proteina. Stoga kroz zdravu barijeru može proći oko 1 od 200 molekula albumina, odnosno 1 od 3000 molekula imunoglobulina (Ig, *engl. immunoglobulin*) IgM (1). U početku, likvorska dijagnostika je bila ograničena na morfološke pretrage i ispitivanje proteina, no danas se znatno proširila i nezaobilazna je u dijagnostici i praćenju bolesti SŽS-a. Nagli razvoj osjetljivih i specifičnih analitičkih postupaka proširio je paletu različitih pretraga koje se mogu odrediti u CSF-u, međutim pri interpretaciji nalaza uvijek treba uzeti u obzir da je riječ o vrlo dinamičnom sustavu čiji se sadržaj može mijenjati iz sata u sat. Lumbalna punkcija nije bezazlen dijagnostički postupak te moraju postojati čvrste kliničke indikacije za njezinu primjenu (1). U postavljanju dijagnoze, likvorska dijagnostika ponekad ima ključnu ulogu te je nikakve slikovne tehnike kao što su kompjuterska tomografija (CT, *engl. computed tomography*) i magnetna rezonancija (MR, *engl. magnetic resonance imaging*) ne mogu zamijeniti (14).

1.2. Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS, *engl. multiple sclerosis*) je definirana kao kronična, autoimuna, upalna, demijelinizacijska i degenerativna bolest SŽS-a (15, 16). MS se prezentira u nekoliko različitih oblika: primarno progresivni, relapsno remitirajući, relapsno progresivni i sekundarno progresivni fenotip. U prvoj fazi bolesti prevladava demijelinizacijska upala, a u kasnijoj fazi se javlja neurodegeneracija postupnim ireverzibilnim oštećenjem. Demijelinizacijska upala se očituje oštećenjem mijelinske ovojnice živčanog vlakna, samog aksona, oligodendrocita koji stvaraju mijelinsku ovojnicu. U 70 % bolesnika javlja se u dobi od dvadesete do četrdesete godina života i predstavlja vodeći uzrok onesposobljenosti kod mladih ljudi. Žene obolijevaju češće od muškaraca te se smatra da žene imaju raniji početak bolesti, nižu prevalenciju primarno progresivnog tijeka bolesti i sporiju progresiju invaliditeta od muškaraca. Iako još uvijek nema sigurnih i opće prihvaćenih epidemioloških podataka prevalencije MS-a u svijetu, prevalencija bolesti je u porastu, a uzrok tomu mogu biti i čimbenici vezani za nove dijagnostičke kriterije koji omogućavaju ranije postavljanje dijagnoze. Epidemiološka istraživanja u MS-u ukazuju da bolest nastaje međudjelovanjem genskih i okolišnih čimbenika. Kod genskih čimbenika važna je povezanost MS-a s HLA klase II genima na 6. kromosomu osobito za DR2 (HLA DRB1*1501 i DQB*0602), a pokazan je i utjecaj HLA klase I gena na rizik za MS (HLA-A*0301). Važnost HLA sustava sastoji se u činjenici da klasa I HLA alela (A, B, C) prezentiraju antigene za CD8 tip T-limfocita, a klasa II HLA alela (DP, DM, DOA, DQ i DR) za CD4 tip T-limfocita. Obje vrste limfocita, CD8 i CD4, uključeni su u patogenezu MS-a. Bez obzira na intenzivna istraživanja, gen odgovoran za nastanak MS-a još uvijek nije utvrđen i najvjerojatnije se radi o poligenskom nasljeđivanju. Međutim, MS se ne može protumačiti samo genskom sklonošću, već značajnu ulogu imaju i čimbenici okoline. Od okolišnih čimbenika važnu ulogu imaju Epstein-Barrov Virus (EBV), izloženost UV zračenju i vitamin D. Infekcija je jedna od mogućih okolišnih čimbenika koja doprinosi razvoju MS-a, te izlaganje što većem broju infekcija u djetinjstvu djeluje zaštitno na razvoj MS u odrasloj dobi. Mogući uzrok je neurotropni virus koji uzrokuje demijelinizacijska oštećenja. Veći postotak bolesnika s MS-om seropozitivan je na EBV, te seronegativan EBV povezan je sa smanjenim rizikom od MS-a. Od ostalih infektivnih čimbenika istražen je humani herpes virus 6 (HHV6), Herpes Simplex 1 i 2 (HSV tip 1 i tip 2), varicella zoster, citomegalovirus (CMV), Chlamydia pneumoniae, ali ni jedan od ovih ispitivanih virusa nije se pokazao uzročnikom MS-a. Osim infekcije, od ostalih okolišnih čimbenika ispitan je i učinak vitamina D na rizik za razvoj

MS-a, gdje povišene koncentracije vitamina D ili uzimanje vitamina D su povezane s nižim rizikom od razvoja MS-a. Također se smatra da vitamin D ima važnu ulogu u pojavljivanju više autoimunih bolesti, pa tako i u MS-u (17).

1.2.1. Patofiziologija

Dokazano je da su infiltracija upalnih stanica, demijelinizacija i aksonska degeneracija osnovni patološki mehanizmi koji uzrokuju kliničke manifestacije MS-a. Aktiviranje autoimune upale koja dovodi do oštećenja strukture mijelinske ovojnice živčane stanice na koje se najčešće nadovezuje oštećenje aksona nastaje djelovanjem još neidentificiranog okolišnog čimbenika na genski predisponiranu osobu (18, 19). U SŽS-u su upravo oligodendrociti ti koji formiraju mijelin produživanjem i spiralnim omotavanjem izdanka svojih staničnih membrana oko živčane stanice, pa tako živčana stanica sadrži mnogobrojne kratke mijelinizirane segmente koji su odvojeni pukotinama, tj. Ranvierovim čvorovima. Budući da oligodendrocit može formirati i do stotinjak mijeliniziranih segmenata, smrt jednog oligodendrocita ima veće posljedice za provođenje električnog impulsa nego smrt Schwannove stanice. Na mjestu demijelinizacije živčanog vlakna dokazane su promjene u samoj strukturi aksona, ali i organizaciji molekula na njegovoj površini. Primijećeno je da u ranim aktivnim lezijama dolazi do zadebljanja demijeliniziranih internodalnih segmenata koje se povezuju s povećanom propusnošću aksoleme i modificiranim aksonalnim citoskeletnim proteinima. U kroničnim lezijama dolazi do povećane reekspresije adhezijske molekule PSA-NCAM koja se pojavljuje samo u neuronima u ranom razvoju, a u odraslih je ograničena na mjesta trajne plastičnosti. Postoji mogućnost da ekspresija ove molekule pridonosi slabijoj remijelinizaciji kroničnih plakova zbog prekida interakcije oligodendrocita i aksona. Međutim, u nekim kronično demijeliniziranim aksonima ipak postoji provođenje impulsa, iako je ono usporeno, što upućuje na preraspodjelu, odnosno umnažanje natrijskih kanala uzduž internodalnog prostora poslije demijelinizacije (19). Odavno je poznata činjenica da oštećenje i gubitak aksona spada u važnu značajku patologije MS-a. Dok je autoimuni upalni proces uglavnom razjašnjen, neurodegenerativni još uvijek nije. Donedavno je smatrano da neurodegeneracija slijedi nakon autoimune upalne faze, ali je u zadnje vrijeme, koristeći suvremenije dijagnostičke pretrage, ustanovljeno da i jedan i drugi proces teku od samog početka bolesti s tim da je upalni proces dominantniji na početku, a neurodegenerativni sve izrazitiji u kasnijoj fazi oboljenja. Upalni proces započinje proliferacijom, aktivacijom i ulaskom autoreaktivnih T-limfocita u cirkulaciju. Aktivirani T-limfociti uzrokuju promjenu

endotela (ekspresija adhezijskih molekula) KLB-a nakon čega dolazi do njihovog ulaska u SŽS. U tom procesu sudjeluje niz različitih molekula, kao i kemokini koji privlače upalne stanice, adhezijske stanice koje omogućavaju imunoendotelijalnu interakciju, te metaloproteinaze koje omogućuju migraciju imunosnih stanica parenhimom SŽS-a (20-22).

Nastalom upalnom reakcijom dolazi do oštećenja mijelinskog omotača, a dijelom i samog aksona. Na mjestu oštećenja nastane akutna, a potom kronična demijelinizacijska lezija ili plak. U ranoj fazi nastanka, lezije se patomorfološki sastoje od perivaskularne infiltracije (limfocita i makrofaga) uz demijelinizirani dio aksona. Starije lezije pokazuju degenerativne promjene samog aksona.

Do nedavno je smatrano da su lezije raspoređene samo u bijeloj masi cerebralnih hemisfera, u *cerebellumu, medulli spinalis* i očnom živcu, a danas je poznato da je oko 25 % lezija smješteno u dubokim sivim masama i kori mozga, čak i unutar retine. Osnovna karakteristika lezija u MS-u je tzv. pojava širenja u vremenu i prostoru, što je u skladu s kliničkom slikom i tijekom oboljenja (23).

1.2.2. Klinička slika

Postavljanje dijagnoze MS-a započinje s pacijentom koji ima smetnje, odnosno simptome karakteristične za MS. Ako su simptomi i slikovni nalazi tipični za MS, kliničar mora primijeniti odgovarajuće dijagnostičke kriterije, a ako su atipični, potrebno je upotrijebiti i alternativne metode (24). Atipični simptomi označavaju alternativnu dijagnozu za MS te uključuju simptome koji ukazuju na druge neurološke bolesti ili na medicinski neobjašnjene simptome. Pojam „crvena zastavica“ (*engl. red flag*) koristi se u procjeni kod dijagnoza koje ne upućuju na MS. Skupina za magnetnu rezonanciju u multiploj sklerozi (MAGNIMS, *engl. Magnetic Resonance Imaging in Multiple Sclerosis*) opisala je te crvene zastavice te ih klasificirala prema značajnosti kod alternativnih dijagnoza za MS (25). Simbol velike crvene zastavice pruža jak dokaz za dijagnozu koja isključuje MS, kao što su koštane lezije, uključenost pluća i bubrega, srčana bolest, periferalne neuropatije, miopatija, retinopatija, *diabetes insipidus* itd. Simbol srednje velike crvene zastavice može predstavljati alternativnu dijagnozu no ujedno može biti i dosljedan MS-u. Simbol srednje velike zastavice uključuje stanja kao hidrocefalus, gubitak sluha, simetrično distribuirane lezije, neuropsihijatrijski sindrom i druga. Simbol male crvene zastavice može se pojaviti kod pacijenata kojima je tek dijagnosticiran MS te se pojavljuje u stanjima kao što su sindrom moždanog debla, mijelopatije, velike lezije (26, 27).

Tipični klinički simptomi MS-a karakterizirani su diseminacijom bolesti u prostoru (DIS, *engl. dissemination in space*) koje iziskuju uključivanje multiplih područja u SŽS-u i diseminaciju bolesti u vremenu (DIT, *engl. dissemination in time*) koja znači proučavanje aktivnosti bolesti u vremenu (24). Oni uključuju osjetne poremećaje kao što su parestezije, disestezije, hipoestezije, motoričke simptome, optički neuritis, ataksiju, vrtoglavicu, disartriju, disfagiju, kao i kognitivne poremećaje i poremećaje kontrole sfinktera. Zbog pojačane mehanoreceptivnosti i efaptičkog provođenja impulsa uzrokovanih demijelinizacijom, javljaju se i paroksizmalni simptomi kao miokimije, spazmi mišića, trigeminalna neuralgija, Lhermitteov simptom i znak koji podrazumijeva osjećaj prolaženja struje niz leđa ili ekstremiteta pri nagloj fleksiji glave te drugi simptomi (28). Simptomi kod pacijenata s MS-om su raznoliki i nepredvidljivi, međutim bolest ipak pokazuje određene pravilnosti ako se prati kroz duže vremensko razdoblje, tako da većinu bolesnika možemo svrstati u jednu od četiri glavne skupine (29):

1. Relapsno remitirajući oblik MS-a - Većina pacijenata s dijagnosticiranom MS (80-85 %) ima relapsno remitirajući klinički oblik koji je karakteriziran epizodama žarišnih neuroloških ispada (relaps), nakon kojih slijedi spontani ili terapijom potpomognuti potpuni oporavak (remisija) (24, 30). Učestalost napada i trajanje remisije varira od bolesnika do bolesnika. Kriterij za postavljanje dijagnoze uključuju napad, relaps i egzacerbaciju, a početna prezentacija naziva se i klinički izolirani sindrom (CIS, *engl. clinically isolated syndrome*) (24). Ponavljanjem novih epizoda upalne demijelinizacije i sve intenzivnijim oštećenjem aksona nastaju trajni neurološki poremećaji koji se postupno gomilaju stvarajući sve teže neurološke ispade. Smanjenje broja novih egzacerbacija, ali daljnja progresija bolesti, označuje prijelaz relapsno remitirajućeg u sekundarno-progresivni oblik bolesti (30). Tijekom određenog vremenskog perioda relapsno remitirajući MS se može klasificirati kao neaktivan ili aktivan i to ako pacijent klinički ima epizodu novih i pogoršanje starih neuroloških ispada ili su mu utvrđeni znakovi aktivnosti bolesti na MR-u mozga (31).

2. Sekundarno progresivni MS - Oko 50 % pacijenata s relapsno remitirajućim MS-om nakon 10 godina i 90 % pacijenata nakon 25 godina bolesti, prijeđe u sekundarno progresivni oblik (32). Sekundarno progresivni oblik MS-a označava progresivnu akumulaciju onesposobljenosti nakon početnog relapsno remitirajućeg tijeka bolesti (33). Relapsi su manje česti, ali je onesposobljenost pacijenta značajna, te je rezultat sveukupnog stupnja aksonalnog oštećenja u SŽS-u (34). Pacijenti se najčešće žale na pogoršanje hoda, ravnoteže, spastičnosti i kontrole mokraćnog mjehura (24).

3. Primarno progresivan oblik MS-a - Primarno progresivni oblik MS-a prisutan je u oko 10-15 % pacijenata. Karakteriziran je podmuklim početkom smetnji koje se postupno pogoršavaju tijekom vremena (24). Progresivni tijek može imati i epizode stagnacije, pa i manje regresije neuroloških ispada, no nakon njih ponovno slijedi daljnje pogoršanje bolesti (28). Klinički se bolest najčešće prezentira kao progresivna mijelopatija, a rjeđe kao sindrom moždanog debla ili kralježničke moždine. Ovaj oblik MS-a karakteriziran je otežanim hodom, smetnjama ravnoteže, spastičnošću, slabošću i gubitkom kontrole sfinktera dok su senzorni simptomi rjeđi nego kod relapsno remitirajućeg oblika (24).

Oba progresivna oblika bolesti mogu biti aktivna (ako su prisutni relapsi bolesti) ili neaktivna, te progresivna ako je prisutno progresivno pogoršanje simptoma ili bez progresije zbog čega ih dijelimo u četiri podgrupe: aktivna s progresijom, aktivna bez progresije, neaktivna s progresijom, neaktivna bez progresije (31, 35).

4. Progresivno relapsirajući MS - Progresivno relapsni oblik može predstavljati i podtip primarno progresivnog MS-a. Vrlo mali broj oboljelih ima progresivni tijek bolesti od samog početka s povremenom pojavom akutnih relapsa (24).

Dodatni podtipovi MS-a također uključuju i (36):

1) CIS koji predstavlja prvu pojavu kliničkih simptoma koji ukazuju na MS

2) Radiološki izolirani sindrom (RIS, *engl. radiologically isolated syndrome*) koji predstavlja slučajan pronalazak tipične MS lezije na MR-u bez kliničkih simptoma

3) Benigni MS gdje i nakon 15 godina trajanja bolesti nema značajnijih neuroloških ispada

4) Maligni (fulminantni) MS koji je karakteriziran brzim progresivnim tijekom koji dovodi do teže invalidnosti ili smrti u kratkom vremenu nakon početka bolesti

5) Progresivni MS kojeg uzrokuje jedan napad te koji se smatra podtipom sekundarnog progresivnog MS-a u kojoj nakon jednog napada započinje progresivna faza

6) Tranzicijski MS koji odražava fazu tranzicije između relapsno remitirajuće MS i sekundarno progresivne MS

1.3. Klinički izolirani sindrom

CIS je pojam koji opisuje prvu epizodu čiji klinički i paraklinički nalazi ukazuju na MS. Mnogi pacijenti koji razviju MS prezentiraju se prvi put kao CIS (37, 38). Postoje pacijenti koji se prvi put prezentiraju tipičnim simptomima za CIS te još uvijek ne zadovoljavaju kriterije za relapsno remitirajući MS (24). Takvi pacijenti ostaju CIS sve dok se kriteriji za relapsno remitirajući MS ne zadovolje. CIS se odnosi na prvi klinički demijelinizirajući događaj u SŽS-u koji traje preko 24 h te je izoliran u vremenu, a može ili ne mora biti izoliran u prostoru. Budući da je CIS demijelinizirajući događaj u SŽS-u koji je izoliran u vremenu, kompatibilan je s mogućim budućim razvojem MS-a te njegovo rano dijagnosticiranje pomaže u odlukama pri liječenju. MR je trenutno najkorisniji alat za procjenu rizika. Istraživanja CSF-a i evociranih potencijala bi se također moglo koristiti za procjenu vjerojatnosti MS-a (39).

Također CIS se razlikuje od RIS-a u kojima pacijenti imaju slučajno uočena T2 svijetla žarišta na MR-u koja ukazuju na demijelinizaciju u odsutnosti kliničkih simptoma (40). Tipične prezentacije za CIS uključuju unilateralni optički neuritis, fokalni supratentorijalni sindrom, fokalni sindrom moždanog debla ili malog mozga te djelomičnu mijelopatiju dok atipične prezentacije za CIS uključuju bilateralni optički neuritis, kompletnu oftalmoplegiju, kompletnu mijelopatiju, encefalopatiju, glavobolju, promjene svijesti, meningizam te izolirani umor (41, 42).

Liječnici uvijek moraju ispitati pacijentove prošle neurološke događaje kao što su zamagljivanje vida, dvostruki vid, Lhermitteov znak, utrnulost ili slabost koja traje duže od 24 sata jer ovi simptomi mogu biti zanemareni pogotovo ako su blagi. Također liječnici moraju isključiti druge alternativne dijagnoze kao što su infekcije, upalni poremećaji, metabolički poremećaji, genske bolesti, neoplazme, vaskularne bolesti te druge autoimune bolesti (26, 39, 43-46).

Klinička prezentacija CIS-a može biti monofokalna ili multifokalna. Monofokalna prezentacija podrazumijeva odražavanje patologije na jednom mjestu (42). Ako je kod prve kliničke prezentacije zadovoljen kriterij DIS-a koji podrazumijeva oštećenja na dva različita mjesta SŽS-a, takav oblik CIS-a nazivamo multifokalnim. Monofokalni CIS se tipično prezentira u tri klinička oblika: nepotpuni transverzalni mijelitis koji se prezentira s asimetričnom para/tetraparezom, smetnjama sfinktera te različitim osjetnim ispadima; optički neuritis kojeg obilježava klinički trijas (bolnost prilikom pomicanja bulbusa, smetnje vidne oštrine, nesposobnost razlikovanja boja); te simptomima moždanog debla i/ili malog mozga

koji se prezentira internuklearnom oftalmoplegijom, ataksijom, različitim oblicima centralnog nistagmusa, parezom abducensa ili paroksizmalnim simptomima (47).

Trenutno nema markera koji su patognomični za dijagnozu CIS-a ili MS-a. Dijagnostička obrada CIS-a obično počinje s MR-om mozga (48).

Prema Milleru (26), CIS se može podijeliti na pet tipova:

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

U McDonaldovim kriterijima iz 2017. godine za CIS, osim asimptomatskih lezija, trebaju se u obzir uzeti i simptomatske lezije (42).

Nakon što se postavi dijagnoza CIS-a, jedno od glavnih pitanja je koliki je rizik tog bolesnika da razvije MS. Istraživani su brojni čimbenici kao mogući prediktori konverzije, no samo se MR i CSF koriste u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici (47).

1.3.1. Radiološki izolirani sindrom

Povećana upotreba MR-a mozga rezultirala je slučajnim pronalascima abnormalnosti bijele tvari u SŽS-u. Dok je većina tih nalaza nespecifična, neki upućuju i na demijelinizirajuću patologiju (24). Porast neočekivanih promjena na MR-u su povećale zanimanje za otkrića čija morfologija, veličina, lokacija i distribucija visoko upućuju na demijelinizirajuću patologiju. Ovo je dovelo do definicije RIS-a koji je uveden kako bi se opisali asimptomatski pacijenti s abnormalnostima mozga na MR-u koji ukazuju na mogući MS, no koji imaju odsutne kliničke znakove (49).

Prirodna povijest ovih oštećenja i razvoj stanja kod ovih bolesnika ostaju nejasna i potrebni su dodatni dokazi da bi se ustanovio rizik (24).

Određeni broj pacijenata s RIS-om s vremenom prijeđe u MS, što pokazuje da RIS u nekim slučajevima predstavlja pretklinički stadij MS-a (49). Pojam RIS-a je prvi predložio Okuda sa suradnicima (40) te je ponudio primjenjive kriterije koji se fokusiraju na strukturalna otkrića MR-a te istovremeno isključuju kliničke promjene i druga bolesna stanja koja bi mogla sačinjavati promatrane parakliničke anomalije (40, 49). Okudini kriteriji iz 2009. godine podrazumijevaju prisutnost jajolikih i dobro okruženih lezija uz prisutnost ili odsutnost *corpus callosum*, koje su veće od 3 mm te ispunjavaju barem tri od četiri DIS kriterija. MAGNIMS skupina (49) predložila je nove MR kriterije za dijagnozu MS-a koji su utjecali na reviziju McDonaldovih kriterija iz 2010. godine. Ovi kriteriji su se fokusirali na lokaciju lezija, što je olakšalo pojašnjenje MR-a i njegovo korištenje u kliničkoj praksi. MAGNIMS skupina je modificirala ove kriterije te su oni uključeni u McDonaldove kriterije iz 2017. godine (Tablica 1.). Prema ovim kriterijima, preporuča se da bi se identični MR kriteriji za DIS trebali primjenjivati za dijagnozu RIS-a i MS-a. Također, ispunjavanje McDonaldovih kriterija za DIT bi nadalje moglo poboljšati identifikaciju pacijenata s RIS-om s visokim rizikom od razvijanja neuroloških simptoma te bi omogućilo definitivnu dijagnozu MS-a i to kad bi pacijent prikazao prvi neurološki simptom koji ukazuje na demijelinizaciju SŽS-a (49).

Tablica 1. *Prikaz MAGNIMS preporuka za dijagnozu i liječenje RIS-a (s dodanim modificiranim kriterijima) i subkliničkog MS-a prema (49)*

Dijagnostički kriteriji
Dijagnoza RIS-a pretpostavlja da su otkrića neočekivana za remitirajuće kliničke simptome nakon pažljivo skupljene kliničke povijesti i pedantnog kliničkog pregleda.
Opis prostornog i vremenskog širenja MR lezija koji je predložen u najnovijoj reviziji McDonaldovih kriterija za dijagnozu MS-a iz 2017. godine bi se trebao primjenjivati na pacijente s RIS-om. Prema modificiranim kriterijima za dijagnozu RIS-a, uključujući kriteriji podrazumijevaju: • Prikaz DIS-a (putem ≥ 1 T2-hiperintenzivne lezije na najmanje dvije od sljedećih lokacija): 1. Periventrikularna bijela tvar 2. Kortiko-jukstakortikalna 3. Leđna moždina 4. Infratentorijalna

Isključujući kriteriji podrazumijevaju: • Klinički dokaz neurološke disfunkcije koja ukazuje na MS na temelju povijesnih simptoma i/ili objektivnih znakova • MR abnormalnosti objašnjene bilo kojim drugim bolestima, s posebnom pažnjom na starenje ili vaskularne abnormalnosti, te abnormalnosti uzrokovane izloženošću toksinima ili lijekovima
Prisutnost DIT-a na MR-u kod RIS-a može omogućiti definitivnu dijagnozu MS-a s prvom pojavom neuroloških događaja, koji su potvrđeni kliničkim pregledom te upućuju na demijelinizaciju SŽS-a.
Dijagnoza RIS-a se uglavnom temelji na pojašnjavanju MR otkrića, no potrebno je isključiti druge bolesti koje bi mogle uzrokovati promatrane anomalije na MR-u.
Prediktori konverzije i subkliničkog MS-a
Postoji dosta važnih prediktora koji ukazuju na konverziju iz RIS-a u MS te bi se trebali koristiti za identificiranje pacijenata s RIS-om koji bi mogli imati veći rizik od razvijanja MS-a.
Pojedinci s RIS-om koji imaju klasična paraklinička svojstva pacijenata s MS-om te kod kojih postoji nekoliko MR faktora rizika za konverziju u MS vjerojatno imaju subklinički oblik MS-a.
Liječenje i upravljanje
Trenutni dokaz ne podržava liječenje kod pacijenata s RIS-om, čak i kada otkrića ukazuju na subklinički MS.
Aktivno praćenje pacijenata s periodičnim (6-12 mjeseci), kliničkim i radiološkim kontrolama preporuča se kod pacijenata s mogućim subkliničkim MS-om.
Svakom pojedincu s RIS-om mora se pružiti mogućnost izbora želi li on/ona nastaviti daljnje pretrage.

1.4. Dijagnostika multiple skleroze

Dijagnoza MS-a se zasniva na anamnezi, kliničkoj slici, analizi CSF-a te MR-a (50). Dijagnoza započinje na temelju simptoma karakterističnih za MS, a inicijalno se naziva CIS koji to ostaje dok se ne pojavi relapsno remitirajući klinički oblik koji je karakteriziran epizodama brzo nastalih novih neuroloških deficita. Ako su simptomi i slikovni nalazi tipični za MS, kliničar može primijeniti odgovarajuće dijagnostičke kriterije. Smatra se da klinička procjena i nalaz MR-a imaju ključnu ulogu u dijagnostičkom procesu, no MR-u nedostaje specifičnosti tijekom najranijih stadija bolesti. Konverzija CIS-a u MS javlja se u oko 30 % oboljelih u srednjem intervalu od 5,4 godine te je iznimno važna procjena od rizika konverzije (51), a s najvažnijim ciljem – osigurati pacijentu ranu primjenu imunomodulacijske terapije i minimalizirati upalni proces i buduće epizode oštećenja neurona. Pacijenti s CIS-om prezentiraju se s tipičnom kliničkom slikom, tipičnim nalazom na MR-u (51) te zadovoljavaju McDonaldove kriterije iz 2010. (52) prema kojima kliničar mora evaluirati DIS, što podrazumijeva uključivanje multiplih područja u SŽS-u, te DIT, što znači proučavanje aktivnosti bolesti u vremenu. Kod pacijenata koji se prezentiraju tipičnom kliničkom slikom, tipičnim nalazima na MR-u te zadovoljavaju McDonaldove kriterije revidirane u 2017. godini (42), nije potrebna daljnja dijagnostička obrada**.** S druge strane kod pacijenata kod kojih se sumnja na MS, no postoji atipični nalaz MR-a ili kliničke slike, potrebna je daljnja obrada da bi isključila alternativne dijagnoze (24). Upravo je analiza CSF-a ta koja se preporuča u onim slučajevima kad su atipični: klinička slika, dob pojedinca te nalaz MR-a. Iako analiza CSF-a nije obvezni dio dijagnostičkog kriterija, valja ju primijeniti u bolesnika s CIS-om da bi se isključile alternativne dijagnoze. Osim rutinskih postupaka analiziranja CSF-a kod pacijenata gdje se sumnja na MS, potrebno je paralelnim analiziranjem CSF-a i seruma detektirati mogući poremećaj funkcije barijere te procijeniti intratekalno sintetiziranu količinu imunoglobulina G. Za detekciju intratekalne sinteze Ig-a, osim kvantitativne metode, preporuča se i kvalitativna metoda izoelektričnog fokusiranja (IEF, *engl. Isoelectric Focusing*) s imunofiksacijom koja je osjetljivija te predstavlja zlatni standard za detekciju oligoklonskih Ig-a (53). U slučaju da je pozitivan nalaz oligoklonskih Ig-a izvodi se i reakcija na morbile, rubellu i zoster (MRZ, *engl. Morbilli, Rubella, Varicella Zoster*) koja značajno povećava specifičnost nalaza oligoklonskih IgG jer upućuje da se radi o kroničnom upalnom procesu SŽS-a (54).

1.4.1. Magnetna rezonancija

Za postavljanje dijagnoze MS-a potrebna je klinička detekcija lezija koje su diseminirane u vremenu i prostoru, a čiji slikovni prikaz omogućuje MR. DIS kriteriji na MR-u podrazumijevaju pojavu minimalno jedne T2 lezije na najmanje dvije od četiri lokacije: periventrikularno, jukstakortikalno, infratentorijalno i/ili u kralježničkoj moždini, dok DIT kriteriji predstavljaju prisutnost nove T2 lezije i/ili gadolinij imbibirajuće lezije na kontrolnom snimanju MR-a u usporedbi s početnim MR-om (neovisno o vremenu snimanja početnog MR-a). Također DIT može predstavljati i istovremenu prisutnost asimptomatske lezije koja se postkontrastno imbibira i lezije koja se ne imbibira.

Prilikom MR snimanja primjenjuju se nestandardizirani protokoli koji uključuju snimanje mozga, vratne kralježničke moždine, očnih živaca, a ponekad i torakalne kralježničke moždine uz primjenu intravenskog paramagnetskog kontrastnog sredstva kao što je gadolinij. Primjena gadolinija omogućuje praćenje aktivnosti bolesti.

MS lezije se mogu pojaviti u bilo kojem dijelu SŽS-a gdje postoji mijelin. Najčešće se pojavljuju periventrikularno, u *corpus callosum*, jukstakortikalno i infratentorijalno. Obično su bilateralne i simetrične distribucije. T2 mjerna slika je osjetljivija za detekciju MS lezija moždanog debla i malog mozga, dok je FLAIR osjetljivija za periventrikularne i jukstakortikalne lezije te rijetke kortikalne lezije. Postkontrastna T1 mjerna slika je osjetljiva za detekciju aktivnih lezija.

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

U kasnijoj fazi bolesti osim gubitka mijelina, dolazi i do atrofije mozga i kralježničke moždine. Kralježnička moždina je uz mozak vrlo često zahvaćena MS-om, osobito gornji i srednji dijelovi vratne kralježničke moždine, dok su torakalni i lumbalni rjeđe zahvaćeni (55).

U dijagnozi MS-a koriste se McDonaldovi kriteriji koji predstavljaju zlatni standard u dijagnostici MS-a u odraslih te su uz određene specifičnosti primjenjivi i u dječjoj dobi. Ovi kriteriji su objedinili MR mozga i kralježničke moždine zajedno s kliničkom slikom, parakliničkim testovima i laboratorijskim nalazima. Prvi put ih je donijelo Internacionalno

vijeće za dijagnostiku MS-a 2001. godine, a revidirani su 2005. 2010. i 2017. godine (42, 43, 44, 52, 55).

U Tablici 2. se nalaze McDonaldovi kriteriji iz 2010. godine (52). Revizija McDonaldovih kriterija uslijedila je 2017. godine (42). Ovom revizijom došlo je do nekoliko izmjena. Neke od tih izmjena su:

- da pacijenti u kojih objašnjenja za kliničku sliku tipičnog CIS-a izostaju, a ispunjavaju kliničke ili MR kriterije za DIS, prikaz specifičnih oligoklonskih vrpci (OB, *engl. oligoclonal bands*) u CSF-u omogućuje dijagnozu ove bolesti. Ova preporuka dodatak je McDonaldovom kriteriju iz 2010. godine te podrazumijeva da se u određenim uvjetima pozitivan nalaz OB-a u CSF-u može zamijeniti za demonstraciju DIT-a
- da se simptomatske i asimptomatske MR lezije mogu razmotriti pri određivanju DIS-a ili DIT-a što ne uključuje MR lezije u optičkom živcu kod pacijenata koji imaju optički neuritis. U McDonaldovom kriteriju iz 2010. godine (52) simptomatske lezije kod pacijenta koji prikazuje sindrom moždanog debla ili leđne moždine su isključene kao mogući MR dokaz za DIS ili DIT
- da se kortikalne i jukstakortikalne lezije mogu koristiti pri određivanju MR kriterija za DIS. Prema McDonaldovim kriterijima iz 2010. godine (52) kortikalne lezije se nisu mogle koristiti kod ispunjavanja MR kriterija za DIS
- da su u McDonaldovim kriterijima iz 2017. godine (42) dijagnostički kriteriji za primarno progresivni MS isti kao i u McDonaldovom kriteriju iz 2010. godine (52), osim što su pridodane asimptomatske te kortikalne lezije

Tablica 2. *McDonaldovi kriteriji iz 2010. i 2017. godine prema (42, 52)*

Klinička prezentacija	**Dodatni potrebni podaci prema McDonaldovim kriterijima u 2010. godini**	**Dodatni potrebni podaci prema McDonaldovim kriterijima u 2017. godini**
- 2 ili više napada (relapsa) - 2 ili više objektivne kliničke lezije - 1 objektivna	Nijedan, klinički dokaz je dovoljan (dodatni dokazi su poželjni, ali moraju biti povezani s MS-om).	Nijedan, klinički dokaz je dovoljan (dodatni dokazi su poželjni, ali moraju biti povezani s MS-om).

klinička lezija s dokazanim prijašnjim napadom		
- 2 ili više napada (relapsa) -1 objektivna klinička lezija	DIS prikazan: pojavom najmanje jedne T2 hiperintenzivne lezije na najmanje dvije od četiri lokalizacije (periventrikularno, jukstakortikalno, infratentorijalno i/ili u kralježničkoj moždini). Simptomatske lezije kod pacijenta koji prikazuje sindrom moždanog debla ili leđne moždine su isključene kao mogući MR dokaz za DIS.	DIS prikazan: dodatnim kliničkim napadom koji podrazumijeva različitu lokalizaciju u SŽS-u; putem MR-a. DIS se može prikazati: putem najmanje jedne T2-hiperintenzivne lezije na najmanje dvije od četiri lokacije SŽS-a: periventrikularnoj, kortikalnoj ili jukstakortikalnoj te infratentorijalnoj moždanoj regiji i/ili kralježničkoj moždini. Za razliku od McDonaldovih kriterija iz 2010. godine, u ovim kriterijima nema razlikovanja između simptomatskih i asimptomatskih lezija te bi za pojedince starije od 50 godina ili one sa vaskularnim faktorima rizika moglo biti dobro da liječnici traže veći broj periventrikularnih lezija.
- 1 napad - 2 ili više objektivne kliničke lezije	DIT dokazan s: istovremenom prisutnošću asimptomatske lezije koja se postkontrastno imbibira i lezije koja se ne imbibira u danom trenutku; postojanje nove T2 lezije i/ili lezije koja se postkontrastno imbibira na kontrolnom MR-u u usporedbi s	DIT dokazan s: istovremenom prisutnošću lezije koja se postkontrastno imbibira i lezije koja se ne imbibira u danom trenutku; postojanje nove T2 lezije i/ili lezije koja se postkontrastno imbibira na kontrolnom MR-u u usporedbi s početnim MR-om i to neovisno o

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

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

Rani dijagnostički kriteriji za MS primarno su se temeljili na kliničkim dokazima (56). Zbog tehnoloških napredaka i novih podataka kasniji kriteriji su obuhvaćali slikovne i druge parakliničke testove (43, 44, 52, 57). Revizija McDonaldovih kriterija iz 2017. godine (42) ponovo je obnovila ulogu analize CSF-a, razmatrala vrijednost slikovnih otkrića koja prethodno nisu bila uključena (simptomatske i kortikalne lezije), te je više naglasila upozorenja o pogrešnoj dijagnozi i diferencijalnoj dijagnozi.

1.4.2. Laboratorijska dijagnostika

Budući da su promjene sastava CSF-a odraz različitih zbivanja unutar SŽS-a, pa tako i upalnih, dijagnostika CSF-a se rutinski provodi i kod sumnje na MS. Štoviše, ona je neizostavna u dijagnostici MS-a prema najnovijim dijagnostičkim kriterijima (42) kako je već opisano u prethodnom poglavlju 1.4.1. U većini europskih zemalja određuju se broj i vrsta stanica, koncentracija glukoze, laktata, ukupnih proteina, albumina, Ig-ova (IgG, IgA i IgM). Ni jedan nalaz nije patognomičan, međutim laboratorijska dijagnostika se provodi upravo da bi se isključilo postojanje zaraznih i upalnih bolesti koji oponašaju MS (50, 53).

Paralelnim analiziranjem CSF-a i seruma moguće je putem albuminskog kvocijenta (Q_{Alb}) koji predstavlja omjer koncentracije albumina u CSF-u i koncentracije albumina u serumu detektirati poremećaj funkcije barijere, a ujedno je i temelj za kvantifikaciju intratekalno sintetiziranog IgG-a. Za procjenu intratekalno sintetizirane količine IgG-a primjenjuje se Reiberov matematički model (58) i IgG kvocijent, a za dokazivanje prisutnosti oligoklonskih IgG-ova kvalitativna metoda (53). Zlatni standard za dokazivanje oligoklonskih IgG-ova u CSF-u je metoda izoelektričnog fokusiranja uz obveznu karakterizaciju oligoklonskih IgG-ova postupkom imunofiksacije (59). Metoda je kvalitativna, tehnički složena i temeljena na procjeni iskusnog analitičara kojemu je ponekad vrlo teško identificirati oligoklonske vrpce zbog nejasne razlučivosti i vizualizacije ili zbog vrlo slabo izraženih OB-a. Za detekciju intratekalne sinteze IgG-ova preporuča se kombinacija kvantitativnih i kvalitativnih metoda, zbog relativno niske osjetljivosti kvantitativnih metoda. Premda je kvalitativna metoda dokazivanja OB-a osjetljivija, također je i nedovoljno specifična. Zbog toga se u CSF-u određuju i dodatni biljezi za razlikovanje MS od drugih upalnih bolesti. IgG usmjeren protiv Morbile, Rubelle i Varicella Zoster (MRZ) te protiv Herpes Simplexa i Borelije Burgdorferi povećava specifičnost ove analize (60-63). MRZ reakcija poboljšava specifičnost za dijagnozu MS-a kod pacijenata s pozitivnim OB-om te je rijetko pozitivna u bolestima koje oponašaju MS: neuroborelioza, optički neuromijelitis, paraneoplastični sindrom. U sklopu MRZ reakcije izračunava se indeks specifičnih protutijela ASI (*engl. Antibody Specificity Index*) za svaki patogen.

Rezultate koji se dobiju analizom CSF-a treba interpretirati uzimajući u obzir sve dostupne podatke o pacijentu jer standardne pretrage CSF-a ne koreliraju s aktivnosti bolesti i stupnjem invalidnosti bolesnika (53).

1.4.2.1. Očuvanost krvno-likvorske barijere

Proteini se normalno nalaze u CSF-u u vrlo malim koncentracijama i većina proteina u CSF-u krvnog je podrijetla. Stoga kod procjene poremećaja unutar SŽS-a mora se uzeti u obzir koncentracija ovih analita u krvi kao i funkciju sustava barijera odnosno brzine izmjene CSF-a. Povećane koncentracije serumskih proteina općenito rezultiraju s višim koncentracijama u CSF-u, no gradijent ostaje konstantno uravnotežen što se može prigodno izraziti putem koncentracijskih kvocijenata Q koji se izračunavaju kao odnos koncentracije CSF/serum, a predstavljaju precizne pokazatelje poremećaja proteina u CSF-u (64). Albumin se isključivo proizvodi u jetri, tako da sav albumin uočen u CSF-u potječe iz krvi zbog čega služi kao idealan biljeg za procjenu očuvanosti odnosno propusnosti KLB-a. Dodatna uloga Q_{Alb} je ta da služi kao temelj za druge serumske proteine pri izračunavanju njihove intratekalne sinteze, kako je poznato iz formule za IgG_{indeks} (65-69). Za određivanje koncentracije albumina u serumu i CSF-u na raspolaganju su metode različite osjetljivosti kao što su turbidimetrija ili nefelometrija te bi uzorci CSF-a i seruma trebali biti analizirani istovremeno pri istoj kalibraciji i kontroli da bi se zadržala minimalna analitička varijabilnost (69-71). Albumin je stabilan u CSF-u jedan tjedan na sobnoj temperaturi, a kad se skladišti na +4 °C stabilan je do nekoliko mjeseci, dok je zamrznut na -20 °C stabilan i do 2 godine (69, 72). Koncentracijski kvocijent Q_{Alb} je prihvaćen kao najbolji pokazatelj disfunkcije KLB-a, jer veća vrijednost Q_{Alb} uzrokuje i veći poremećaj u funkciji barijere, odnosno brzini izmjene CSF-a. Zbog smanjene brzine izmjene CSF-a dolazi do pojačanog ulaska ostalih proteina iz krvi u CSF, čime se povećavaju njihovi koncentracijski kvocijenti Q. Referentni interval za nepropusni KLB kod odraslih povezan je s omjerom albumina u CSF-u i serumu i iznosi $Q_{Alb} < 8{,}0 \times 10^{-3}$. Granična vrijednost Q_{Alb} (Q_{limAlb}) ovisna je o dobi (Tablica 3.). Za djecu mlađu od 15 godina ne izračunava se Q_{limAlb} dok je granična vrijednost Q_{limAlb} za ispitanike starije od 15 godina predstavljena formulom (58):

$$Q_{limAlb} = \left(4 + \frac{dob}{15}\right) x10^{-3}$$

***Tablica 3**. Prikaz graničnih vrijednosti Q_{Alb} (Q_{limAlb}) ovisan o dobi bolesnika prema (58)*

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

Bolesnici istih godina imati će istu graničnu vrijednost Q_{limAlb}. Međutim, ova formula još uvijek daje povišene rezultate kod 15 % pacijenata kojima nije dokazan nikakav neurološki poremećaj bilo kliničkim i laboratorijskim putem ili slikovnom tehnikom (68). Postoji nekoliko istraživanja na normalnom Q_{Alb} koje su zabilježili više graničnih vrijednosti (65). Vrijedi zabilježiti da na Q_{Alb} može utjecati tjelesna težina ili indeks tjelesne težine koji također doprinosi velikoj interindividualnoj varijabilnosti unutar iste dobne skupine (68). Funkcija barijere smatra se očuvanom ukoliko je $Q_{Alb} < Q_{limAlb}$. Abnormalno povećanje Q_{Alb} događa se u raznim neurološkim bolestima upalnog i neupalnog karaktera. Blago do osrednje povećanje Q_{Alb} (8,0 - 25,0 × 10^{-3}) primjećuje se u mnogim bolestima kao dijabetičke imunosno posredovane polineuropatije, virusnom meningitisu ili patologiji vertebralnog diska, dok srednja do ozbiljna povećanja Q_{Alb} (> 25,0 × 10^{-3}) povezana su s gnojnim meningitisom, akutnom lajmskom neuroboreliozom, neurotuberkulozom, imunosno posredovanim poliradikulitisom i mijelitisom ili teškom stenozom spinalnog kanala, što je prikazano u Tablici 4. (68).

Prilikom određivanja koncentracije albumina i Ig-ova u serumu i CSF-u koriste se različite formule za procjenu funkcije barijere, a formule koje se preporučuju temelje se na hiperboličnoj i eksponencijalnoj funkciji (53).

***Tablica 4**. Spektar bolesti povezan s blagim, srednjim i težim povećanjima Q_{Alb} prema (68)*

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

1.4.2.2. Intratekalna sinteza proteina

Intratekalna sinteza protutijela može se dokazati u čitavom nizu neuroloških bolesti, od akutnih i kroničnih infekcija, autoimunih bolesti, neurodegenerativnih bolesti, ali i kod zdravih osoba (73). U normalnim uvjetima, antitijela unutar SŽS-a su krvnog porijekla i ulaze u SŽS kroz KMB i KLB, i to primarno kroz KLB. Intratekalna, lokalna sinteza antitijela u SŽS-u počinje od perivaskularnih infiltrata B-limfocita koji proliferiraju i lokalno sazrijevaju. Mogući uzroci koji su osnova pojave intratekalnih antitijela su:

a) Stvarni upalni proces SŽS-a, kojeg karakterizira povećani broj stanica u CSF-u i povećana vaskularna permeabilnost barijera
b) Infekcije u dalekoj prošlosti s ustrajnim imunosnim odgovorom, koji nije važan za trenutne kliničke simptome. Ove infekcije karakterizira odsutnost disfunkcije barijere te niski IgM titrovi u serumu
c) Polispecifični intratekalni imunosni odgovor povezan s kroničnim upalnim bolestima SŽS-a bez prisutnosti odgovarajućih antigena (MS, kronične infekcije SŽS-a, sistemske autoimune bolesti koje uključuju SŽS) (54)

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

1. Lokalno stvorena frakcija protutijela može biti i do 90 % od ukupne količine protutijela u CSF-u. Ova se protutijela najčešće prikazuju u CSF-u kao uski OB-ovi tj. oligoklonski Ig-ovi, što olakšava dokazivanje intratekalne sinteze protutijela.
2. Također stvaraju se protutijela visokog i niskog afiniteta (tj. specifičan tip humoralnog odgovora i polispecifičan tip odgovora koji se očituje kroz MRZ reakciju u CSF-u).
3. Za razliku od krvi ne dolazi do klasične konverzije u sintezi protutijela klase IgM→IgG zbog čega se tako određeni tip intratekalnog humoralnog odgovora po klasama protutijela može zadržati dulje tijekom bolesti (profil humoralnog odgovora koji više odgovara patomehanizmu bolesti, a ne stadiju bolesti).
4. Infekcije SŽS-a mogu potaknuti rani i vrlo snažni intratekalni humoralni imunosni odgovor i sintezu specifičnih protutijela, međutim u nekim slučajevima intratekalna sinteza specifičnih protutijela može zaostati unutar SŽS-a i godinama poslije primarne infekcije i izliječenja same bolesti, zbog čega je jedna od značajki intratekalne humoralne aktivnosti dugotrajna sinteza protutijela i spora normalizacija.
5. Tijekom imunosne aktivnosti, unutar SŽS-a može doći do dugotrajne stimulacije ograničenog broja klonova memorijskih B-limfocita koje se diferenciraju u plazma stanice. Plazma stanice proizvode protutijela ograničene heterogenosti. Sva ta protutijela prepoznaju različite epitope, ali na istom antigenu. U upalnim bolestima SŽS-a uz specifična protutijela na uzročnika bolesti postoji i udio protutijela različite antigeničnosti što odražava polispecifični imunosni odgovor. Oligoklonski Ig-ovi u kroničnim upalnim bolestima SŽS-a primarno odražavaju polispecifičnu, a tek onda oligoklonsku narav imunosnog odgovora (54, 73).

Intratekalna sinteza protutijela može se dokazati različitim laboratorijskim postupcima. Mnogo češće se može dokazati kvalitativnom metodom IEF-a s imunofiksacijom, kojom se nalaz prikazuje u obliku OB-ova, nego kvantitativnim analizama i evaluacijom imunoglobulinskog kvocijenta u Reibergramu (54, 66, 74-76). MRZ reakcija dokazuje polispecifični, intratekalni humoralni imunosni odgovor na neurotropne viruse (ospice, rubeola, varičela zoster) te poboljšava specifičnost kod bolesnika s MS-om s pozitivnim OB-om (53).

1.4.2.3. Matematički model za procjenu očuvanosti krvno-likvorske barijere i intratekalne sinteze

Proteini u CSF-u su važan pokazatelj neuropatoloških zbivanja u SŽS-u, od oštećenja KLB-a do odvijanja različitih lokaliziranih upalnih i autoimunih reakcija. Normalni CSF sadrži nisku koncentraciju svih imunoglobulina. Već prethodno je istaknuto da se Q_{Alb} koristi kao mjera očuvanosti KLB-a, a ujedno predstavlja i temelj za kvantifikaciju intratekalno sintetiziranog IgG-a. Povezanost Q_{Alb} i koncentracijskog kvocijenta IgG CSF/serum (Q_{IgG}) doveo je do razvoja $IgG_{indeksa}$ koji služi za procjenu intratekalne sinteze IgG-a (65, 77):

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

U ovom matematičkom modelu pretpostavlja se da postoji linearna povezanost između Q_{Alb} i Q_{IgG}. Ovaj model bio je predmet rasprave mnogih znanstvenika koji su tvrdili da se veza između Q_{Alb} i Q_{IgG} bolje objašnjava hiperboličkom formulom. Također su hiperboličke formule bile razvijene za procjenu intratekalne sinteze IgA i IgM (67, 77). Međutim, hiperbolički model nije bio univerzalno prihvaćen jer su drugi znanstvenici prijavili da je veza između Q_{Alb} i Q_{IgG} linearna ako je dvostruko logaritamska te da ne postoje statistički podaci koji ukazuju da je bolja hiperbolična formula (77, 78). Dvostruka logaritamska veza između Q_{Alb} i Q_{IgG} je dovela do razvoja produženog $IgG_{indeksa}$ (IgG_{EI}), a kasnije se razvio i produženi indeks za IgA i IgM (77, 79, 80).

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

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

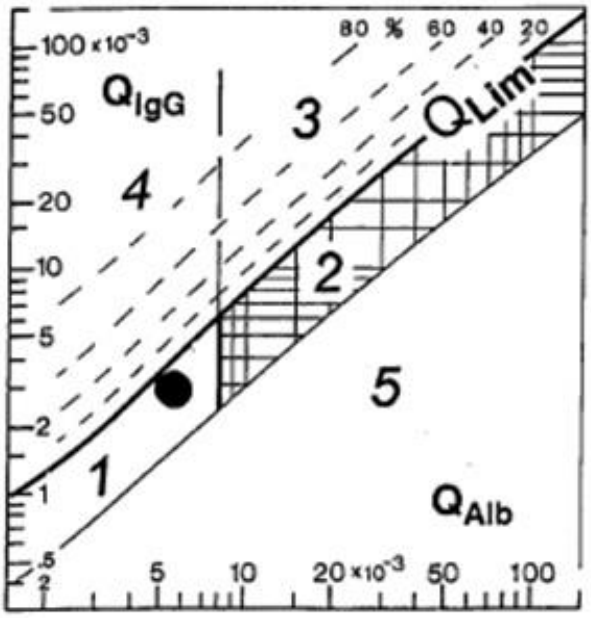
Međutim linearna formula $IgG_{indeksa}$ daje lažno pozitivne rezultate pri višim vrijednostima Q_{Alb}, kad dolazi do izraženije disfunkcije barijere odnosno usporene izmjene CSF-a. S porastom ukupnih proteina u CSF-u, odnos Q_{Alb} i Q_{Ig} se mijenja te više nije linearan. Reiber je ovaj odnos definirao kroz hiperboličku formulu koja predstavlja gornju granicu za imunoglobulinski kvocijent Q_{Ig} (67, 77).

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

(IgG: a = 0,93; b = 6,0 × 10^{-6}; c = 1,7 × 10^{-3})
(IgA: a = 0,77; b = 2,3 × 10^{-5}; c = 3,1 × 10^{-3})
(IgM: a = 0,67; b = 1,2 × 10^{-4}; c = 7,1 × 10^{-3})

Smatra se da produženi indeks Ig-a i hiperbolična formula imaju bolju izvedbu nego konvencionalni indeks za kvantitativnu procjenu intratekalne sinteze proteina (77, 79, 80, 81). Radi preglednosti praćenja rezultata i lakše kliničke primjene danas se sve češće koristi grafički prikaz statističko-matematičkog modela po Reiberu tzv. Reiberov model koji se temelji na odnosu albumina i imunoglobulina u CSF-u i serumu, a u obzir uzima i karakteristiku KLB-a i KMB-a koja je u normalnim fiziološkim okolnostima selektivna za prolaz proteinskih molekula, dok se ta selektivnost gubi oštećenjem barijere. Reibergram olakšava procjenu funkcije KLB-a i količinu sintetiziranog IgG-a unutar SŽS-a u odnosu na ukupnu koncentraciju Ig-a u CSF-u. Granične vrijednosti imunoglobulinskih kvocijenta Q (Q_{lim}) razgraničuju krvno podrijetlo Ig-a u CSF-u od njegove intratekalne sinteze. Ona vrijednost koja se nalazi ispod granične linije Q_{lim} ukazuje na krvno podrijetlo, ispitivanog Ig-a u CSF-u, dok vrijednost Q_{Ig} koja se nalazi iznad granične linije Q_{lim} ukazuje na njegovu intratekalnu (lokalnu) sintezu. Na Reibergramu se razlikuje 5 područja (Slika 2.) koja su predstavljena kao:

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



Slika 2. *Procjena funkcije sustava barijere odnosno brzine izmjene CSF-a i intratekalne sinteze putem Reibergrama prema (82). Gornja hiperbolička krivulja (podebljana linija)* Q_{lim} *predstavlja liniju razgraničenja između imunoglobulinskog kvocijenta koji ukazuje na krvno porijeklo, polje 1 i 2 koji se nalaze ispod* Q_{Ig} *limesa i imunoglobulinskog kvocijenta koji ukazuje na dodatnu intratekalnu sintezu imunoglobulina koji je prikazan na poljima 3 i 4 koja se nalaze iznad* Q_{Ig} *limesa. Polje 5 predstavlja rezultate nesigurnog biološkog značaja. Granica referentnog ranga za* Q_{Alb} *između normalnih i povišenih koncentracija CSF proteina je ovisna o dobi.*

1.4.2.4. Dokazivanje oligoklonskih imunoglobulina u likvoru

Intratekalna sinteza imunoglobulina može se dokazati u čitavom nizu neuroloških bolesti od akutnih i kroničnih infekcija pa do autoimunih bolesti kao što je MS (54, 73). Za razliku od krvi, unutar SŽS-a može biti lokalno stvoreno i do 90 % ukupne količine imunoglobulina koji se prikazuju u CSF-u kao OB-i odnosno oligoklonski Ig-i. Tijekom imunosne aktivnosti unutar SŽS-a može doći do dugotrajne stimulacije ograničenog broja klonova memorijskih B-limfocita koji se mogu diferencirati u plazma stanice. Upravo su plazma stanice te koje proizvode protutijela ograničene heterogenosti što se očituje pojavom OB-ova u području γ globulinske frakcije (54). Dokazivanje oligoklonskih Ig-ova u CSF-u ukazuju na intratekalnu sintezu, te predstavljaju znak nakupljanja B-limfocita i plazma stanica u SŽS-u koje sintetiziraju protutijela IgG i IgM na određeni antigen (83). Ove vrpce se mogu

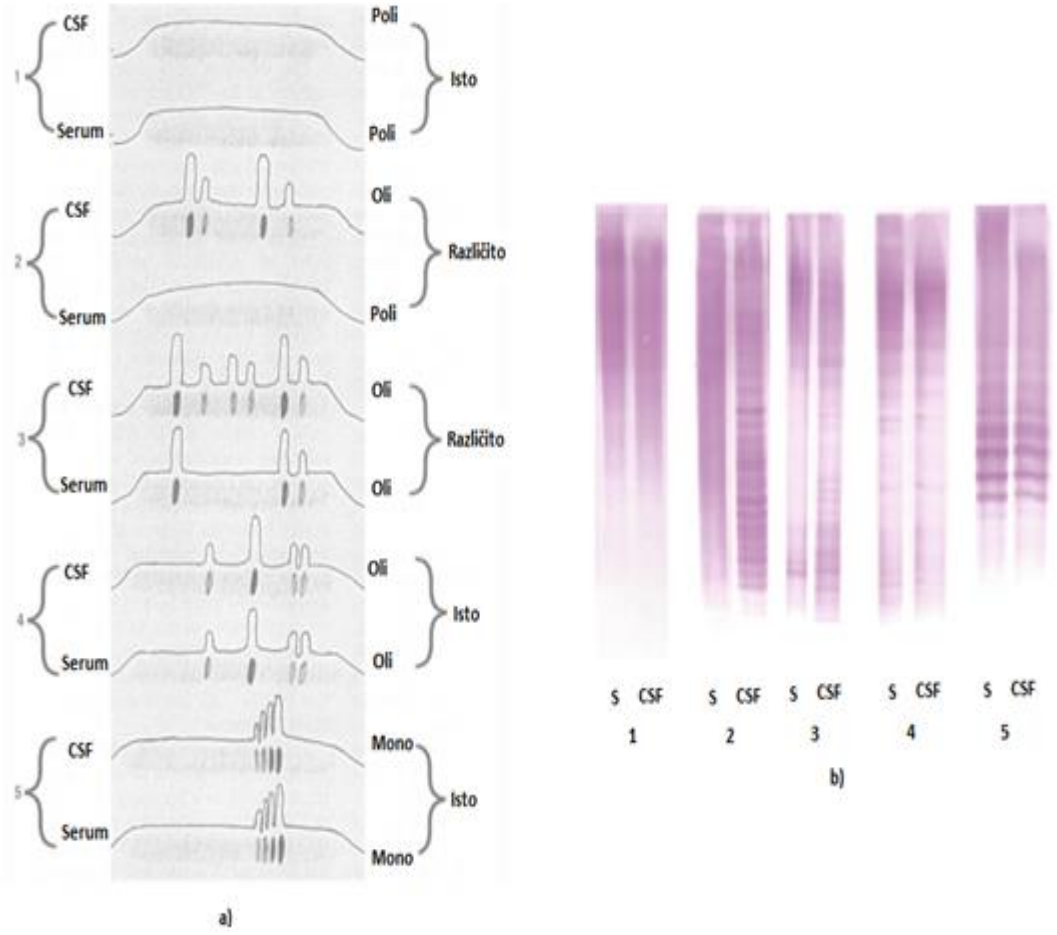
lako uočiti u CSF-u upravo zbog postojanja KLB-a te ograničenog ulaska plazmatskih proteina.

Europski Odbor za usklađeno djelovanje kod MS-a je zaključio da dokazivanje OB-a metodom IEF-a predstavlja najosjetljiviji test za detekciju humoralnog imunosnog odgovora (66). OB-ovi se analiziraju metodom IEF-a na agarozi uz obveznu karakterizaciju IgG OB-ova postupkom imunofiksacije. Metodom IEF-a moguće je dokazati čitav niz IgG vrpci u CSF-u, ali i u serumu (59). IEF može se zamisliti kao separacija IgG-a na osnovu različitih izoelektričnih točki. Važno je isključiti vrpce koje su nastale artefaktom, što se praktično može uraditi usporedbom nekoliko uzoraka seruma različitih pacijenata. Vrpce koje se nalaze na istoj izoelektričnoj točki u svim uzorcima jedne probe su najvjerojatnije artefakti koje proizvode amfoliti korišteni za separaciju. Što je veći broj artefakta, teže je prepoznati ne samo abnormalne serumske vrpce, nego i vrpce u CSF-u. Izbor komercijalnog izvora amfolita je važniji od izbora medija (npr. agaroza ili poliakrilamid) (66).

U nalazima analize CSF-a potrebno je oprezno interpretirati kvalitativne, kao i kvantitativne rezultate. Kod sagledavanja rezultata IEF-a valja pažljivo uočavati izgled i broj proteinskih frakcija - je li frakcija poliklonalna (bez oštrih vrpci, difuzna), monoklonalna (paraproteinska vrpca) ili oligoklonalna (više oštrih vrpci). Prema međunarodnom dogovoru o interpretaciji nalaza oligoklonskih IgG-ova u CSF-u i serumu rezultati nalaza se izražavaju na sljedeći način:

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

Od pet tipova uzoraka vrpci, samo uzorci 2 i 3 predstavljaju lokalnu, intratekalnu sintezu IgG-ova unutar SŽS. Slika 3. prikazuje primjere pet tipova uzoraka (66).



Slika 3. *Prikaz 5 tipova uzoraka svrstanih po međunarodnom dogovoru adaptirano prema (66, 77).*

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

b) Laboratorijski nalaz IEF-a s imunofiksacijom. Nalaz se svrstava prema već navedenom međunarodnom dogovoru u 5 tipova kako je opisano pod slikom 3. a). S - serum; CSF - cerebrospinalna tekućina

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

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

Intratekalna produkcija IgM vrpci kod pacijenata s MS-om je manje učestala nego intratekalna produkcija IgG vrpci (66).

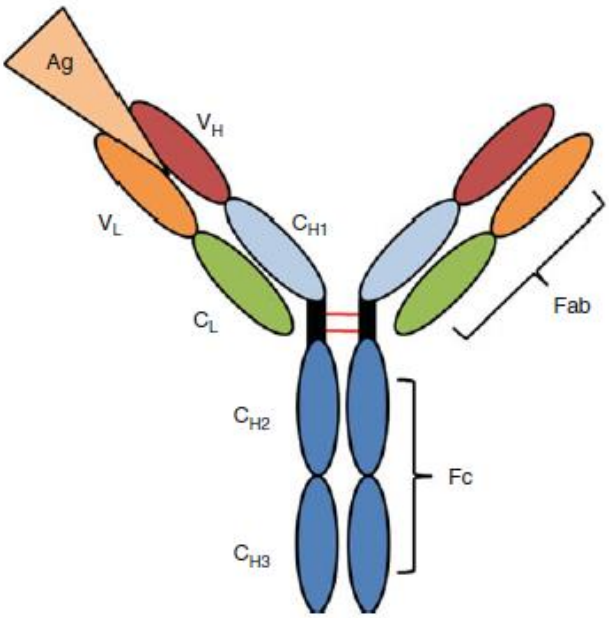
1.4.2.5. Slobodni laki lanci imunoglobulina u krvi i likvoru

Za vrijeme upale SŽS-a se nerijetko odvija sinteza intratekalnih imunoglobulina (84, 85). S obzirom da KMB uvelike spriječava prelazak Ig-a u krv, oni se postupno nakupljaju u CSF-u (18, 85). Plazma stanice koje se nalaze u intratekalnom prostoru, uglavnom izlučuju IgG (51, 59, 85). Produkcija Ig-a uz produkciju slobodnih lakih lanaca (FLC, *engl. free light chains*) dio je humoralnog imunosnog odgovora.

Osnovnu jedinicu građe Ig-a (Slika 4.) čine dva para istovrsnih polipeptidnih lanaca, koji se razlikuju po broju aminokiselina. Laki lanci sastavljeni su od 220, a teški od 440 aminokiselina. Sva četiri lanca povezana su međusobno disulfidnim vezama u osnovnu četverolančanu jedinicu. U osnovi, imunoglobulini su sastavljeni od 2 teška lanca i 2 laka lanca. Laki lanci se mogu svrstati u dvije skupine:

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

Oba su lanca zastupljena u svim razredima i podrazredima Ig-a, ali tako da su u istoj molekuli, oba laka lanca jednaka ili kapa, ili lambda, ali nikad zajedno i kapa i lambda (85, 86).



Slika 4. *Shematski prikaz molekule Ig prema (77).*
Laki lanac (V_L i C_L) te domene V_H i C_{H1} sačinjavaju Fab fragment Ig-a koji veže antigen, dok C_{H2} i C_{H3} domene sa dva teška lanca formiraju Fc fragment. V_L – varijabilni dio lakog lanca, V_H – varijabilni dio teškog lanca, C_L – konstantni dio lakog lanca, C_{H1}-C_{H3} – tri domene konstantnog dijela teškog lanca.

Kod interpretacije nalaza abnormalni se imunoglobulini procjenjuju na temelju paralelnog podatka o Ig-u iz seruma zbog mogućeg difundiranja iz krvi u CSF.
Također, ako postoji upala moždanih ovojnica, serumski protein će lakše ući u CSF i neće biti samo intratekalnog podrijetla. Stoga se mjerenja proteina u CSF-u izvode uvijek u odnosu na mjerenja serumskih proteina. Kad procijenjujemo produkciju Ig-ova u CSF-u, stavljamo u omjer koncentraciju Ig-a u CSF-u i krvi te koncentraciju albumina u CSF-u i krvi iz razloga što se albumin nikad ne sintetizira u mozgu. Premda se čini jednostavnim paralelno kvalitativno usporediti rezultate elektroforetskog razdvajanja seruma i CSF-a, metoda zahtijeva puno vremena i vrlo iskustvenog analitičara (85, 87).

Zbog navedenih teškoća i nastojanja da se pronađe pouzdan biljeg koji se može u kraćem vremenu kvantificirati, standardizirati i automatizirati te koji neće biti ovisan o vrsnosti analitičara, istražuju se slobodni laki lanci imunoglobulina koji se sintetiziraju i nakupljaju u CSF-u zajedno s intaktnim imunoglobulinima. Zbog svoje veličine i niskih serumskih koncentracija, ne ulaze u značajnim količinama iz krvi u CSF. Detekcijske metode za FLC u CSF-u uključuju IEF, kvantifikaciju putem enzimskih/radio-imunotestova i nefelometrije, no rezultati nisu bili od općeg interesa (87, 88-92).

Međutim, razvojem jednostavnih nefelometrijskih testova za detekciju FLC-a pojavio se obnovljeni interes za njihova mjerenja u CSF-u (87). Ovaj test pokazuje željene značajke kvantitativnog pristupa i praktične primjene automatskih analizatora (85, 93).

Nefelometrija kao kvantitativna metoda koja ima provjerene kalibratore i kontrolne uzorke, osiguranu preciznost i ponovljivost u ujednačenim analitičkim uvjetima analitičkih instrumenata te daje pouzdane i egzaktne rezultate, već je zaživjela u kliničkoj praksi za dijagnostiku i praćenje multiplog mijeloma (94).

U istraživanju bolesti SŽS-a te analizom CSF-a otkrivene su povišene koncentracije FLC-a, osobito KFLC-a. Dosad je već nekoliko istraživanja prikazalo i povećane koncentracije FLC-ova u CSF-u kod pacijenata s MS-om i CIS-om gdje je naročito povišena koncentracija KFLC-a te promijenjen njihov omjer CSF/serum (κ kvocijent) (95-97).

1.4.2.6. Imunosni odgovor na neurotropne viruse i Boreliju Burgdorferi

U kroničnim upalama SŽS-a, polispecifični imunosni odgovor može se podržavati i bez prisutnosti odgovarajućeg antigena (98). Dokazivanje polispecifične intratekalne sinteze protutijela na neurotropne viruse (Morbili, Rubella i Varicella Zoster) poznato je pod nazivom MRZ reakcija koja je prvi put opisana 1992. godine (99). U sklopu MRZ reakcije izračunava se indeks specifičnih protutijela, ASI indeks, za svaki patogen. Da bi se povećala specifičnost MRZ reakcije, ASI indeks se određuje i na HSV tip 1 te na Boreliju Burgdorferi u cilju isključivanja kronične neuroborelioze (53). ASI indeks izračunava se iz kvocijenta specifičnih protutijela (Q_{Igspec}) i kvocijenta ukupnih protutijela iste klase Ig-a (Q_{Ig}) prilikom čega su ove vrijednosti već ranije izračunate putem Reibergrama. Ukoliko je Reibergramom dokazana intratekalna sinteza, umjesto kvocijenta Q_{Ig}, koriste se granične vrijednosti imunoglobulinskih kvocijenata Q_{Iglim}.

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

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

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

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

Pozitivni ASI obično ukazuje na intratekalnu sintezu protutijela na odgovarajući patogen, koji se trenutno nalazi u CSF-u kod pacijenata ili je u prošlosti bio prisutan. Odsutnost DNA virusa u CSF-u kod pacijenata s MS-om koji imaju pozitivan ASI postavila je hipotezu o „reakciji promatrača“, koja se opisuje kao polispecifična aktivacija B-stanica unutar SŽS-a (100). MRZ reakcija u kliničkoj praksi ima potencijal da pridonese kliničkoj dijagnozi, ali njena patofiziološka uloga još u potpunosti nije jasna te zahtijeva daljnje istraživanje. Dok se pozitivna MRZ reakcija može uočiti kod pacijenata sa relapsno remitirajućim MS-om, nekoliko istraživanja je pokazalo negativnu MRZ reakciju kod pacijenata s drugim autoimunim upalnim neurološkim bolestima kao što su: neuromijelitis optika, paraneoplastični neurološki sindromi, neurosarkoidoza, akutni diseminirajući encefalomijelitis i autoimuni encefalitis (62, 63, 99, 101). Također je MRZ reakcija negativna kod pacijenata s infektivnim bolestima SŽS-a koje mogu oponašati MS, kao Lajmska neuroborelioza i HTLV-I – vezana mijelopatija (102, 103). Istraživanja pokazuju visoku prevalenciju MRZ reakcije kod pacijenata s MS-om (104), a također ova reakcija poboljšava specifičnost za pacijente s MS-om koji imaju pozitivne OB-ove (53).

Određivanjem ASI indeksa ne određuje se jakost imunosnog odgovora u svrhu potvrde ili odbacivanja zaraze određenim virusom, nego su ovi testovi prilagođeni za otkrivanje niskih titrova koji su odraz kroničnih upala SŽS-a (53). Zbog toga je MRZ reakcija pozitivna u kroničnim bolestima te nije prisutna u akutnim upalnim bolestima (98). Pomoć u diferencijalnoj dijagnostici neuroloških poremećaja pruža paralelno određivanje više vrsta specifičnih antitijela. Povećanje ASI indeksa na samo jedan patogen više govori u prilog aktivne ili kronične infekcije tim patogenom, dok istovremeno povećanje ASI-ja za više patogena ne znači da je patogen prisutan u SŽS-u već odražava polispecifičnu imunosnu reakciju kod kronične upalne bolesti, vjerovatno autoimunog karaktera kao što je MS (53).

1.5. Ukratko o ulozi laboratorija u dijagnostici, predikciji i prognozi multiple skleroze

Multipla skleroza je promjenjiva bolest po pitanju kliničkog tijeka, prognoze i kliničkih manifestacija (105). Pitanje dijagnoze za liječnike može biti problematično na samom početku bolesti (106) i to ako klinički pokazatelji nisu jasni te ako postoji sumnja na druge upalne bolesti koje mogu oponašati MS (50). Dokaz intratekalne sinteze, koji se može naći u čitavom nizu neuroloških bolesti može biti potpuno nevažan nalaz zbog mogućeg odjeka ranijih infekcija, ali također može biti bitan nalaz za dijagnozu ove bolesti (107). Nalaz OB-a je najosjetljiviji biokemijski nalaz intratekalne sinteze IgG-a, ali je vrlo nespecifičan (108). Kod većine bolesnika s dokazanim MS-om, broj i raspored IgG OB-ova uglavnom se ne mijenja tijekom bolesti jer su one odraz nespecifične dugotrajne imunosne stimulacije, a ne specifičnog imunosnog odgovora (109). Pozitivan nalaz OB-a ima visoku negativnu prediktivnu vrijednost i nisku pozitivnu prediktivnu vrijednost, što čini OB-ove osjetljivim za probir, ali se ne smatraju dobrim dijagnostičkim sredstvom. Ako je rezultat normalan velika je mogućnost da se ne radi o dijagnozi MS-a. Podaci o prognostičkom značaju negativnih OB-ova su oprečni te ih jedni opisuju kao povoljan prognostički biljeg koji ukazuje na blaži tijek bolesti i bolji odgovor na terapiju β-interferonom, dok drugi opisuju da se s većom učestalosti negativan nalaz OB-a javlja kod bolesnika s primarno progresivnim tijekom bolesti gdje je snažniji relaps i veći stupanj invalidnosti kod bolesnika. Ako su rezultati dvosmisleni, negativni ili postoji jedan OB, a klinička sumnja na MS je vrlo visoka, treba razmisliti o ponavljanju lumbalne punkcije i to ako se pojave neurološki simptomi koji do tada nisu postojali. Neki autori smatraju da broj OB-a ima prognostički značaj te da korelira s nalazom MR-a. U svojim istraživanjima objavili su da bolesnici s manjim brojem aktivnih plakova i plazma stanica u bijeloj tvari i meningama imaju manji broj OB-a (53). U procjeni kliničkog značaja nalaza OB-a određuje se i MRZ reakcija koja u kombinaciji s OB-om podupire dijagnozu MS-a. MRZ reakcija je rijetko pozitivna u bolestima koje oponašaju MS kao što su optički neuromijelitis, neuroborelioza, paraneoplastični sindrom. Istraživanje Schwenkenbechera i suradnika (110) je pokazalo da pacijenti s CIS-om koji imaju pozitivan nalaz OB-a imaju dva puta veće šanse da razviju MS od onih s negativnim nalazom. Pozitivna MRZ reakcija uočena je i kod pacijenata s CIS-om koji su se konvertirali u MS (110). Rezultati Brettschneidera i suradnika (111) su ukazali da MRZ reakcija ima visoku prediktivnu vrijednost za konverziju CIS-a u MS zbog čega bi bolesnike s pozitivnom MRZ reakcijom trebalo uključiti u ranu terapiju jer je klinički izazov kod pacijenata s CIS-om identifikacija pacijenata kod kojih bi se u budućnosti mogla potvrditi dijagnoza MS-a.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

2.1. Ciljevi i hipoteze

Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je ispitati može li određivanje kapa tipa slobodnih lakih lanaca IgG-a (KFLC) pridonijeti dijagnostici klinički izoliranog sindroma (CIS) i multiple skleroze (MS) te zamijeniti metodu izoelektričnog fokusiranja (IEF) za identifikaciju intratekalne sinteze.

Specifični ciljevi su:

1. U uzorcima krvi i likvora bolesnika s dijagnozom CIS-a odrediti imunonefelometrijskom metodom koncentraciju KFLC-a i parametara, Q_{KFLC} i $KFLC_{indeks}$.
2. Pratiti pojavu druge neurološke epizode kroz dvije godine, odnosno konverziju CIS-a u MS.
3. Procijeniti dijagnostičku i prediktivnu vrijednost KFLC parametara; $KFLC_{CSF}$, Q_{KFLC} i $KFLC_{indeks}$ kod pacijenata sa sumnjom na MS.
4. Identificirati IgG oligoklonske vrpce (OB) kvalitativnom metodom imunofiksacije koja ujedno predstavlja zlatni standard za dokazivanje intratekalne sinteze.
5. Procijeniti očuvanost krvno-likvorske barijere po Reiberu na temelju odnosa koncentracija albumina i IgG-a te predefiniranih graničnih vrijednosti prema životnoj dobi.
6. Odrediti ASI kvocijent protutijela na neurotropne viruse i Boreliju Burgdorferi.
7. Laboratorijske nalaze usporediti međusobno i u odnosu na radiološki nalaz magnetske rezonancije.
8. Modelom logističke regresije predvidjeti konverziju iz CIS u MS u periodu od 2 godine.

Navedeni ciljevi ovog istraživanja testirani su sljedećim hipotezama:

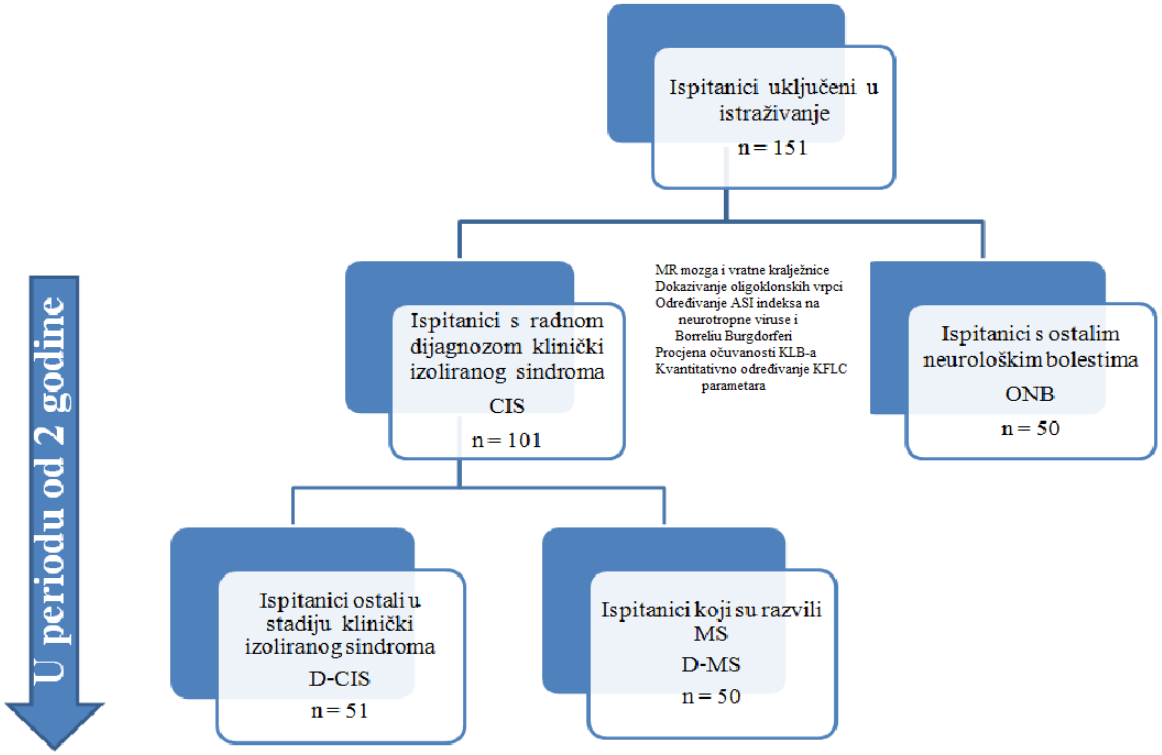
1. Određivanje koncentracije KFLC-a u CSF-u i serumu osjetljivija je i pouzdanija kvantitativna laboratorijska metoda za dokazivanje intratekalne sinteze nego li je kvalitativna metoda IEF s imunofiksacijom.
2. Koncentracija KFLC-a i omjeri KFLC-a u CSF-u i serumu mogu biti kriterij za dijagnostiku CIS-a te predvidjeti konverziju iz CIS-a u MS u periodu od dvije godine.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno kao prospektivna studija na Klinici za neurologiju i Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Sestre milosrdnice u Zagrebu. U istraživanje su uključeni ispitanici stariji od 18 godina koji su sukcesivno primljeni na Klinici za neurologiju KBC Sestre milosrdnice te su na temelju prve epizode kliničkih neuroloških simptoma koji traju najmanje 24 sata svrstani radnom dijagnozom u CIS. Ispitanici koji su imali ponovljeni neurološki ispad, druge neurološke bolesti (akutni diseminirajući encefalomijelitis, neuroboreliozu, sistemske imunološke bolesti, subakutni sklerozirajući panencefalitis, neurosifilis, HIV encefalitis i ostala stanja u kojima je oštećena KLB), autoimune bolesti u povijesti bolesti te ispitanici čiji je CSF bio hemoragičan isključeni su iz istraživanja. Iz istraživanja su također isključeni ispitanici kojima se tijekom hospitalizacije nije provela dijagnostika MR mozga. Laboratorijske analize napravljene su za sve ispitanike u Kliničkom zavodu za kemiju navedene bolnice, a uključivale su dokazivanje OB-a, procjenu očuvanosti KLB-a, kvantitativno određivanje KFLC-a u CSF-u i serumu, dok se serološka diferencijalna dijagnostika u niskim koncentracijama specifičnih antitijela na neurotropne viruse i Borreliu Burgdorferi provodila samo u onih ispitanika kod kojih su dokazani OB-ovi. Također su svi ispitanici bili podvrgnuti radiološkom snimanju MR-a u vrijeme hospitalizacije. Istraživanje koje se provelo u periodu 2015. do polovice 2016. godine, uključivalo je 151 ispitanika (grafički prikaz ustroja i vremenskog tijeka skupine ispitanika prikazan je na Slici 5.).

Za 101 pacijenta utvrđena je dijagnoza CIS-a na temelju pozitivnih kliničkih, radioloških i nalaza OB-a u CSF-u te su pacijenti kojima je dokazana intratekalna sinteza prema međunarodnom dogovoru definirani kao Tip 2 ili Tip 3 (66). Pacijenti su praćeni u periodu od 3-6 mjeseci tijekom dvije godine. Ostalih 50 ispitanika, čiji nalazi nisu potvrdili dijagnozu CIS-a, svrstani su u skupinu ostalih neuroloških bolesti (ONB). U istraživanju su definirani kao kontrolna skupina ONB kojoj nisu dokazane oligoklonske vrpce pa su iskazani kao Tip 1 prema međunarodnom dogovoru (66).



Slika 5. *Grafički prikaz ustroja i vremenskog tijeka skupine ispitanika.*

3.1.1. Protokol prikupljanja uzoraka

Svakom bolesniku sa sumnjom na CIS uzorkovala se u prvom danu, u jutarnjim satima medicinske skrbi venska krv za biokemijske, hematološke i koagulacijske pretrage, a istovremeno je specijalist neurolog uzeo epruvetu CSF-a lumbalnom punkcijom. Uzorci krvi uzorkovali su se u epruvetama s podtlakom (Greiner, Bio-one; Kremsmuenster, Austrija) i to 3 mL EDTA venske krvi, 3 mL venske krvi s antikoagulansom Na-citrat, 6 mL venske krvi bez antikoagulansa i dodatkom aktivatora zgrušavanja, te 6 mL CSF-a u epruvete s podtlakom bez aditiva.

Uzorci su se odmah dostavljali u laboratorij Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre milosrdnice gdje je rutinska analiza podrazumijevala:

- obradu krvne slike na hematološkom analizatoru DxH (Beckman Coulter, Fullerton, SAD)
- obrada PV-a i APTV-a iz plazme dobivenom centrifugiranjem venske krvi s antikoagulansom Na-citrat i to na koagulacijskom analizatoru BCS XP (Siemens, Erlangen, Njemačka)

- odvajanje seruma nakon centrifugiranja krvi 10 minuta relativnom centrifugalnom snagom 1500×g (Hettich, Kirchlengern, Njemačka)
- obradu seruma za opće biokemijske pretrage na biokemijskom analizatoru Architect c8000 (Abbott Laboratories, Illinois, SAD)
- obradu CSF-a za brojanje stanica te centrifugiranje CSF-a na 1500 ok/min u periodu od 10 minuta.

Uzorak CSF-a se bez odgode mikroskopski pregledavao te su se mikroskopski identificirali broj i vrsta stanica nativno u Fuchs-Rosenthalovoj komorici. Iz centrifugiranog CSF-a se na biokemijskom automatskom analizatoru (Architect c8000, Abbott) određivala koncentracija laktata, glukoze i ukupnih proteina. Preostali dio seruma i CSF-a podijelio se u dva dijela od kojih se jedan pohranjivao u zamrzivač na -20 ºC, a drugi dio u hladnjak na temperaturu od +4 ºC. Iz CSF-a i seruma pohranjenog na temperaturi +4 ºC procjenjivala se očuvanost KLB-a, te se kvalitativnom metodom određivala moguća intratekalna sinteza, a u ispitanika s dokazanim oligoklonskim vrpcama za dodatnu potvrdu određivao se ASI indeks na neurotropne viruse.

Iz drugog zamrznutog ostatnog dijela seruma i CSF-a u periodu od 4 tjedna određivala se koncentracija KFLC-a u CSF-u i serumu.

U provođenju ovog istraživanja poštivala su se sva načela etičnosti, uz odobrenje etičkih povjerenstava Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu. Istraživanje je provedeno uz pisani informirani pristanak ispitanika za korištenje ostatnog dijela CSF-a i seruma. Istraživanje je provedeno sukladno smjernicama Helsinške deklaracije.

3.2. Metode

3.2.1. Magnetska rezonancija

Ispitanicima sa sumnjom na MS, u standardnom protokolu na MR uređajima snage magnetskog polja 1 T ili 1,5 T (Siemens, Erlangen, Njemačka), sniman je mozak, orbita i vratna kralježnica. Mozak se snimao sekvencama:

SE (*engl. Spin Echo*) - koji podrazumijeva najjednostavniji način snimanja, a karakteristične slike nazivaju se T1 (vrijeme kad je 33,33 % protona relaksirano) i T2 (vrijeme kad je 66,66 % protona relaksirano). T1 mjerne slike daju visok udio masti, dok T2 mjerne slike daju visok udio vode.

DWI (*engl. Diffusion Weighted Imaging*) - tehnika koja podrazumijeva poništavanje cijelog signala iz tkiva, tako da se prikazuje jedino signal onih molekula koji se kreću zbog difuzije.

FLAIR (*engl. Fluid Attenuated Inversion Recovery*) - tehnika koja potiče potiskivanje signala vode, ali na drugačiji način od čistih T1 snimki. FLAIR sekvenca je najosjetljivija sekvenca za dijagnostiku demijelinizacijskih lezija, a korištenjem slojeva u sagitalnoj ravnini dobiva se uvid u lezije lokalizirane u *corpus callosum*, perikalozalno i na septokalozalnom spoju te predstavljaju karakteristične lokalizacije za demijelinizacijske lezije.

T2* (GRE T2) - za razliku od T2 relaksacije protona koja dobiva *spin echo* signal, T2* relaksacijom protona dobiva se *gradijent echo* signal zbog čega se može poboljšati detekcija malih lezija.

Također, kod ispitanika sa sumnjom na MS, orbite su snimane sekvencom STIR (*engl. Short Tau Inversion Recovery*) u koronarnoj ravnini. STIR je posebna tehnika T1 snimaka kod kojih se signal masti potiskuje, a budući da T1 snimke sadrže uglavnom signal masti, slike su tamne. Snimanjem STIR sekvence mogao se dobiti uvid u strukturu optičkih živaca odnosno postajanje eventualnog retrobulbarnog neuritisa (55).

Da bi se dobio uvid u strukturu medule spinalis i postojanje eventualnih demijelinizacijskih lezija u meduli spinalis, snimala se vratna kralježnica. Vratna medula spinalis je najčešća lokalizacija gdje se mogu naći demijelinizacijske lezije. Kao što podrazumijeva standardni protokol, kod pacijenata sa sumnjom na MS nije se koristilo snimanje torakalne kralježnice osim ako bi neurolog postavio sumnju na lezije u torakalnoj meduli spinalis s obzirom na kliničku sliku i neurološki deficit.

Kralježnica se obavezno snimala sekvencama T1 i T2 u sagitalnoj ravnini i sekvencom T2 u transverzalnoj (aksijalnoj) ravnini. U protokol je obvezno uključeno snimanje mozga i

vratne kralježnice sekvencom T1 nakon aplikacije paramagnetnog kontrastnog sredstava, gdje aktivne demijelinizacijske lezije ukazuju znakove imbibicije kontrasta. Pojačavanje MS lezija gadolinijem je dobro utvrđena metoda za procjenu statusa bolesti, gdje kontrastom ojačane lezije odražavaju oštećenje KMB-a i upalnu reakciju u akutnim demijelinizirajućim lezijama (112). Upravo imbibicija gadolinijskim kontrastnim sredstvom može razlučiti aktivni upalni plak od starih lezija.

3.2.2. Metode za biokemijske i hematološke analize u krvi

Nakon centrifugiranja venske krvi iz uzorka seruma na biokemijskom automatskom analizatoru Architect Abbott c8000 u Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice određeni su sljedeći biokemijski parametri:

1. glukoza spektrofotometrijskom metodom heksokinaze preporučenom prema Međunarodnoj federaciji za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (IFCC, *engl. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)
2. elektroliti (kalij, natrij, kloridi) metodom indirektne potenciometrije
3. kreatinin spektrofotometrijskom metodom s pikrinskom kiselinom u alkalnom mediju
4. aspartat-aminotransferaza (AST) spektrofotometrijskom metodom bez piridoksal-fosfata
5. alanin-aminotransferaza (ALT) spektrofotometrijskom metodom bez piridoksal-fosfata
6. hsCRP imunoturbidimetrijskom metodom koristeći komercijalni test za vrlo osjetljivi CRP, zbog čega je CRP bilo moguće mjeriti čak i pri vrlo niskim koncentracijama

Za sve testove korišteni su reagensi proizvođača Abbott Laboratories te njihovi pripadajući kalibratori i kontrole.

Iz uzorka venske krvi s antikoagulansom EDTA, kod ispitanika sa sumnjom na MS obrađena je i rutinska analiza krvne slike na hematološkom analizatoru Beckman Coulter DxH i to broj leukocita, eritrocita i trombocita metodom impendancije i volumetrije. Spektrofotometrijskom metodom na istom analizatoru određen je hemoglobin, dok je hematokrit dobiven računski iz broja eritrocita i prosječnog volumena eritrocita (MCV).

Na koagulacijskom analizatoru BCS XP iz plazme dobivene centrifugiranjem venske krvi s antikoagulansom Na-citratom, metodom koagulometrije određeno je protrombinsko vrijeme (PV) i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV).

3.2.3. Metode za biokemijske i hematološke analize u likvoru

Nakon dostavljanja CSF-a, CSF se bez odgode mikroskopski pregledavao i identificirali su se broj i vrsta stanica u Fuchs-Rosenthalovoj komorici. Iz centrifugiranog dijela CSF-a na automatskom analizatoru Architect Abbott c8000 određivali su se glukoza, laktat i ukupni proteini. Glukoza u CSF-u izmjerena je istom metodom kao i u serumu (spektrofotometrijom). Metodom spektrofotometrije u CSF-u se određivao također i laktat dok su ukupni proteini u CSF-u određivani metodom turbidimetrije. Također su se za sve testove koristili već navedeni reagensi proizvođača Abbott Laboratories te njihovi pripadajući kalibratori i kontrole.

3.2.4. Procjena očuvanosti krvno-likvorske barijere

U periodu od tjedan dana iz alikvota CSF-a i seruma skladištenih na +4 °C na automatskom analizatoru BN II s pripadajućim reagensima (Siemens, Ingelheim, Njemačka) imunonefelometrijskom metodom određena je koncentracija albumina i imunoglobulina G. Očuvanost KLB-a je interpretirana kvocijentom albumina u CSF-u i serumu prema predefiniranoj graničnoj vrijednosti određenoj prema životnoj dobi ispitanika (64).

$$Q_{Alb} = \frac{Alb_{CSF}}{Alb_{serum}}$$

Pozitivna intratekalna sinteza IgG-a potvrđena je na temelju kvocijenta IgG-a (65, 77):

$$Q_{IgG} = \frac{IgG_{CSF}}{IgG_{serum}}$$

i to ako je kvocijent bio viši od osobnog graničnog kvocijenta generiranog Reiberovim modelom ($Q_{limIgG} < Q_{IgG}$) (64). Kod pozitivne intratekalne sinteze izračunavala se kvantifikacija intratekalne sinteze IgG_{LOC}.

$$IgG_{LOC} = \left[Q_{IgG} - Q_{limIgG}\right] x IgG_{serum}$$

te intratekalna frakcija IgG_{IF}.

$$IgG_{IF} = \left[\frac{1 - Q_{\lim IgG}}{Q_{IgG}}\right] x\ 100$$

3.2.5. Dokazivanje oligoklonskih imunoglobulina G

Iz uzoraka parova seruma i CSF-a skladištenih na +4 °C u periodu od tjedan dana identificirani su OB-ovi metodom IEF-a s imunofiksacijom na poluautomatskom elektroforetskom sustavu (Hydrasis, Sebia, Francuska). Postupak se izvodio u nekoliko faza: priprema uzoraka, priprema gela i analizatora, IEF na agaroznom gelu, imunofiksacija s anti-IgG obilježenim peroksidazom, rehidracija, bojanje, interpretacija rezultata. Za uzorke CSF-a i seruma koristio se standardizirani postupak (59) u kojem su se koristile ujednačene koncentracije IgG-a u serumu i CSF-u od 0,020 g/L. Nakon što bi se izmjerile koncentracije IgG-a u CSF-u i serumu izračunima bi se izvela razrjeđenja na ovu koncentraciju pri tom koristeći otopinu za razrijeđenje koja je sastavni dio kita Hydragel 9 CSF isofocusing. Ako je koncentracija IgG-a u CSF-u bila manja od 0,020 g/L, uzorak se nije razrjeđivao.

Metoda je izvedena na agaroznom gelu u pH gradijentu od 6-10 koji se uspostavlja između elektroda uz pomoć smjese nosivih amfolita. Imunofiksacijom s protutijelom na IgG prilikom čega nastaje precipitat antigen-antitijelo, ispiranjem proteina koji nisu u kompleksu s antitijelom te specifičnim bojanjem s kromogenom, vizualizirane su OB (Hydragel 9 CSF Isofocusing, Sebia, Francuska). OB-ovi odražavaju polispecifičnu narav imunosnog odgovora ograničenog broja klonova B-limfocita, a nalaz se interpretira prema međunarodnom dogovoru (66) po tipovima od 1 do 5, gdje tip 1 predstavlja normalan nalaz, dok tip 2 (više OB-ova u CSF-u) i tip 3 (više OB-ova od kojih su neke i u serumu) upućuju na intratekalnu sintezu.

3.2.6. Ispitivanja na neurotropne viruse

Intratekalni polispecifični imunosni odgovor na neurotropne viruse MRZ i Herpes Simplex te na bakteriju Boreliu Burgdorferi utvrđen je ELISA metodom (Euroimmun, Luebeck, Njemačka) kao udio specifičnih IgG antitijela u ukupnom sadržaju IgG-ova u CSF-u te je izražen kao ASI indeks za svaki patogen posebno. Vrijednost ASI veća od 1,5 se smatrao klinički relevantnim nalazom koji ukazuje na intratekalnu sintezu specifičnog protutijela što pridonosi dijagnostičkoj specifičnosti za MS u bolesnika s pozitivnim

OB-om, te se MRZ reakcija smatrala pozitivnom ako su dvije ili više ASI vrijednosti bile ≥ 1,5 (104).

$$ASI = \frac{\frac{IgG_{spec_{CSF}}}{IgG_{spec_{serum}}}}{\frac{IgG_{CSF}}{IgG_{serum}}}$$

odnosno

$$ASI = \frac{QIgG_{spec}}{Q_{IgG}}$$

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

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

3.2.7. Određivanje koncentracije slobodnih kapa lakih lanaca IgG

Iz zamrznutog ostatnog dijela CSF-a i seruma u periodu od 4 tjedna na automatskom analizatoru BN II (Siemens, Marburg, Njemačka) imunonefelometrijskom metodom određene su koncentracije KFLC-a u serumu i CSF-u. Reagens sadrži specifična monoklonska protutijela (NLatex FLC assay, Siemens, Marburg, Njemačka). Od istog proizvođača korišteni su pridruženi uzorci kalibratora i kontrola te je poštivana specijalna procedura za CSF. U skladu s najnižim kalibratorima definirana je koncentracija od 0,18 mg/L kao limit kvantifikacije (LoQ), dok je limit detekcije (LoD) iznosio 0,035 mg/L. Da bi se procijenila pasivna difuzija iz seruma u CSF, na temelju izmjerenih KFLC-a izračunat je kvocijent KFLC kao:

$$Q_{KFLC=\frac{KFLC_{CSF}}{KFLC_{serum}}}$$

U istu svrhu uveden je i KFLC indeks (113) koji uključuje u nazivniku Q_{Alb}, kao mjeru očuvanosti KLB-a i pasivne difuzije albumina koji se sintetizira isključivo u jetri.

$$KFLC_{indeks} = \frac{\frac{KFLC_{CSF}}{KFLC_{serum}}}{\frac{Alb_{CSF}}{Alb_{serum}}}$$

odnosno

$$KFLC_{indeks} = \frac{Q_{KFLC}}{Q_{Alb}}$$

Ekvivalentno $KFLC_{indeks}$, mjeren je i IgG_{indeks}.

$$IgG_{indeks} = \frac{\frac{IgG_{CSF}}{IgG_{serum}}}{\frac{Alb_{CSF}}{Alb_{serum}}}$$

odnosno

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

Imunonefelometrija predstavlja imunokemijsku tehniku u otopini te se primjenjuje za kvantitativno mjerenje koncentracije antigena u raznim tjelesnim tekućinama na temelju rasapa (nefelometrije) svjetlosti uzrokovane nastankom kompleksa antigen-antitijelo.

3.2.8. Statističke metode

Statistička analiza izvedena je pomoću MedCalc softvera (MedCalc Statistical Software Version 14.8.1, Oostende, Belgija). Statistička obrada uključivala je deskriptivnu statistiku skupine podataka, gdje su vrijednosti izraženi kao medijani (M) i interkvartilni raspon (IQR). Za testiranje normalnosti raspodjele korišten je Kolmogorov-Smirnovljev test. Kod usporedbe razlika u medijanima između dviju nezavisnih skupina korišten je neparametrijski Mann-Whitney dok se za ispitivanje razlika više podskupina varijabli koristio neparametrijski Kruskal-Wallisov test. Kategorijske varijable ispitane su $\chi 2$-test ili Fisherovim egzaktnim testom. Za procjenu dijagnostičke točnosti i prediktivne valjanosti primijenjena je ROC analiza (*engl*. *Receiver Operating Characteristic*), kao i usporedba ROC krivulja. Korelacijski odnosi ispitani su Spearmanovim testom. Dobiveni koeficijent korelacije tumačili smo prema Coltonu (114) i to:

- r = 0 do 0,25 ili 0 do -0,2 ili -0,5 (nema povezanosti)
- r = 0,26 do 0,50 ili -0,26 do -0,50 (slaba povezanost)

- r = 0,51 do 0,75 ili -0,51 do -0,75 (umjerena do dobra povezanost)
- r = 0,76 do 1 ili -0,76 do -1 (vrlo dobra do izvrsna povezanost)

Metodom multivarijatne logističke regresije u kojoj je zavisna varijabla kategorijska i to dihotomna, uključili smo različite nezavisne varijable *stepwise* metodom. Stepwise metoda podrazumijeva unos jednog po jednog prediktora u analizu uz istovremeno uklanjanje neželjenih prediktora u svakom od koraka. Cilj ove regresije je da kombinacija nezavisnih varijabli jako korelira sa zavisnom, ali isto tako da nezavisne varijable međusobno ne koreliraju. Primarna je zadaća bila procijeniti omjer izgleda u prelasku zavisne varijable iz jedne kategorije u drugu, u ovom slučaju iz dijagnoze koja nije MS u MS dijagnozu. U ovom modelu povećanje određenih nezavisnih varijabli za jednu jedinicu ukazuje koliki je omjer izgleda za prelazak zavisne varijable iz jedne kategorije u drugu. Vjerojatnost nekog događaja odnosno u ovom slučaju imanja bolesti može se predstaviti sa p. Izgled da se razvije bolest predstavlja omjer vjerojatnosti da imamo bolest i vjerojatnosti da je nemamo odnosno:

$$odds = \frac{p}{1-p}$$

Omjerom izgleda (OR) procjenjuje se jesu li izgledi za određeni događaj ili ishod jednaki kod obje skupine ispitanika. Detaljnije objašnjeno, s OR se mjeri omjer vjerojatnosti izloženih kroz omjer vjerojatnosti neizloženih rizičnom faktoru:

$$OR = \frac{\frac{p_{izloženi}}{1-p_{izloženi}}}{\frac{p_{neizloženi}}{1-p_{neizloženi}}}$$

U ovom istraživanju na temelju ponovljene neurološke epizode u periodu od 3 mjeseca do 2 godine uspostavilo se nekoliko modela za predviđanje rizika od konverzije MS-a, odnosno potvrdne dijagnoze u razdoblju dijagnosticiranog CIS-a.
Svi su rezultati interpretirani na razini statističke značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Biokemijske i hematološke analize u krvi i likvoru

U Tablicama 5., 6. i 7. prikazani su ukupni demografski podaci te laboratorijski nalazi za biokemijske, hematološke analize u krvi te biokemijske i citološke analize u CSF-u kontrolne skupine, primarno definirane skupine s CIS-om (CIS) te njezinih dviju podskupina, D-CIS i D-MS, čija je konačna dijagnoza utvrđena u toku dvije godine praćenja. Testiranjem varijabli Kolmogorov-Smirnovljevim testom nije utvrđena normalnost distribucije, što je statističku obradu usmjerilo na neparametrijske testove. U biokemijskim i hematološkim analizama u krvi između skupina CIS-a i ONB-a otkrivene su značajne razlike ($p < 0,05$) za AST i bilirubin, dok su D-CIS i D-MS skupine pokazale značajnu razliku za CRP i glukozu. Međutim, sve vrijednosti medijana bile su unutar referentnog intervala kod pacijenata s CIS-om i ONB-om kako slijedi:

1) AST (M = 17,0 i 21,0 U/L; referentni interval 11,0 - 38,0 U/L)
2) Bilirubin (M = 10,7 i 13,4 μmol/L; referentni interval 3,0 - 20,0 μmol/L)

Također, vrijednosti medijana za D-CIS i D-MS skupinu bile su unutar referentnog intervala i to redom:

1) Glukoza (M = 5,6 i 5,0 mmol/L; referentni interval 4,4 - 6,4 mmol/L)
2) CRP (M = 1,7 i 0,5 mg/L; referentni interval < 5,0 mg/L)

Primijenjena metoda za hsCRP može kvantificirati niske vrijednosti < 1,0, što je preduvjet za mogućnost procjene kronične „tihe“ upale i kardiovaskularnog rizika (115).

U biokemijskim i citološkim analizama u CSF-u kod skupine CIS-a i ONB-a, otkrivene su značajne razlike ($p < 0,05$) za ukupan broj stanica u CSF-u i ukupne proteine dok je kod skupina D-CIS i D-MS otkrivena značajna razlika samo za ukupan broj stanica u CSF-u. Iako je u ovim skupinama otkrivena značajna razlika za ukupan broj stanica u CSF-u ($M = 5,0 \times 10^6$/L za CIS; $M = 2,0 \times 10^6$/L za ONB; $M = 3,0 \times 10^6$/L za D-CIS; $M = 5,0 \times 10^6$/L za D-MS), normalni CSF odrasle osobe sadržava do $5,0 \times 10^6$/L leukocita i to limfocita 70-100 % te monocita 0-30 %. Kod kroničnih upalnih bolesti broj stanica u CSF-u se može umjereno povećati. Također, pri nekim bolestima broj stanica u CSF-u može ostati normalan, ali se u tom CSF-u mogu naći i druge vrste stanica kojih u CSF-u normalno nema, tako se npr. kod MS-a osim limfocita i monocita mogu naći i plazma stanice u CSF-u (1).

Za koncentraciju ukupnih proteina u CSF-u pronađena je statistički značajna razlika (p=0,004) kod skupine CIS (M = 0,38 g/L) i ONB (M = 0,32 g/L), ali također vrijednosti medijana nisu prešle referentni interval. Referentni interval kod odraslih za ukupne proteine iznosi 0,15 - 0,45 g/L. Povišene vrijednosti ukupnih proteina mogu se naći kod ometane cirkulacije CSF-a, oštećenja KLB-a, prisutnosti eritrocita u CSF-u, lokalne sinteze imunoglobulina. Međutim, bolji pokazatelj od određivanja ukupih proteina u CSF-u jest određivanje koncentracije specifičnih proteina, te njihovih kvocijenta u odnosu na serum (116).

Tablica 5. *Demografski podaci pacijenata*

	CIS (n=101)	**ONB (n=50)**	**p**	**D-CIS (n=51)**	**D-MS (n=50)**	**p**
Spol (M/Ž), n	38/63 p = 0,017	20/30 p = 0,203	0,917	18/33 p = 0,05	20/30 p = 0,203	0,777
Godine života	41 (19-83)	40 (22-82)	0,765	45 (19-83)	39 (20-73)	0,002

CIS - skupina s dijagnozom klinički izolirani sindrom na početku istraživanja; D-MS - podskupina izdvojena iz CIS koja se konvertirala u multiplu sklerozu; D-CIS - podskupina koja se nije konvertirala u toku 2 godine; ONB - kontrolna grupa ostalih neuroloških bolesti; Vrijednosti su izražene u medijanu i minimalnoj-maksimalnoj vrijednosti.

Tablica 6. *Biokemijske i hematološke analize u krvi*

	CIS (n=101)	**ONB (n=50)**	**P vrijednost**	**D-CIS (n=51)**	**D-MS (n=50)**	**p Vrijednost**
Glukoza, mmol/L	5,3 (4,8-5,9)	5,2 (4,8-5,9)	0,475	5,6 (5,1-6,0)	5,0 (4,7-5,7)	**0,009**
CRP, mg/L	1,0 (0,3-3,2)	0,8 (0,5-3,1)	0,814	1,7 (0,7-3,5)	0,5 (0,3-2,0)	**0,009**
Kreatinin, μmol/L	68,0 (63,8-76,3)	69,0 (65,0-80,0)	0,452	69,0 (64,0-81,3)	67,0 (63,0-74,0)	0,261
AST, U/L	17,0 (15,0-22,0)	21,0 (17,0-29,0)	**0,002**	17,0 (16,0-22,0)	15,5 (14,0-20,0)	0,069
ALT, U/L	18,0 (13,0-25,0)	19,5 (14,0-32,0)	0,159	19,0 (14,0-26,2)	18,0 (12,0-25,0)	0,280
Bilirubin, μmol/L	10,7 (7,6-15,0)	13,4 (9,3-15,8)	**0,040**	11,6 (8,5-17,4)	10,3 (7,2-12,8)	0,063
Kalij, mmol/L	4,3 (4,0-4,5)	4,4 (4,1-4,4)	0,826	4,3 (4,0-4,5)	4,4 (4,1-4,6)	0,246
Natrij, mmol/L	140,0 (139,0-141,0)	140,0 (139,0-142,0)	0,103	140,0 (139,0-140,0)	140,0 (139,0-141,0)	0,315
Kloridi, mmol/L	106,0 (104,8-107,0)	105,0 (103,0-107,0)	0,196	106,0 (104,3-107,0)	106,0 (105,0-107,0)	0,875
Leukociti $x10^9$/L	7,1 (6,0-9,4)	7,6 (6,6-8,8)	0,473	7,6 (6,1-10,1)	6,9 (6,0-8,0)	0,173
Eritrociti $x10^{12}$/L	4,7 (4,4-5,0)	4,6 (4,2-5,0)	0,188	4,6 (4,4-5,0)	4,8 (4,5-5,1)	0,538
Hemoglobin, g/L	140,0 (132,0-151,0)	138,5 (128,0-147,0)	0,197	139,0 (132,3-150,0)	142,0 (131,0-151,0)	0,836
Hematokrit, L/L	0,423 (0,399-0,458)	0,413 (0,386-0,449)	0,178	0,423 (0,396-0,456)	0,424 (0,401-0,458)	0,897
Trombociti $x10^9$L	242,0 (206,2-271,0)	245,5 (219,0-275,0)	0,942	239,0 (212,0-276,3)	242,0 (202,0-270,0)	0,981
PV, % aktivnosti	100,0 (92,0-112,0)	100,0 (93,0-107,0)	0,676	100,0 (93,3-113,5)	100,0 (88,0-110,0)	0,459
APTV, s	26,0 (25,0-28,0)	26,0 (25,0-28,0)	0,712	26,0 (24,3-27,8)	26,0 (25,0-28,0)	0,286

CIS - skupina s dijagnozom klinički izolirani sindrom na početku istraživanja; D-MS - podskupina izdvojena iz CIS-a koja se konvertirala u multiplu sklerozu; D-CIS - podskupina koja se nije konvertirala u toku 2 godine; ONB - skupina ostalih neuroloških bolesti; Vrijednosti su izražene u medijanu i interkvartilnom rasponu.

Tablica 7. *Biokemijske i citološke analize u CSF*

	CIS (n=101)	**ONB (n=50)**	**p vrijednost**	**D-CIS (n=51)**	**D-MS (n=50)**	**p vrijednost**
Ukupan broj stanica ×10⁶/L	5,0 (2,0-9,0)	2,0 (1,0-3,0)	**< 0,0001**	3,0 (1,2-7,0)	5,0 (4,0-11,0)	**0,005**
Eritrociti ×10⁶/L	7,0 (0,0-86,3)	6,5 (1,0-128,0)	0,425	8,0 (0,0-121,0)	3,0 (0,0-77,0)	0,478
Laktat, mmol/L	1,4 (1,3-1,6)	1,4 (1,2-1,5)	0,886	1,4 (1,2-1,6)	1,4 (1,3-1,5)	0,959
Glukoza, mmol/L	3,4 (3,2-3,6)	3,3 (3,1-3,6)	0,336	3,5 (3,2-3,7)	3,3 (3,1-3,5)	0,131
Ukupni proteini, g/L	0,38 (0,30-0,50)	0,32 (0,26-0,39)	**0,004**	0,35 (0,30-0,49)	0,38 (0,31-0,50)	0,802

CIS - skupina s dijagnozom klinički izolirani sindrom na početku istraživanja; D-MS - podskupina izdvojena iz CIS skupine koja se konvertirala u multiplu sklerozu; D-CIS - podskupina koja se nije konvertirala u toku 2 godine; ONB - kontrolna skupina ostalih neuroloških bolesti; Vrijednosti su izražene u medijanu i interkvartilnom rasponu.

4.2. Očuvanost krvno-likvorske barijere

U skupini CIS-a u skladu s Reiberovim kriterijima utvrđena je intratekalna sinteza kod 44 pacijenta, od kojih je 8 pokazalo i disfunkciju KLB-a. Nakon dvije godine praćenja u skupini D-MS, dokazanoj putem kontrolnog pregleda i ponovljenog MR-a, od ukupno 50 pacijenata po Reiberovom kriteriju intratekalna sinteza dokazana je za 31 pacijenta od kojih 5 ima disfunkcionalnu KLB, što je prikazano u Tablici 8.

Tablica 8. *Očuvanost KLB kod CIS, ONB, D-CIS i D-MS pacijenata*

Dijagnoza	**Tipovi po Reiberu**				**Udio intratekalne sinteze**	**p vrijednost**
	1	**2**	**3**	**4**		
CIS (n = 101)	36	21	8	36	43,5 %	< 0,0001
ONB (n = 50)	44	6	0	0	0 %	
D-CIS (n = 51)	24	14	3	10	25,4 %	0,003
D-MS (n = 50)	12	7	5	26	62 %	

CIS - skupina s dijagnozom klinički izolirani sindrom na početku istraživanja; D-MS - podskupina izdvojena iz CIS skupine koja se konvertirala u multiplu sklerozu; D-CIS - podskupina koja se nije konvertirala u toku 2 godine; ONB - kontrolna skupina ostalih neuroloških bolesti; 1 = očuvana KLB; 2 = disfunkcija KLB bez intratekalne sinteze; 3 = disfunkcija KLB uz intratekalnu sintezu; 4 = očuvana KLB uz intratekalnu sintezu; KLB-krvno-likvorska barijera

4.3. Ukupni, oligoklonski i slobodni laki lanci imunoglobulina G u krvi i likvoru

Svi pacijenti s CIS-om imali su laboratorijske dokaze o oligoklonskim imunoglobulinima (OB) prema međunarodnom dogovoru (66) s nalazima Tip 2 (n = 46) ili Tip 3 (n = 55). U ONB skupini nisu nađene OB vrpce u CSF-u ni u serumu te su nalazi interpretirani kao Tip 1, a IgG_{indeks} bio je u normalnom području < 0,6 (96). Nakon dvije godine praćenja (kontrolni pregledi i ponovljeni MR) za 51 pacijenta nije opovrgnuta dijagnoza CIS-a (skupina D-CIS), a za drugih 50 (skupina D-MS) ustanovljena je dijagnoza MS-a prema McDonaldovim kriterijima (52). Među njima bili su zastupljeni Tip 2 (n = 25), Tip 3 (n = 25). Pacijenti u skupinama CIS, D-CIS i D-MS pokazali su značajno više koncentracije $KFLC_{CSF}$, Q_{KFLC}, $KFLC_{indeks}$ i IgG_{indeks} u odnosu na kontrolnu skupinu (p < 0,0001) (Tablica 9). Udio nalaza KFLC ispod granice kvantifikacije (< 0,18 mg/L) također se značajno razlikovao (14/101 u CIS *vs* 41/50 u ONB; p < 0,0001). Koncentracije $KFLC_{serum}$ ne razlikuju se između CIS i ONB te D-CIS i D-MS skupine, (p = 0,474 i 0,237) što se može objasniti istovjetnim sistemskim odgovorom.

Tablica 9. *Laboratorijska mjerenja za ukupne i slobodne lake lance te njihove izvedenice*

	CIS	**ONB**	**p vrijednost**	**D-CIS**	**D-MS**	**p vrijednost**
IgG CSF, g/L	0,041 (0,028-0,065)	0,023 (0,016-0,031)	< 0,0001	0,035 (0,026-0,049)	0,051 (0,033-0,067)	0,0105
Q_{IgG}	3,85 (2,70-5,59)	2,07 (1,37-2,51)	< 0,0001	3,25 (2,48-4,50)	4,54 (2,94-5,95)	< 0,0001
IgG_{indeks}	0,569 (0,486-0,744)	0,486 (0,475-0,542)	< 0,0001	0,588 (0,490-0,733)	0,751 (0,595-0,998)	< 0,0001
$KFLC_{CSF}$, mg/L	1,17 (0,37-4,67)	0,17 (0,17-0,17)	< 0,0001	0,68 (0,21-2,29)	2,01 (0,89-5,57)	< 0,0001
$KFLC_{serum}$, mg/L	11,10 (9,09-15,42)	12,75 (9,20-15,00)	0,474	11,20 (9,77-15,88)	10,25 (9,04-14,60)	0,237
Q_{KFLC}	0,120 (0,023-0,320)	0,014 (0,010-0,020)	< 0,0001	0,049 (0,017-0,203)	0,190 (0,090-0,520)	< 0,0001
$KFLC_{indeks}$	22,62 (5,68-64,57)	3,71 (2,88-5,23)	< 0,0001	9,68 (3,31-34,96)	33,52 (14,95-98,06)	< 0,0001

CIS - skupina s dijagnozom klinički izolirani sindrom na početku istraživanja; D-MS - podskupina izdvojena iz CIS skupine koja se konvertirala u multiplu sklerozu; D-CIS - podskupina koja se nije konvertirala u toku 2 godine; ONB - kontrolna skupina ostalih neuroloških bolesti; KFLC - kapa slobodni laki lanci; Q_{KFLC} = kvocijent $KFLC_{CSF}/KFLC_{serum}$; $KFLC_{indeks} = Q_{KFLC}/Q_{Alb}$; $IgG_{indeks} = Q_{IgG}/Q_{Alb}$; Vrijednosti su izražene u medijanu i interkvartilnom rasponu.

4.4. ASI kvocijent na neurotropne viruse i Borreliju Burgdorferi

Kao što je prikazano u Tablici 10., pozitivna MRZ reakcija na dva ili više virusa (MRZR-2) gdje su vrijednosti ASI indeksa bile veće od 1,5, nađena je u 15 pacijenata s CIS-om među kojima je za 7 utvrđena konverzija u MS. MRZR-2, iako se drži dodatnim doprinosom u dijagnostici MS-a (104), zastupljen je podjednako u D-CIS i D-MS skupini te u ovom istraživanju ne možemo pokazati doprinos diferencijalnoj dijagnostici.

ASI indeks za Borreliu pozitivan je bio samo u 3 pacijenta u CIS skupini od kojih su dva konvertirala u MS. Stoga, nije potvrđen njegov doprinos dijagnostici ni kod CIS-a ni MS-a.

Tablica 10. *ASI kvocijent na neurotropne viruse i Borreliju Burgdorferi kod pacijenata D-CIS i D-MS*

	CIS (n=101)	**D-CIS (n=51)**	**D-MS (n=50)**	**p vrijednost**
MRZR-2	15	8	7	1,00
ASI indeks Borrelia >1,5	3	1	2	1,00

CIS - skupina s dijagnozom klinički izolirani sindrom na početku istraživanja; D-MS - podskupina izdvojena iz CIS-a koja se konvertirala u multiplu sklerozu; D-CIS - podskupina koja se nije konvertirala u toku 2 godine; ONB - kontrolna skupina ostalih neuroloških bolesti; MRZR-2 - pozitivan imunosni odgovor MRZ reakcije za 2 ili više virusa; ASI indeks Borrelia - Antibody Specificity Index za Borreliu Burgdorferi; p-vrijednost odnosi se na usporedbu CIS i MS skupina

4.5. Nalazi magnetske rezonancije

Pomoću nalaza MR-a kod 18 pacijenata u skupini s CIS-om pronađene su lezije koje nisu ispunile tipični DIS kriterij dok za 20 pacijenata nisu dokazane lezije. Kod ostala 63 pacijenta evidentirane su u najvećoj mjeri multiple demijelinizacijske lezije. Imbibicija kontrasta utvrđena je samo u 17 pacijenata. Pregledom MR nalaza u 50 pacijenata koji su poslije, u vremenu do dvije godine, razvili nedvojbeni MS utvrđena je najveća zastupljenost multiplih lezija (n = 40), dok je imbibicija pratila manji dio pacijenata (n = 11). MR nalazi ONB skupine nisu potvrdili ni jednu imbibiciju, prevladavali su nalazi bez lezija (n = 35), a samo za 6 pacijenata utvrđene su lezije koje uz kliničku sliku i laboratorijske nalaze nisu bile potvrda za dijagnozu CIS-a. Rezultati usporedbe D-CIS i D-MS skupine u odnosu na zastupljenost specifičnih karakteristika MR nalaza prikazani su u Tablici 11. Vidljivo je da su razlike statistički upečatljive, ali treba naglasiti da je unatoč tomu za kliničko promišljanje u praksi važan podatak da su ključne karakteristike MR nalaza registrirane u obje skupine.

Tablica 11. *Nalazi MR mozga i vratne kralježnice*

	CIS (n = 101)	**ONB (n = 50)**	**p vrijednost**	**D-CIS (n = 51)**	**D-MS (n = 50)**	**p vrijednost***
Demijelinizacijske lezije						
Bez lezija, n	20	35	< 0,0001	17	3	< 0,0001
1-2 lezije, n	9	1		3	6	
Multiple lezije, n	54	5		14	40	
Lezije koje nisu ispunile tipični DIS kriterij, n	18	9		17	1	
Aktivnost lezija						
Imbibicija kontrastnog sredstva, n	17	0	< 0,0001	6	11	0,0023

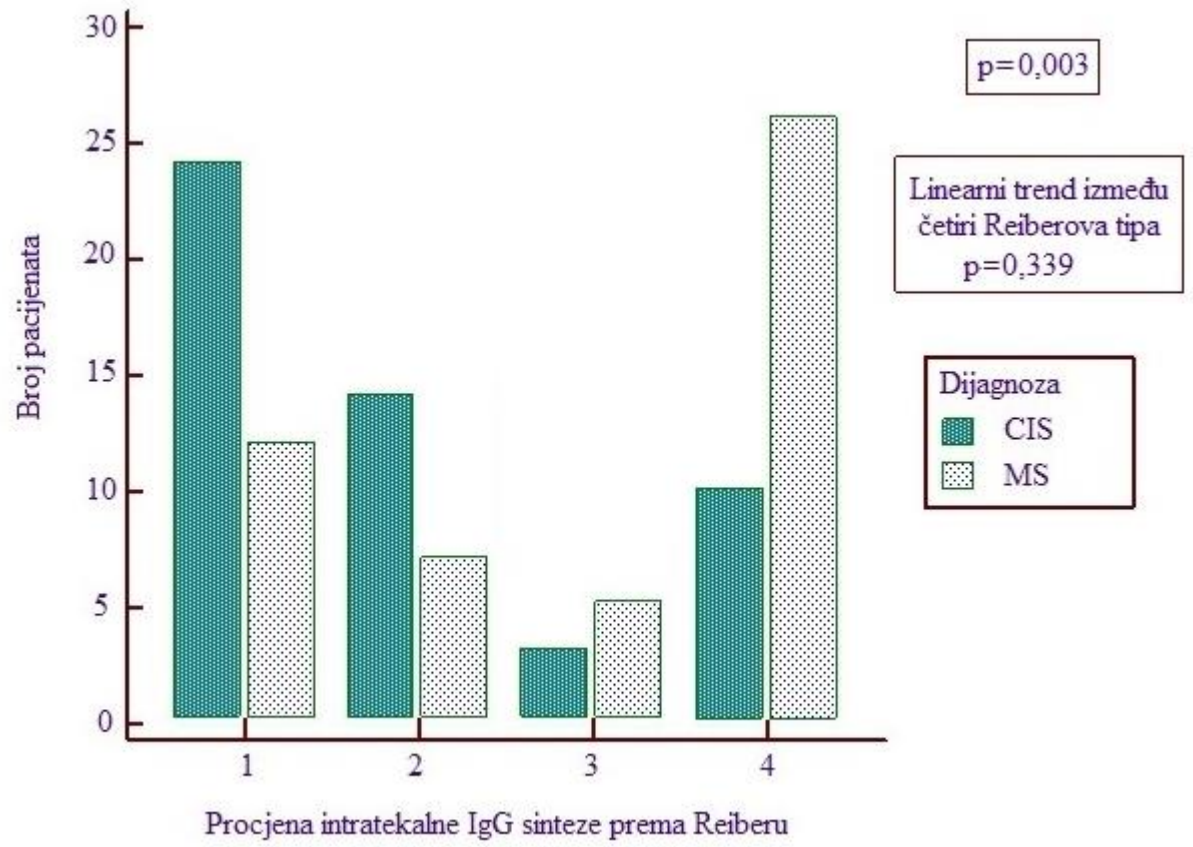
CIS - skupina s dijagnozom klinički izolirani sindrom na početku istraživanja; D-MS - podskupina izdvojena iz CIS-a koja se konvertirala u multiplu sklerozu; D-CIS - podskupina koja se nije konvertirala u toku 2 godine; ONB - kontrolna skupina ostalih neuroloških bolesti; DIS – diseminacija u prostoru

4.6. Usporedbe i korelacije

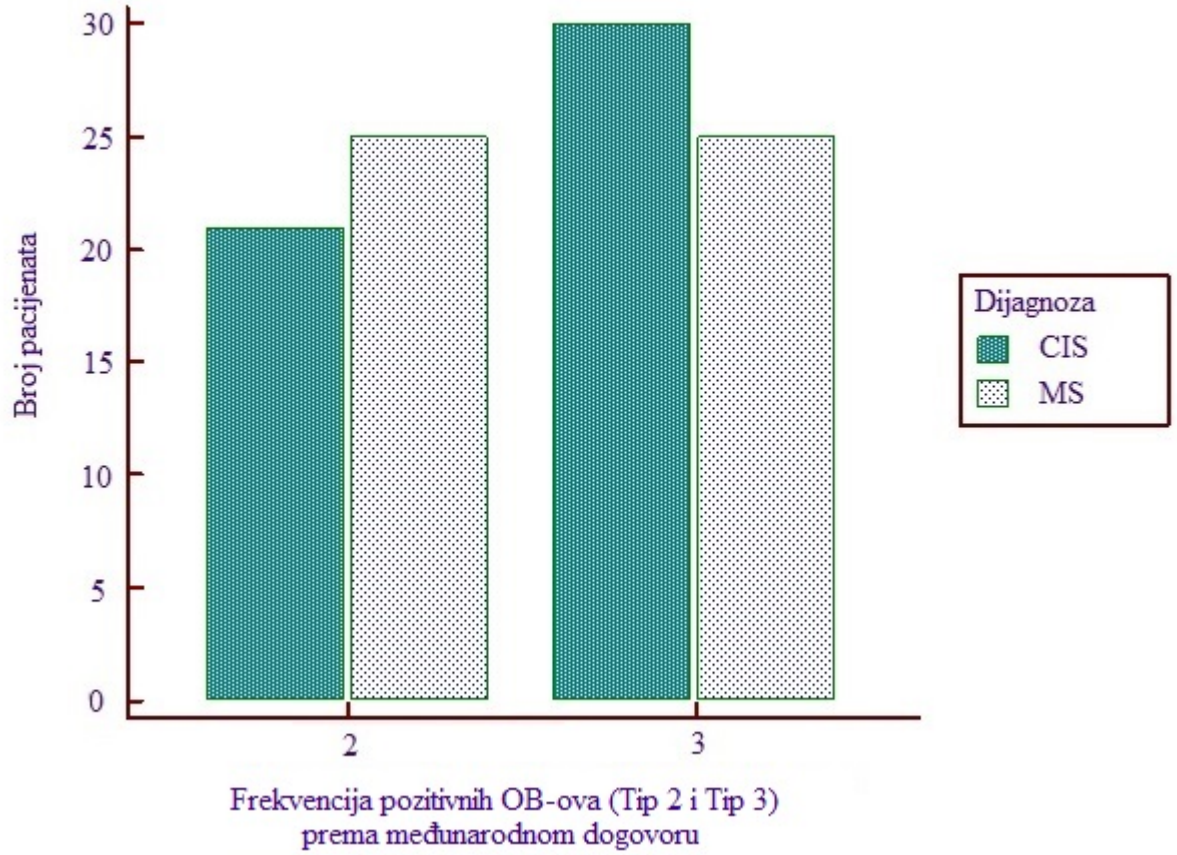
Usporedba udjela pozitivnih nalaza intratekalne sinteze po Reiberovom modelu s nalazima OB-a u CIS skupini pokazuju podudarnost tek u 43,5 %. U D-MS skupini nalaze bez intratekalne sinteze ima čak 19 pacijenata što je nešto bolja podudarnost (62 %). Razdioba tipova po Reiberu unutar skupina D-CIS i D-MS prikazana je na Slici 6. Frekvencije se statistički razlikuju ($p = 0,003$) i može se uočiti veća zastupljenost nalaza intratekalne sinteze (kategorije 3 i 4) u D-MS skupini, ali ne postoji linearni trend dinamike promjena frekvencije između četiri Reiberova tipa ($p = 0,339$). Udio pozitivnih OB nalaza Tipa 2 i Tipa 3 po međunarodnom dogovoru (66) ne razlikuje se između D-MS i D-CIS skupine ($p = 0,489$), kako je prikazano na Slici 7.

Usporedba medijana između skupina ONB, D-CIS i D-MS za $KFLC_{indeks}$ (M = 3,71; 9,68; 33,52) i IgG_{indeks} (M = 0,486; 0,588; 0,751) Kruskal-Wallisovim testom pokazuje značajnu razliku ($p < 0,0001$) (Slika 8A. i 8B.), a isto je pokazala usporedba medijana za $KFLC_{CSF}$ (0,17; 0,68; 2,01) i Q_{KFLC} (0,014; 0,049; 0,190). Vrijednosti IgG_{indeks} i KFLC pokazatelja sortirani u klastere Tipa 1, 2 i 3 prema međunarodnom dogovoru pokazuju Kruskal-Wallisovim testiranjem statistički značajne razlike s $p < 0,0001$, ali *post-hoc* testiranjem utvrđeno je da se razlike odnose na Tip 1 : Tip 2 i Tip 1 : Tip 3, a nije nađena razlika između vrijednosti IgG_{indeks}, $KFLC_{indeks}$, Q_{KFLC} i $KFLC_{CSF}$ grupiranih u Tip 2 i Tip 3 ($p = 0,388$; 0,595; 0,152; 0,062).

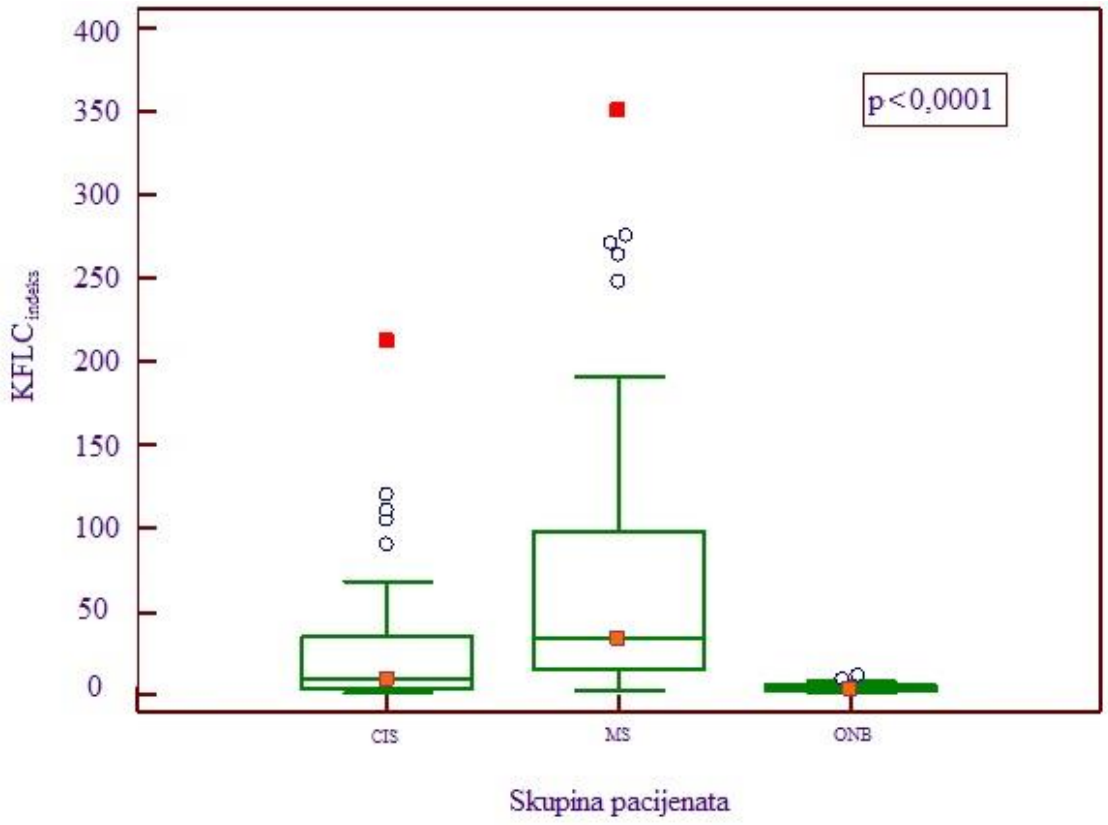
Vrlo dobru i statistički značajnu ($p < 0,0001$) korelaciju po Spearmanu pokazali su odnosi između $KFLC_{indeks}$, Q_{KFLC}, $KFLC_{CSF}$ i IgG_{indeks} ($r = 0,802$; 0,761 i 0,784) što upućuje na zaključak da je KFLC proporcionalna frakcija IgG-a. Izvrsna i statistički značajna ($p < 0,0001$) korelacija nađena je između KFLC pokazatelja međusobno ($r = 0,841$; 0,910; 0,928) što pripisujemo matematičkoj povezanosti izvedenica KFLC pokazatelja usprkos promjenjivosti nazivnika.



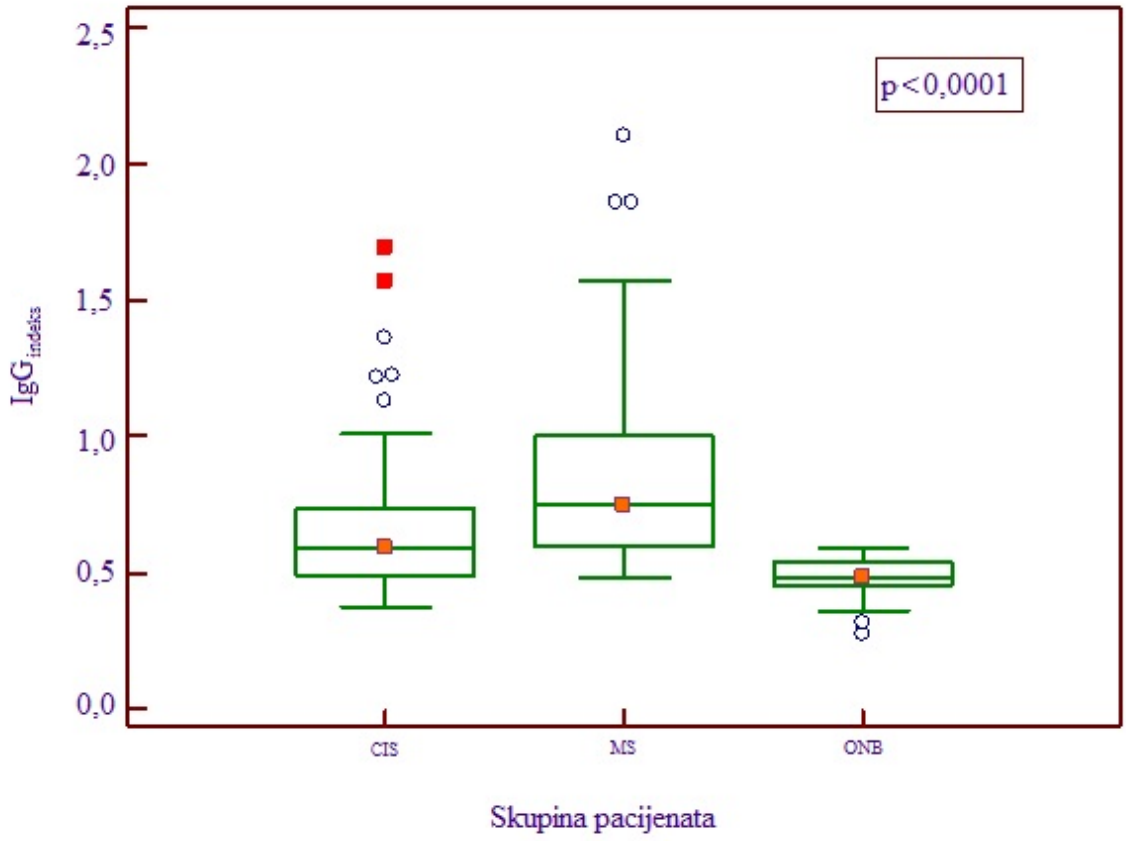
Slika 6*. Razdioba tipova po Reiberu za procjenu očuvanosti KLB-a i intratekalne sinteze u skupini s CIS-om i u skupini s MS-om. 1 - normalan nalaz očuvanog KLB-a bez intratekalne sinteze; 2 - disfunkcija KLB-a bez intratekalne sinteze; 3 - disfunkcija KLB-a uz intratekalnu sintezu 4 - očuvan KLB uz intratekalnu sintezu;*



Slika 7. *Razdioba pozitivnih nalaza OB-ova po međunarodnom dogovoru u skupini s CIS-om i u skupini s MS-om. OB - oligoklonske vrpce imunoglobulina; 2 - Tip 2, intratekalna sinteza s više OB-ova; 3 - Tip 3, intratekalna sinteza s više OB-ova od kojih su neke i u serumu*



Slika 8A. *Medijani i rasponi $KFLC_{indeks}$ u skupinama MS, CIS i ONB. Kvadrati predstavljaju interkvartilni raspon, unutar njega je medijan kao linija, a vanjske horizontalne linije čine minimalne i maksimalne veličine izvan kojih su prikazane isključene vrijednosti koje odstupaju od zadnje kvartile +/- 1,5 ili 3 x od interkvartilnog raspona.*



Slika 8B. *Medijani i rasponi IgG_{indeks} u skupinama MS, CIS i ONB. Kvadrati predstavljaju interkvartilni raspon, unutar njega je medijan kao linija, a vanjske horizontalne linije čine minimalne i maksimalne veličine izvan kojih su prikazane isključene vrijednosti koje odstupaju od zadnje kvartile +/- 1,5 ili 3 × od interkvartilnog raspona.*

4.7. Dijagnostička točnost imunoglobulinskih parametara

ROC statističkom metodom analizirali smo dijagnostička i prediktivna svojstva KFLC parametara za dijagnostiku intratekalne sinteze i za dijagnostiku MS-a. Osim osjetljivosti i specifičnosti, određeni su i +LR, -LR, +PV i -PV. Prediktivne su vrijednosti, osobito +PV, izrazito ovisne o prevalenciji bolesti. Visoka prevalencija MS (33,1 %) u skupini ispitanika koji su kod prijema imali iste simptome, izgubila bi dijagnostičku snagu u primjeni u odnosu na prevalenciju MS u hrvatskoj populaciji koja iznosi 25-53/100 000 stanovnika, a u Gorskom Kotaru 173/100 000 stanovnika (17).

Budući da su svi ispitanici MS i CIS skupine imali pozitivne OB-ove, ROC analiza uključila je rezultate svih pozitivnih OB-ova kao zlatni standard, nasuprot ONB-u, da bi procijenili sposobnost KFLC-a u detekciji intratekalne sinteze. Usporedba ROC krivulja (Slika 9.) pokazala je statistički značajne razlike za: $KFLC_{CSF}$ *vs* $KFLC_{indeks}$ (p = 0,0186) i Q_{KFLC} *vs* $KFLC_{indeks}$ (p = 0,0351). Površine ispod krivulja (AUC) iznose 0,839; 0,851; 0,891 i 0,900 redom za $KFLC_{indeks}$, IgG_{indeks}, Q_{KFLC} i $KFLC_{CSF}$. Rezultati ROC analize za svaki marker posebno prikazani su u Tablici 12. Najbolji AUC pokazali su Q_{KFLC} i $KFLC_{CSF}$, a budući da se međusobno ne razlikuju statistički (p = 0,6120), krivulja izbora je Q_{KFLC} (granična vrijednost Q_{KFLC} > 0,027) koji u svojem izrazu uključuje serumski KFLC kao korekciju moguće pasivne difuzije. Ostale značajke ROC analize pokazale su vrlo dobru specifičnost što podrazumijeva vrlo mali broj lažno pozitivnih nalaza (1 za $KFLC_{indeks}$ do 4 za $KFLC_{CSF}$) i sigurnost uključivanja. Navedeno potvrđuju poželjne (> 10) vrlo visoke +LH vrijednosti kao i +PV koji je za $KFLC_{indeks}$ blizu vrijednosti 99 %. Međutim, lažno negativne vrijednosti premašuju 20, a za IgG čak dosežu 37. Osjetljivost testa nije zadovoljavajuća i u kliničkoj primjeni bi se suočila s većim brojem lažno negativnih nalaza intratekalne sinteze te bi izostao kriterij isključivanja što potvrđuje niska –PV vrijednost i visoka –LH vrijednost koja nema prave valjanosti ako nije < 0,1.

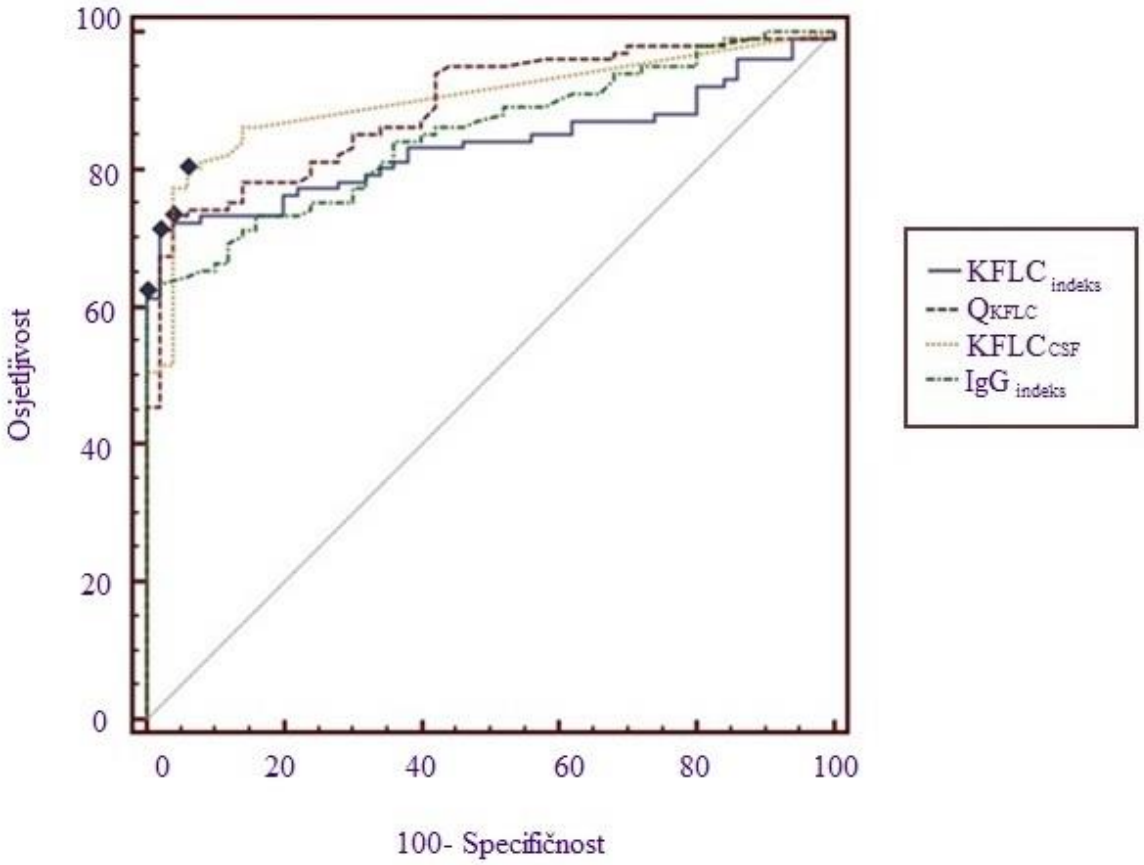
Usporedba ROC krivulja za ocjenu dijagnostičke točnosti MS-a pokazala je da među markerima $KFLC_{CSF}$, Q_{KFLC}, $KFLC_{indeks}$ i IgG_{indeks} nema statistički značajne razlike (p = 0,746; 0,599; 0,629, 0,160; 0,434; 0,932; AUC = 0,831; 0,845; 0,840; 0,829, redom) što znači da imaju podjednak doprinos dijagnostici (Slika 10.). Načelnu prednost dajemo $KFLC_{indeks}$ zbog mogućnosti korekcije disfunkcionalnosti KLB-a. Pokazao je AUC 0,840 i graničnu vrijednost > 9,092 (Tablica 12.). AUC površine značajno su različite od 0,5, ali nedovoljne dijagnostičke snage jer na graničnoj vrijednosti ostvaruju dobru osjetljivost, ali slabiju dijagnostičku specifičnost što rezultira većim brojem lažno pozitivnih dijagnoza. U

ovom istraživanju mogao bi se primijeniti samo kriterij isključivanja jer je evidentirano svega 2 do 6 lažno negativnih nalaza. IgG_{indeks} pokazao je najslabiju dijagnostičku točnost, LH i PV, iako nije statistički značajno.

Tablica 12. *Dijagnostička točnost kapa lakih lanaca u MS-u i CIS-u*

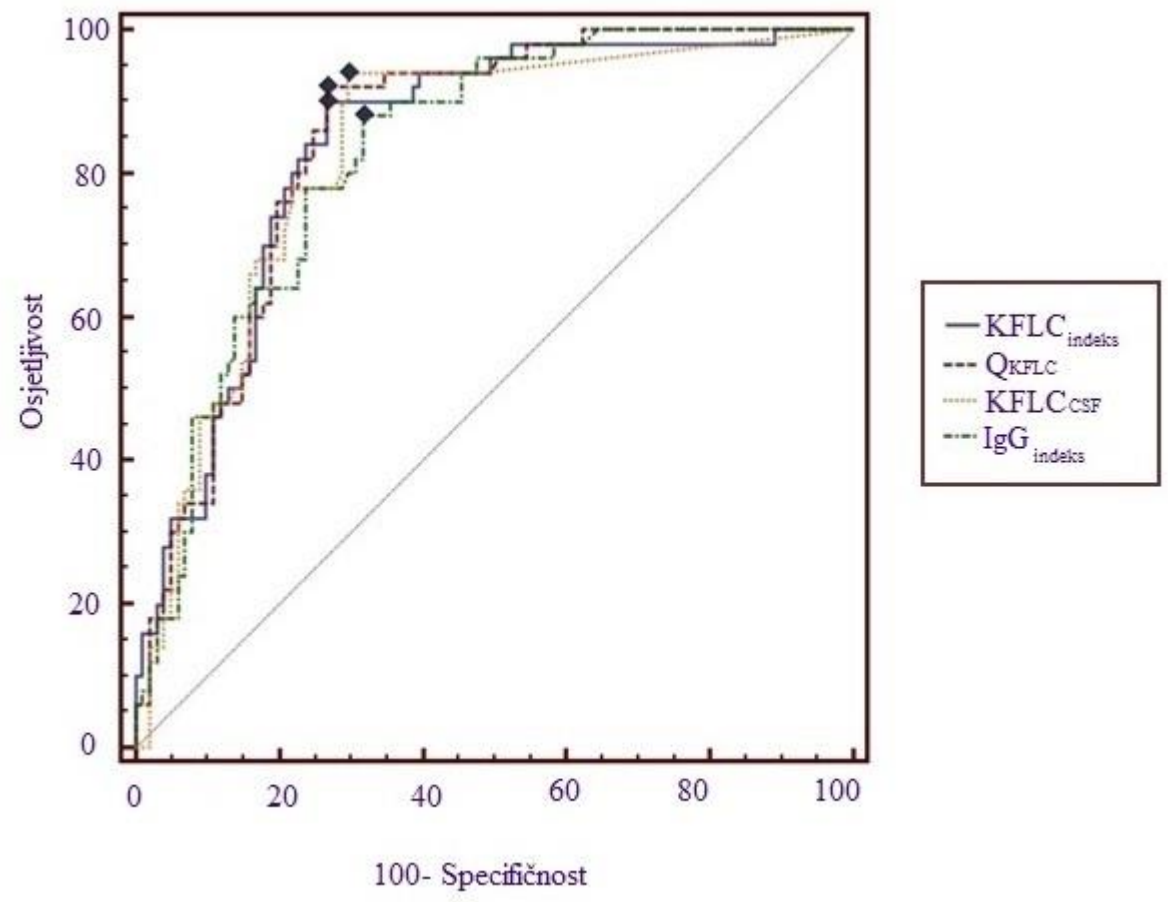
Biokemijski marker	AUC/granična vrijednost	Osjetljivost, %	Specifičnost, %	+LH	-LH	+PV, %	-PV, %
Točnost detekcije intratekalne sinteze u odnosu na OB (n = 151)							
$KFLC_{CSF}$, mg/L	0,900/0,280	80,0	94,0	13,4	0,20	96,4	70,1
Q_{KFLC}	0,891/0,027	73,2	96,0	18,3	0,28	97,4	64,0
$KFLC_{indeks}$	0,839/8,820	71,3	98,0	35,64	0,29	98,6	62,8
IgG_{indeks}	0,851/0,588	63,4	98,0	31,6	0,37	98,5	57,0
Dijagnostička točnost za MS u odnosu na revidirane kriterije McDonald 2010 (n = 151)							
$KFLC_{CSF}$, mg/L	0,831/0,380	94,0	70,3	3,16	0,085	61,0	95,9
Q_{KFLC}	0,845/0,049	92,0	73,3	3,44	0,11	63,0	94,9
KFLC indeks	0,840/9,092	90,0	73,3	3,37	0,14	62,5	93,7
IgG_{indeks}	0,829/0,566	88,0	68,3	2,78	0,18	57,9	92,0

OB - oligoklonske vrpce imunoglobulina; $KFLC_{CSF}$ - kapa slobodni laki lanci u CSF-u; Q_{KFLC} = kvocijent $KFLC_{CSF}/KFLC_{serum}$; $KFLC_{indeks} = Q_{KFLC}/Q_{Alb}$; $IgG_{indeks} = Q_{IgG}/Q_{Alb}$; AUC - površina ispod ROC krivulje; +LH i –LH - pozitivan i negativan omjer vjerojatnosti; ROC – engl. Receiver Operating Characteristic, statistička metoda za određivanje dijagnostičke točnosti; +PV i –PV - pozitivna i negativna prediktivna vrijednost. Granične vrijednosti određene su prema Youdenovoj metodi za definiranje optimalne vrijednosti proizašle iz ROC analize.



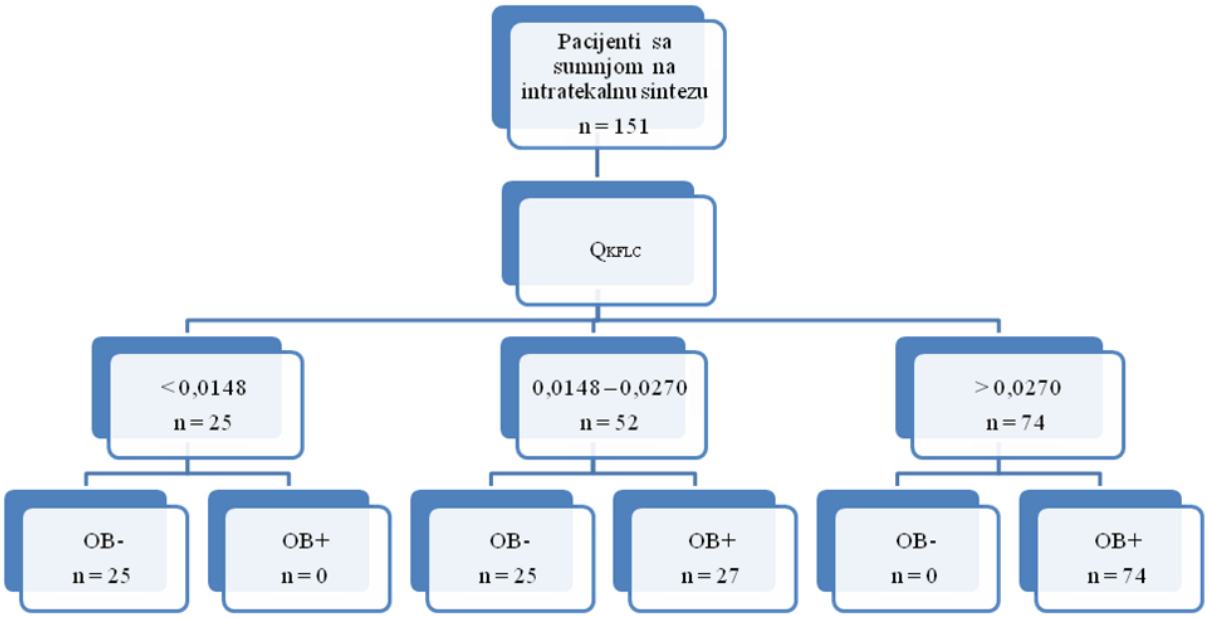
Slika 9. *Usporedba ROC krivulja za predviđanje intratekalne sinteze.*

ROC – engl. Receiver Operating Characteristic, statistička metoda za određivanje dijagnostičke točnosti; KFLC - slobodni laki lanci kapa tipa; CSF - cerebrospinalna tekućina; Q_{KFLC} *= kvocijent* $KFLC_{CSF}/KFLC_{serum}$*;* $KFLC_{indeks} = Q_{KFLC}/Q_{Alb}$*;* $IgG_{indeks} = Q_{IgG}/Q_{Alb}$



Slika 10. *Usporedba ROC krivulja za ocjenu dijagnostičke točnosti MS-a. ROC - Receiver Operating Characteristic, statistička metoda za analizu dijagnostičke točnosti; KFLC - slobodni laki lanci kapa tipa; CSF - cerebrospinalna tekućina;* Q_{KFLC} *= kvocijent* $KFLC_{CSF}/KFLC_{serum}$*;* $KFLC_{indeks} = Q_{KFLC}/Q_{Alb}$*,* $IgG_{indeks} = Q_{IgG}/Q_{Alb}$*,*

Na Slici 11. prikazan je dijagram toka za predviđanje intratekalne sinteze putem vrijednosti Q_{KFLC}. Iz analitičke tablice ROC analize „Criterion values and coordinates of the ROC curve“ izolirane su dvije granične vrijednosti Q od kojih jedna vrijednost (0,0148) ima 95 % ili višu osjetljivost, neovisno o specifičnosti dok druga vrijednost (0,0270) ima 95 % ili višu specifičnost, neovisno o osjetljivosti. Nesigurni rezultati našli su se u intervalu od 0,0148 do 0,0270 te su na ovaj način dobivene dvije granične vrijednosti ispod/iznad kojih nema lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata. Sve vrijednosti Q_{KFLC} ispod 0,0148 i iznad 0,0270 (65 %) mogle bi isključiti izvođenje IEF s imunofiksacijom u detekciji OB (113).



Slika 11. *Dijagram toka za predviđanje intratekalne sinteze.*

Q_{KFLC} = kvocijent $KFLC_{CSF}/KFLC_{serum}$; OB- = odsutnost oligoklonskih vrpci; OB+ = prisutnost oligoklonskih vrpci; Vrijednost Q_{KFLC} 0,0148 = 95 % osjetljivost (56 % specifičnost) vrijednost 0,027 = 96 % specifičnost (72 % osjetljivost)

4.8. Matematički model za predviđanje konverzije klinički izoliranog sindroma

Logističkom regresijom obrađeni su podaci prikupljeni za 101 ispitanika od kojih 51 su bili D-CIS, a 50 D-MS pacijenti. Za sve ispitanike izmjereno je ukupno 30 varijabli: dob, $KFLC_{CSF}$, $KFLC_{serum}$, Q_{KFLC}, $KFLC_{indeks}$, IgG CSF, glukoza, IgG_{indeks}, Q_{IgG}, ukupan broj stanica u CSF-u, eritrociti u CSF-u, laktat u CSF-u, glukoza u CSF-u, ukupni proteini u CSF-u, glukoza u serumu, CRP, kreatinin, AST, ALT, bilirubin, kalij, natrij, kloridi, leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit, trombociti, PV i APTV. U prvom koraku korištenjem parametrijskih i neparametrijskih statističkih testova testirane su razlike u vrijednostima svih varijabli kod 51 ispitanika s CIS-om u odnosu na 50 ispitanika s MS-om. Varijable koje nisu postigle statističku značajnost ($p < 0,05$) nisu uključene u nastavak istraživanja. Uključene varijable u ovom istraživanju bile su: dob ($p = 0,002$), $KFLC_{CSF}$ ($p < 0,0001$), Q_{IgG} ($p < 0,0001$), Q_{KFLC} ($p < 0,001$), $KFLC_{indeks}$ ($p < 0,0001$), IgG_{indeks} ($p < 0,0001$), ukupan broj stanica u CSF-u ($p = 0,005$), IgG CSF ($p = 0,0105$), CRP ($p = 0,009$), glukoza ($p = 0,009$). Budući da ni jedna varijabla nije bila značajna u punom modelu, *stepwise* procedurom testirano je više specifikacija modela višestruke logističke regresije te su izdvojeni oni koji su od interesa za ovo istraživanje.

Nakon eliminacije varijabli koje nisu postigle statističku značajnost, procijenjen je model višestruke logističke regresije kojim se dovode u vezu Q_{KFLC} s nastankom MS-a. Varijable koje se međusobno preklapaju u nekoj mjeri nije bilo primjereno istovremeno analizirati s obzirom na njihove doprinose izgledima, zbog problema multikolinearnosti ili preklapanja učinaka sličnih varijabli. Tablica 13. sadržava procijenjeni omjer izgleda i pripadajuću empirijsku razinu značajnosti za svaku nezavisnu varijablu u modelu logističke regresije.

Tablica 13. *Logistička regresija sa varijablama dob i Q_{KFLC} u skupini od 101 pacijenta*

	OR	**p**
Dob	0,945	0,002
Q_{KFLC}	6,606	0,015

OR (eng. odds ratio) - omjer izgleda, Q_{KFLC} - kvocijent slobodnih lakih kapa lanaca $Q_{KFLC} = KFLC_{CSF}/KFLC_{serum}$

Kako je prikazano u Tablici 13. obje varijable Q_{KFLC} i dob postižu statističku značajnost u predviđanju nastanka MS-a. Dob smanjuje izglede za nastanak MS-a, odnosno

povećanjem starosti za 1 godinu smanjuju se izgledi za dijagnozu MS-a 0,945 puta. Istovremenim porastom Q_{KFLC} za 1, povećavaju se izgledi dijagnoze MS-a za 6,606 puta. Promatrajući dobnu zastupljenost ispitivane skupine, rezultati se mogu u prvi mah učiniti nelogičnima. Međutim, ako se kod starijih pacijenata pojavi ova vrijednost za Q_{KFLC}, postoji mogućnost da imaju drugu bolest, ali ako se kod mlađih pacijenata pojavi ista vrijednost za Q_{KFLC}, veći je izgled za potvrdu dijagnoze MS-a.

Koristeći model višestruke logističke regresije te eliminacijom pojedinih varijabli, $KFLC_{indeks}$ se dovodi u vezu s nastankom MS-a. Procijenjeni model nalazi se u Tablici 14.

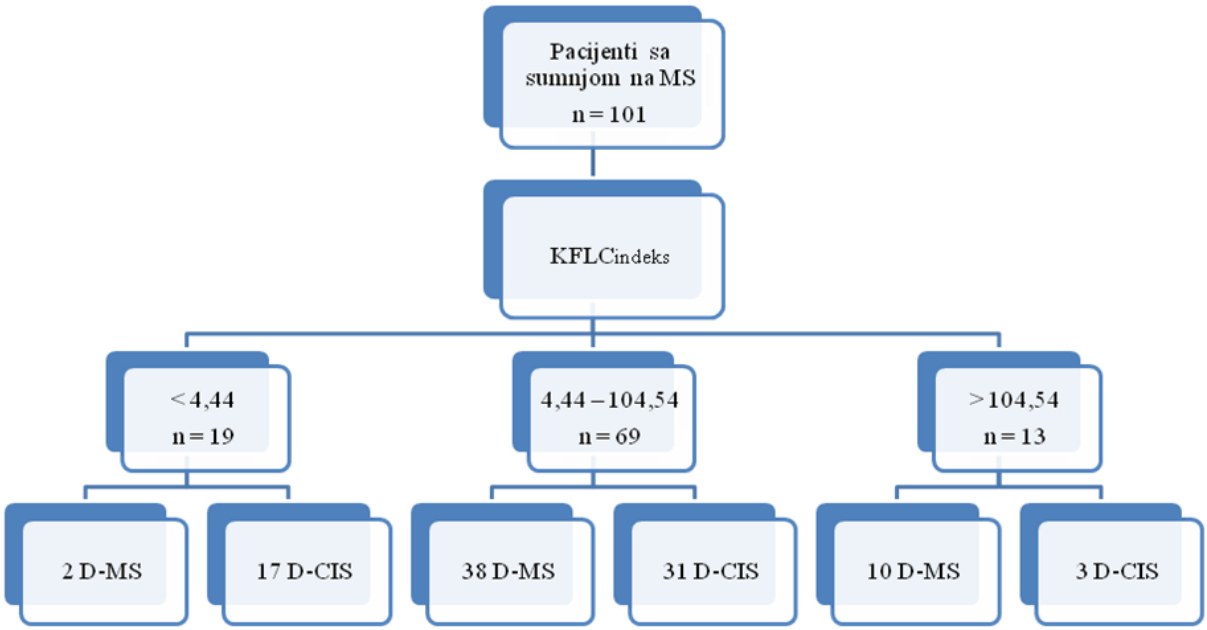
Tablica 14. *Logistička regresija s varijablama dob i $KFLC_{indeks}$ u skupini od 101 pacijenta*

	OR	**p**
Dob	0,952	0,007
$KFLC_{indeks}$	1,011	0,023

OR (eng. odds ratio) - omjer izgleda; $KFLC_{indeks} = Q_{KFLC}/Q_{Alb}$

Koristeći model višestruke logističke regresije u Tablici 14. istraživane su 2 varijable, dob i $KFLC_{indeks}$, koje se dovode u vezu s nastankom MS-a. Kako je prikazano u Tablici 14. obje navedene varijable postižu statističku značajnost u predviđanju nastanka MS-a. Dob smanjuje izglede za nastanak MS-a, odnosno povećanjem starosti za 1 godinu smanjuju se izgledi za dijagnozu MS-a za 0,952 puta. Istovremeno povećavanjem vrijednosti $KFLC_{indeksa}$ za 1 povećavaju se izgledi dijagnoze MS za 1,011 puta. Uz istu vrijednost $KFLC_{indeksa}$ kod mlađih i starijih pacijenata, stariji pacijenti imaju veće izglede za dijagnozu neke druge bolesti, koja nije MS u odnosu na mlađe pacijente.

Kao pojedinačan parametar za konverziju CIS-a u MS može se predložiti i $KFLC_{indeks}$. Na Slici 12. prikazan je dijagram toka za predviđanje konverzije CIS-a u MS kod 101 pacijenta. Iz analitičke tablice ROC analize „Criterion values and coordinates of the ROC curve“ izolirane su dvije granične vrijednosti $KFLC_{indeksa}$ od kojih jedna vrijednost (4,44) ima 95 % ili višu osjetljivost, neovisno o specifičnosti dok druga vrijednost (104,54) ima 95 % ili višu specifičnost, neovisno o osjetljivosti (113). Nesigurni rezultati našli su se u intervalu od 4,44 - 104,54. Kategorizacija prema dijagnozama, pokazala da se pacijenti sa sumnjom na CIS vjerojatno neće konvertirati u MS ako je $KFLC_{indeks}$ manji od 4,44 dok su za vrijednost između 4,44 i 104,54 izgledi bili podjednaki. Vrijednosti $KFLC_{indeksa}$ iznad 104,54 upućuju na MS dijagnozu (Slika 12.).



Slika 12. *Prikaz dijagrama konverzije CIS-a u MS prema graničnim vrijednostima za* $KFLC_{indeks.}$ *Vrijednost* $KFLC_{indeksa}$ *4,44 = 96 % osjetljivost (35 % specifičnost) vrijednost 104,54 = 96 % specifičnost (20 % osjetljivost)*

$KFLC_{indeks}$ *=* Q_{KFLC}/Q_{Alb}*; D-MS - pacijenti kojima je dijagnosticirana multipla skleroza;*

D-CIS - podskupina s klinički izoliranim sindromom koja se nije konvertirala u MS u toku 2 godine;

5. RASPRAVA

5.1. Valjanost slobodnih kapa lakih lanaca IgG-a u procjeni intratekalne sinteze

U više od dva desetljeća provedeno je više od 100 studija (evidentirane u bazi PUBMED) koje istražuju mogućnost primjene KFLC-a u kliničkoj praksi. Za to vrijeme analitičke su se metode usavršavale od poliklonskih do monoklonskih, od istraživačkih (117, 118) do onih primjenjivih za automatske analizatore s poliklonskim i monoklonskim protutijelima (94, 96, 119, 120). Istovremeno je tehnologija MR-a silno napredovala i otvorila nove mogućnosti te su se sukladno tome revidirali dijagnostički kriteriji. Za razliku od MR-a, tehnika za identifikaciju OB-ova nema mogućnosti izaći iz okvira kvalitativne metode podložne subjektivnoj interpretaciji. No, ona se još uvijek drži zlatnim standardom u dokazivanju intratekalne sinteze, unatoč dokazanim nespecifičnostima za konačnu dijagnozu MS-a (121) i prevlasti MR nalaza (52, 122) te se uvelike primjenjuje u kliničkoj praksi. Još 1942. godine Kabat i suradnici (123) su prikazali da je gama globulin bio značajno povišen u CSF-u kod pacijenata s MS-om te su kasnije pokazali da su ograničena heterogenost ili OB-ovi na elektroforezi bili prisutni u CSF-u, no ne i u serumu. Otada su mnoga istraživanja dokazala dijagnostičku vrijednost analize CSF-a kod bolesnika s MS-om, a dodatno pretrage CSF-a u određenim kliničkim situacijama mogu imati prediktivnu vrijednost (14).

Laboratorijske pretrage koje se koriste u dijagnostici MS-a uz dokazivanje OB-ova su: citološka i biokemijska analiza CSF-a, Reiberov matematički model, te MRZ reakcija. Uz prihvaćeno i smjernicama preporučeno dokazivanje intratekalne sinteze IEF metodom s imunofiksacijom sve se ozbiljnije suprostavljaju mnoga istraživanja kvantificiranja lakih lanaca imunoglobulina (67, 119, 120,124).

Oligoklonske vrpce nađu se prije nego kvantitativna procjena u Reibergramu otkrije intratekalnu sintezu IgG-a (66) pa je neobično da metoda po Reiberu još živi u laboratorijima. Iskustvo iz medicinske prakse pokazuje da nije jednostavno ni brzo isključenje ili zamjena dijela uhodanog dijagnostičkog postupka premda većina studija proizlazi iz kliničkih situacija. Osnovni je problem nedostatak referentnih intervala i graničnih vrijednosti za što je potreban veliki broj ispitanika i još puno prospektivnih studija koje neće biti kontradiktorne. U ovom istraživanju, skupina od 151 ispitanika prezentirala se s prvom neurološkom epizodom koja je trajala > 24 sata, po primitku u bolnicu bila je podvrgnuta neurološkom kliničkom pregledu i lumbalnoj punkciji, a drugog dana i MR pregledu. CSF je analiziran po Reiberovom modelu i na prisustvo OB-ova. Na temelju navedenih mjerenja definirana je

podskupina s CIS dijagnozom suspektnom na MS (n = 101). U praksi, kliničke slike i nalazi MR-a pokazuju neslaganje zbog nedovoljne patološke specifičnosti, abnormalnosti i zbog tehničke nemogućnosti MR-a da kvantificira opseg ozljeda u normalnom moždanom tkivu (125). Demonstracija upalne prirode bolesti putem CSF analize, pogotovo prisutnost intratekalnog humoralnog imunosnog odgovora koristi se već desetljećima za podršku dijagnoze MS-a unatoč činjenici da je važnost CSF analize izgubila na značaju revizijom McDonaldovih dijagnostičkih kriterija 2010. godine (52). Najnovija revizija ovog kriterija iz 2017. godine (42) ponovno je oživjela ulogu CSF analize tvrdeći da prisutnost dva ili više OB-a u CSF-u koje su ujedno odsutne u serumu, mogu zamijeniti DIT kriterij. Ako se ispune klinički dokazi i dijagnostički kriteriji, analiza CSF-a se ne mora izvoditi, no MR ne daje dokaz o upalnom porijeklu fokalnih kliničkih deficita (97), zbog čega je analiza CSF-a važna pogotovo u isključivanju drugih neuroloških bolesti. Stoga se analiza CSF-a ne može isključiti iz dijagnostike te ju valja rutinski primjenjivati u bolesnika s prvom kliničkom epizodom koja ukazuje na MS. Uz to, valja biti oprezan u dijagnostici bolesnika s negativnim MR-om ili CSF-om. Upravo u slučajevima s CIS-om gdje je MR negativan, analiza CSF-a može biti pozitivna kod više od 25 % pojedinaca, što bi također trebalo ohrabriti neurologe da prate ove pacijente zbog razvoja novih MR lezija ili kliničkih simptoma i znakova MS-a (59). Osim u diferencijalnoj dijagnostici, analiza CSF-a je vrijedna u istraživanju patogeneze MS-a i razumijevanju njezine patofiziologije. Stoga, analiziranje CSF-a ima osigurano važno mjesto u klinici i u znanstvenom istraživanju.

Poznavajući ishodište i fiziologiju CSF-a i KLB-a koja selektivno propušta tvari iz plazme, migraciju aktiviranih limfocita i eksudaciju plazmatskih proteina u likvorski prostor prepoznajemo kao upalno zbivanje (126-130). Polispecifična narav imunosnog odgovora ograničenog broja klonova B-limfocita rezultira pojavom oligoklonskih Ig-ova i FLC-a u intratekalnom prostoru. Dokazivanje oligoklonskih Ig-ova vizualizacijom OB-ova kvalitativnom tehnikom imunofiksacije predstavlja zlatni standard kojim je analiziran CSF u svih 151 ispitanika. Deklarirana analitička osjetljivost metode je 0,030 – 0,125 mg/L (37), ali odluka analitičara temeljena je na subjektivnoj vizualnoj procjeni.

Ovo istraživanje slijedilo je kliničku praksu koja će sigurno još dugo vremena slijediti Freedmanove standardne postupke (59) koji daje preporuku opsežne analize CSF-a. Freedman sa suradnicima (59) je 2005. godine kritizirao reviziju McDonaldovih kriterija iz 2001. godine (44) po pitanju ispunjenja smjernica za analizu CSF-a u odnosu na ispunjene rigorozne kriterije za MR. S druge strane kritizira izjednačavanje $IgG_{indeksa}$ kojeg McDonaldovi kriteriji (44) drže jednakovrijednim s OB-om jer u kvantitativnoj analizi svaki pacijent se uspoređuje s

velikom populacijom te postoji široki referentni interval proteina u CSF-u koji potječu iz krvi, dok u kvalitativnoj analizi uzorak IgG-a u CSF-u svakog pacijenta se uspoređuje s uzorkom seruma istog pacijenta. S druge strane hiperbolične i eksponencijalne funkcije koje opisuju sintezu IgG-a u CSF-u su klinički ekvivalentne te su obje preciznije nego pojednostavljeni IgG_{indeks}. Kvantitativna analiza IgG-a smatra se informativnim dopunskim testom te ne predstavlja zamjenu za kvalitativnu IgG procjenu, koja ima najvišu osjetljivost i specifičnost (59). Dugogodišnja istraživanja dokazuju da prisustvo OB-ova povećava rizik od konverzije CIS-a u MS (131-133). I u ovom istraživanju, skupina ispitanika može se smatrati rizičnom jer se u roku dvije godine za polovicu njih utvrdila nedvosmislena klinička dijagnoza MS. McDonaldovi kriteriji iz 2010. (52) godine CSF analizu uključuju kao OB ili IgG_{indeks}. Skupina ispitanika u ovom istraživanju pokazuje značajno različite rezultate za intratekalnu sintezu. Pozitivan nalaz OB-a podudara se s Reiberovim modelom samo za 43,5 % pacijenata s CIS-om, što znači da ocjena rizika za te pacijente nije pouzdana. Frekvencija nalaza normalnog, disfunkcionalnog KLB-a i intratekalne sinteze značajno se razlikovala između skupina D-CIS i D-MS zbog 60 % pozitivnih nalaza intratekalne sinteze u skupini D-MS. U ukupnosti, upućuje na nedovoljnu osjetljivost Reiberovog modela u odnosu na zlatni standard OB-a kod kojeg su tipovi 2 i 3 bili podjednako distribuirani u skupinama D-CIS i D-MS. Slično neslaganje i slabiju osjetljivost Reiberovog modela pokazale su i druge studije (96, 134-136), a puno studija dokazuje da se tek u oko 70 % pacijenata s CIS-om i 90 % pacijenata s MS-om dokaže intratekalna sinteza OB tehnikom (132, 137-139). Mogući uzroci stoje u slabijem stupnju humoralnog odgovora u ranom stupnju MS-a koji nije moguće detektirati. Ova skupina nije imala negativnih OB nalaza u D-CIS i D-MS skupini, kao ni pozitivnih u ONB skupini, što može zavesti na krivi zaključak da OB ima 100 % dijagnostičku točnost. Iako analiza CSF-a prema revidiranim McDonaldovim kriterijima (42) nije obavezna u nekim slučajevima, strogo se preporuča u slučajevima kada klinički i MR dokazi nisu dovoljni za podršku dijagnoze MS-a te bi prag za analizu CSF-a prema ovim smjernicama trebao biti nizak kako bi se povećala dijagnostička pouzdanost. U ovom istraživanju našla se potvrda za oprezan pristup jer su četiri pacijenta, koja po prethodnoj reviziji ne bi bili svrstani u CIS, razvila MS. No, neosporno je dokazano da u zapadnoj hemisferi do 10 % bolesnika s MS-om pokazuju negativne OB-ove, a još i više u istočnoj hemisferi. Također, i druga neurološka stanja i bolesti mogu biti praćena s OB nalazima (121, 137, 138). Ustroj ove skupine ne pokazuje potpuno realno stanje, već predstavlja čiste skupine u odnosu na promatrani zlatni standard OB-a, za koji se utvrđivalo u kojoj mjeri korespondira s KFLC-om.

Intratekalna sinteza ne događa se u normalnim uvjetima što sugerira da je prisutnost niskih koncentracija Ig-ova i KFLC-a u normalnom CSF-u rezultat njihove difuzije iz krvi kroz KLB. KFLC se općenito sintetiziraju u višku u odnosu na teške lance tijekom sinteze Ig-ova (140). Stoga se porast KFLC-a u CSF-u može očekivati u slučaju bilo kakvog humoralnog imunosnog odgovora te kao rezultat KFLC bi mogao biti manje specifičan za MS nego OB-ovi. OB-ovi također nisu isključivo specifični za MS te se mogu pojaviti i u drugim upalnim stanjima SŽS pogotovo kroničnim stanjima kao neurosifilis, neuroborelioza, HIV, infekcije i paraneoplastični sindromi SŽS-a (140).

U ovom istraživanju, koncentracije KFLC-a i IgG-a te njihovi omjeri i indeksi, statistički su se značajno razlikovali između skupina ONB, D-CIS, i D-MS prilikom čega su se vrijednosti parametara KFLC-a i IgG-a pokazale značajno više u D-MS skupini u odnosu na preostale dvije skupine što je u suglasju s mnogim radovima (93, 95, 96, 132, 134, 135, 141, 142). Između koncentracija KFLC-a i IgG-a kod pozitivnih OB-ova u Tipu 2 i Tipu 3 nije bilo značajne razlike. Rezultat podupire stav svih autora radova da pozitivne OB-ove definiraju s > 2 OB-a ne praveći razliku između Tipa 2 i 3 definiranih prema međunarodnom dogovoru (66). Pojedina istraživanja navode da bi se KFLC parametri, prije obrade OB-a, mogli koristiti kao prvi probirni test u dijagnostičkim algoritmima za dijagnozu MS-a (97, 113, 143), dok drugi navode da je $KFLC_{CSF}$ bitan marker intratekalne sinteze imunoglobulina te da je ekvivalentan oligoklonskom IgG-u, što bi omogućilo njegovu potpunu zamjenu i uvođenje u rutinsku dijagnostičku praksu (144, 145). Zamjena OB-a sa apsolutnom koncentracijom $KFLC_{CSF}$ predstavlja brzu, automatiziranu i kvantitativnu metodu (37, 113, 144, 145). Također svi se slažu da bi određivanje KFLC parametara moglo dodatno reducirati vrijeme obrade, omogućiti brže očitanje rezultata te imati korisne ekonomske učinke. Unatoč svim prednostima koje se navode za $KFLC_{CSF}$, ovaj test se još uvijek rutinski ne koristi u kliničkoj praksi. Nedostaci nefelometrijskog testa su povezani s turbiditetom uzorka i s prisustvom heterofilnih antitijela, što bi moglo rezultirati pogreškama u rezultatima (113). Prema Senelu i suradnicima (37), kvantitativni $KFLC_{CSF}$ nije pouzdan u klasifikaciji humoralne reakcije u odnosu na dokazivanje poli-, oligo- ili monoklonskog podrijetla, već je samo siguran dokaz intratekalnog humoralnog imunosnog odgovora.

U ovom istraživanju dokazano je da $KFLC_{CSF}$ i Q_{KFLC} najbolje predviđaju intratekalnu sintezu kod graničnih vrijednosti od 0,280 i 0,027. Q_{KFLC} bi se mogao preporučiti za korigiranje povišenih koncentracija KFLC-a u serumu. Mjerenje KFLC pokazatelja bi moglo unaprijediti dijagnostiku, iako nije racionalno primijeniti obje metode za sve bolesnike. Također, prema ovom istraživanju, moglo bi se pridružiti mišljenju onih autora koji predlažu

mjerenje KFLC parametara u probiru (97, 113), a određivanje OB-a bi se moglo primijeniti samo u nerazjašnjenim kliničkim slučajevima. U skladu s drugim istraživanjima, i ovo istraživanje je ukazalo na prednosti analize KFLC-a u odnosu na OB, a to su: značajno brže vrijeme izvedbe testa, pouzdanija analitika koja se može standardizirati, manji zahtjev prema osoblju podložnom subjektivnoj procjeni te pouzdanija analitička kontrola kvalitete, osobito unutarnja. Iako su isprva cijene KFLC testova bile do 30 % skuplje u odnosu na IEF, danas su te cijene ujednačene. Iako je $KFLC_{CSF}$ već uvelike zastupan za primjenu u kliničkoj praksi, pitanje je predstavlja li on prikladnu zamjenu za OB test te hoće li budući McDonaldovi kriteriji spomenuti intratekalnu KFLC sintezu kao moguću alternativu za OB ili bi se možda $KFLC_{CSF}$ mogao koristiti kao probir uz dodatno korištenje OB-a u nerazjašnjenim kliničkim slučajevima. Ako daljnja istraživanja pokažu KFLC kao pouzdanu zamjenu za metodu IEF-a, može se dogoditi da nam OB-ovi posve izađu iz laboratorija, kako kaže David Zeman: „Free light chains in the cerebrospinal fluid. Do we still need oligoclonal IgG?“ (140).

Pozitivni rezultati $KFLC_{CSF}$ trebati će se interpretirati s oprezom ako je testiranje na OB negativno ili uopće nije napravljeno (140). Jedno je sigurno, unatoč nekim nedostacima, izvođenje OB testa koji u CSF analizi podržava dijagnozu MS-a, ostat će obvezno, barem do sljedeće revizije McDonaldovih kriterija.

5.2. Dijagnostička vrijednost slobodnih kapa lakih lanaca IgG

Već je dva desetljeća poznato da su KFLC parametri povećani kod pacijenata s MS-om. ROC analiza našeg istraživanja otkrila je da koncentracije $KFLC_{CSF-a}$ i Q_{KFLC-a} imaju najbolje karakteristike temeljene na području ispod krivulje, što je u skladu s Makshakovljevim istraživanjem (146). Granične vrijednosti za $KFLC_{CSF}$ i Q_{KFLC} su (AUC = 0,900) 0,280 mg/L i (AUC = 0,891) 0,027, te ovi parametri mogu najoptimalnije potvrditi nalaz intratekalne sinteze. Najvišu specifičnost, ali i najslabiju osjetljivost, pokazao je IgG_{indeks}, a granična vrijednost > 0,588 potvrdila je prihvaćenu granicu od 0,6 – 0,7 što je u skladu s drugim radovima (96, 132, 147). Podaci u ovom istraživanju, iznad svega, prikazuju da je KFLC proizvod intratekalne upale jer su koncentracije KFLC produkcije u obje CIS skupine (početna CIS skupina i ona koja se nije konvertirala u D-MS u periodu od 2 godine) bile značajno više u odnosu na ONB skupinu, što je u skladu s drugim istraživanjima (97, 146). Također pacijenti s CIS-om koji su se konvertirali u D-MS imali su značajno više koncentracije $KFLC_{CSF-a}$, nego oni koji su ostali u stadiju D-CIS što se može objasniti naglašenijim upalnim promjenama kod pacijenata s ranom konverzijom u D-MS. Međutim, kvantitativno određivanje KFLC-a ne može se koristiti za diferencijalnu dijagnozu jer odražava samo količinu upale, ali ne otkriva prirodu humoralnog odgovora niti broj klonova koji proizvode antitijela. Detekcija većih količina KFLC-a bi mogla ukazivati na veći rizik od progresije invalidnosti počevši od trenutka dijagnosticiranja MS-a, jer su se sinteza intratekalnih imunoglobulina i sinteza KFLC-a pokazali relativno stabilni s vremenom što navode neka istraživanja (146, 148).

U procjeni dijagnostičke točnosti za pacijente s MS-om u ovom istraživanju su $KFLC_{indeks}$, Q_{KFLC}, $KFLC_{CSF}$ i IgG_{indeks} pokazali podjednaku valjanost bez statistički značajne razlike među njima, s AUC vrijednostima od 0,829 – 0,845. $KFLC_{indeks}$ s graničnom vrijednosti od 9,092 (AUC = 0,840, osjetljivost 90,0 % i specifičnost 73,3 %) pokazuje srednje dobre rezultate za AUC, -PV i -LH. Njegova AUC vrijednost je značajno različita od 0,5, ali i dalje nedovoljne dijagnostičke snage jer granična vrijednost od > 9,092 ostvaruje dobru osjetljivost, ali znatno slabiju dijagnostičku specifičnost, što u konačnici može rezultirati s velikim brojem lažno pozitivnih nalaza. Rezultati ostalih studija vrlo su različiti po numeričkim iskazima i to ako se uspoređuju biokemijski markeri, ROC analiza, dizajn studija, vrijeme praćenja pacijenata, što se može pripisati metodologiji kojim je mjeren KFLC (ELISA, imunonefelometrija, polivalentno ili monovalentno protutijelo) (37, 120, 149). Bez obzira na razlike, svi se slažu najmanje u korisnosti ili podjednakoj mogućnosti KFLC-a u

odnosu na elektroforetsko dokazivanje OB-ova (37, 93, 96, 120, 134, 135, 147, 150). Neki ističu dijagnostičku, prediktivnu te prognostičku vrijednost KFLC-a za konverziju CIS u MS (139, 147, 151), a drugi samo mogućnost otkrivanja intratekalne sinteze (97, 135, 152, 153). Ostala istraživanja navode nužnost korekcije mogućeg oštećenja KLB-a uz pomoć albuminskog kvocijenta, (97, 135, 153), nedovoljno dobre rezultate ROC analize, ali jednakovrijedne ili bolje od Reiberovog modela i $IgG_{indeksa}$ kakav se aktualno koristi u dijagnostici (132, 135, 136, 147). Poznato je da OB također ima ograničenja i ne odlikuje se 100 % dijagnostičkom točnošću ni za CIS, ni za MS kao ni snagom predikcije za konverziju CIS-a u MS, pa čak ni za dokazivanje intratekalne sinteze (97, 111, 121, 134). Istraživanja KFLC-a iskazuju različitu dijagnostičku osjetljivost i specifičnost $KFLC_{indeksa}$ ili Q_{KFLC-a} u rasponima od 86,8 % do 97 % te od 38,5 % do nevjerojatnih 100 % (18, 37, 97, 132, 135, 147, 151). Ovo istraživanje s graničnom vrijednosti $KFLC_{indeksa}$ od 9,092 (AUC = 0,840) postiglo je dijagnostičku osjetljivost za MS 90 %, slabiju specifičnost 73,3 % i -PV od 93,7 %, dok su drugi istraživači našli granične vrijednosti 2,91 (113) 5,9 (96, 132), 12,0 (135), 8,868 (144), 10,6 (147), 6,07 (153). Međutim, ako se isključi ONB skupina, specifičnost $KFLC_{indeksa}$ smanji se na 49 %. Neke studije izvještavaju o boljoj ili podjednakoj vrijednosti mjerenja KFLC-a s metodom IEF-a za dokazivanje intratekalne sinteze (113, 153), a ovdje je nađeno da $KFLC_{CSF}$ i Q_{KFLC} najbolje predviđaju intratekalnu sintezu (AUC = 0,900 i 0,891; granična vrijednost = 0,280 i 0,027; osjetljivost 80,0 % i 73,2 %, specifičnost 94,0 % i 96,0 %). Tako neujednačeni rezultati uvjetovani su ustrojem studije, nestandardiziranim analitičkim postupkom te primjenom poliklonskog i monoklonskog testa za mjerenje KFLC-a. Za primjenu u kliničkoj praksi prije svega nedostaju tzv. normalne granične vrijednosti.

Gurtner (144) je validirala određivanje $KFLC_{CSF-a}$. CSF kao uzorak sadrži mnogo manje proteina nego serum. U njenom istraživanju, validacija $KFLC_{CSF-a}$ pokazala je prihvatljivu preciznost, točnost te linearnost. Dodatno je prikazala da test ima dobru izvedbu na BN II analizatoru te da nije uočljiv prijenos analita (*eng. carry over*), što je omogućilo daljnje uvođenje. Prema Gurtner, $KFLC_{CSF}$ može nadvladati izazove povezane s izvedbom, interpretacijom i troškovima tradicionalnog određivanja OB-a, pri tome održavajući osjetljivost i specifičnost koje podržavaju dijagnozu MS-a. Po njoj, $KFLC_{CSF}$ pruža ekvivalentnu izvedbu OB-a, te bi zamjena OB-a i $IgG_{indeksa}$ ublažila potrebu za analiziranjem IgG-a u CSF-u i serumu te određivanje albumina u CSF-u i serumu, prilikom čega bi se smanjili troškovi izvođenja, eliminirali bi se skupi kitovi za IEF, a dodatno bi $KFLC_{CSF}$ bio marker koji bi svojim kvantitativnim vrijednostima mogao zamijeniti vizualnu interpretaciju i

smanjiti pritisak analitičara za pedantnom i subjektivnom interpretacijom nalaza OB-a. Gurtner je validirala Freelite test, ali drugi testovi kao NLatex FLC i ELISA nisu još validirani na način kao Freelite. Iako dijagnostička izvedba može biti slična za različite metode, granične vrijednosti se mogu znatno razlikovati. Njezina granična vrijednost za $KFLC_{CSF}$ iznosila je 0,0611 mg/dL s osjetljivošću od 92,5 % i specifičnošću od 86,1 %. Međutim, rezultati dobiveni u ovom istraživanju ne podržavaju istraživanje Gurtner i suradnika jer u ovom istraživanju za $KFLC_{CSF}$, uz dobivenu osjetljivost od 80,0 % i specifičnost od 94,0 %, pri graničnoj vrijednosti od 0,280, dobivena je najniža +LH vrijednost (+LH = 13,4), koja je pak bila bolja vrijednost od Gurtner i suradnika (+LH = 6,65). Stoga je upravo odluka za točnost detekcije intratekalne sinteze u ovom istraživanju pripala Q_{KFLC-u} koji u svojem izrazu uključuje serumski KFLC kao korekciju moguće pasivne difuzije te je prema Slici 11. dobiveno da se pri vrijednosti $Q_{KFLC} < 0,0148$ ne bi ni trebala raditi kvalitativna metoda IEF-a s imunofiksacijom za dokazivanje intratekalne sinteze. Gurtner možda i podcjenjuje dijagnostičku preciznost OB-a s obzirom da četiri, umjesto konvencionalno prihvaćene dvije, CSF-ograničene IgG vrpce u njenom istraživanju definiraju pozitivan CSF. U njenom istraživanju nije bilo linearne korelacije između $KFLC_{seruma}$ i $KFLC_{CSF-a}$, što je u skladu s ovim istraživanjem, a suprotno od istraživanja Senela i suradnika (37), koji su našli dobru korelaciju između $KFLC_{seruma}$ i $KFLC_{CSF-a}$, te Q_{Alb} i $KFLC_{CSF}$ u neupalnim neurološkim bolestima. Presslauer i suradnici (132) otkrili su da životna dob negativno korelira s $KFLC_{indeksom}$ što je u skladu s nalazom pozitivne korelacije dobi s $KFLC_{serumom}$ u ovom istraživanju.

Velika skupina od 420 bolesnika (dijagnoze: demencija, apopleksija, epilepsija, migrena, hidrocefalus, karcinom, tenzijska glavobolja, periferna facijalna paraliza) pokazala je niske vrijednosti za KFLC (M = 0,17 mg/L) i za $KFLC_{indeks}$ (M = 2,12) uz raspon Q_{Alb} od 3×10^{-3} do 26×10^{-3} (97), a ONB skupina u ovom istraživanju pokazala je medijane 0,17 mg/L i 3,71 u rasponu Q_{Alb} od 2×10^{-3} do 29×10^{-3}.

Rezultati graničnih vrijednosti za dokazivanje intratekalne sinteze u ROC analizama za IgG_{indeks} ujednačeni su među studijama i kreću se od 0,56 do 0,7 (37, 96, 132, 135, 147), što je u skladu s rezultatom od 0,59 iz ovog istraživanja. Većina studija ne drži ga dovoljno pouzdanim pokazateljem intratekalne sinteze ni dijagnostički točnim za dijagnostiku MS-a jer nije dokazan kao neovisan prediktor (42, 154). To pokazuje i ovo istraživanje dijagnostičke točnosti $IgG_{indeksa}$ kao i udio pozitivnih nalaza po Reiberovom modelu. Iako je u D-MS skupini veći udio pozitivnih nalaza nego u D-CIS, ipak je u skupini D-MS evidentirano čak 40 % negativnih nalaza prema Reiberu.

Korelacijska analiza pokazala je dobar ($r > 0,75$) i statistički značajan odnos između $IgG_{indeksa}$ i svih KFLC parametara kod svih 151 pacijenata što potvrđuje da je snažna povezanost KFLC-a s ukupnim IgG-om u CSF-u.

U istraživanju Valencia Vera i suradnika (113), $KFLC_{indeks}$ predstavlja najosjetljiviji i specifični kvantitativni parametar za dijagnozu MS-a. Oni predlažu da bi se KFLC trebao odraditi kao probirni alat za odabiranje CSF uzoraka koji bi trebali biti kandidati za OB testove. U svom zaključku smatraju da $KFLC_{CSF}$ kao alat, bez obzira na njegovu brzinu i mogućnost lagane standardizacije, ne predstavlja poboljšanje u odnosu na dijagnostičku osjetljivost i specifičnost OB-ova. No, koristeći KFLC vrijednosti u probiru, mogao bi se reducirati broj izvedenih OB testova za 55 % te se kod onih pacijenata s $KFLC_{indeksom} > 8,33$ ne moraju provoditi OB testovi jer ta vrijednost KFLC-a ukazuje na dijagnozu MS. Za pacijente s $KFLC_{indeksom} < 0,92$ može se isključiti MS te je također nepotrebno raditi OB-ove. Rezultati našeg istraživanja su u skladu s istraživanjem Valencia Vere i suradnika (113), u kojem je $KFLC_{indeks}$ važan za dijagnozu MS-a. Iako je Gurtner (144) predložila $KFLC_{CSF}$ kao zamjenski test za detekciju OB-ova te mu dala i malu prednost u odnosu na $KFLC_{indeks}$, ovim istraživanjem je dokazano da $KFLC_{CSF}$ ne predstavlja poboljšanje, kakvo se očekivalo u odnosu na OB-ove. Iako su se medijani među skupinama značajno razlikovali ($p < 0,0001$), $KFLC_{CSF}$ nije pokazao sklad s OB-om i dijagnozom zbog čega se OB ne može u potpunosti isključiti. No KFLC vrijednosti, a osobito Q_{KFLC}, bi se mogao koristiti u probiru na intratekalnu sintezu zbog čega bi se reducirao broj izvedenih OB testova. Već navedeni Q_{KFLC} parametar bi mogao biti od velikog značaja u detekciji intratekalne sinteze gdje bi se za sve vrijednosti ispod 0,0148 i iznad 0,0270 moglo isključiti dokazivanje OB-a, što znači da bi se ova kvalitativna metoda trebala raditi samo za oko 35 % uzoraka.

5.3. Predviđanje konverzije klinički izoliranog sindroma u multiplu sklerozu

Zbog sve osjetljivije i usavršenije tehnologije MR-a, dijagnostički kriteriji, a osobito interpretacija MR-a, vremenom se revidiraju na temelju novih rezultata istraživanja. Multicentrična dugogodišnja istraživanja u 8 europskih centara (MAGNIMS) predlažu nove kriterije za DIS i DIT te novi algoritam za utvrđivanje konverzije CIS-a u konačnu dijagnozu MS-a (122). U 2016. (155) i 2017. godini (117, 121, 122, 125, 129, 130) objavljene su usporedbe MAGNIMS i McDonald kriterija na kohortnoj studiji. Konvencionalna otkrića MR mozga s vremenom su imala sve veći učinak na ranu i još precizniju dijagnozu bolesti te se pokazalo da je MR najvažniji alat za predikciju MS-a nakon epizode CIS-a. Predloženi kriteriji za predikciju razvoja nedvosmislene dijagnoze MS-a temelje se isključivo na MR-u. Martinelli i suradnici (156) istraživali su poboljšava li uvođenje kliničkih i parakliničkih parametara u već utvrđeni MR protokol moguću predikciju MS-a u stvarnoj kliničkoj praksi. Prema Martinelliju i suradnicima (156), MR varijable bile su najbolji prognostički faktor za kasniji razvoj MS-a, i to ispunjavanje McDonaldovog DIS kriterija iz 2010. godine je bio najbolji prediktor za MS, dok je McDonaldov DIT kriterij bio bolji prediktor od gadolinijski-pojačanih lezija. Međutim, osim MR varijable za predviđanje CIS-a u MS, Martinelli (156) je kod pacijenata s CIS-om zabilježio i nekoliko kliničkih i parakliničkih markera koji su povezani s povećanim rizikom od konverzije u MS, neovisno o MR-u. Među razmatranim CSF varijablama, prisutnost OB-a u CSF-u i visoki IgG_{indeks} bili su najvažniji prognostički faktori za razvoj MS-a. Uvođenje kombinacije biomarkera u model s utvrđenim MR kriterijima značajno je poboljšalo procjenu rizika od MS-a. I druga dugogodišnja istraživanja dokazali su da prisutnost OB-a povećava rizik od konverzije CIS-a u MS (131-133). U skladu s tim i ova skupina ispitanika može se smatrati rizičnom s visokim prediktivnim vrijednostima za $KFLC_{indeks}$ (+PV = 62,5 %; -PV = 93,7 %) te ne iznenađuje činjenica da se kroz dvije godine kod polovice njih utvrdila nedvosmislena klinička dijagnoza MS-a. I u drugim istraživanjima (154, 156) prisutnost CSF markera B-stanične aktivnosti, ali također i mlađa dob, su bili povezani s konverzijom CIS-a u MS.

Neka istraživanja ukazuju da je MRZ reakcija koristan dijagnostički pokazatelj u OB bolesnika kod kojih postoji opravdana sumnja za MS te da MRZ reakcija ima prognostički značaj u predviđanju konverzije CIS-a u MS (111, 157). Prevalencija MRZ-a u ovom istraživanju bila je 15 % u pacijenata s CIS-om i 14 % u pacijenata s MS-om što je niže od ostalih istraživanja u kojima su vrijednosti od 24 % do 88 %. U većini tih studija raščlanjuju se podaci po subtipu MS-a i udjelu pacijenata s CIS-om, ali neovisno o tome frekvencije

MRZ reakcije jako se razlikuju. Rezultatu iz ovog istraživanja je najbliža studija koja uključuje 46 pacijenata svih podtipova MS-a (137), studija dizajnirana slično ovoj na 49 pacijenata koji su konvertirali u MS kroz dvije godine pokazala je prisutnost MRZ-a u 47 % pacijenata, a studija na 18 pacijenata s negativnim OB-om pokazala je 47 % prisutnost na najmanje jedan patogen, 18 % na dva patogena, dok je na 18 OB-pozitivnih pacijenata pokazala 72 % prisutnost na jedan patogen (111). Razlozi ovakvoj neujednačenosti vjerovatno leže u snažnoj ovisnosti ASI-ja o graničnim vrijednostima IgG-a za intratekalnu sintezu, što uključuje krute odluke, na temelju matematičkih izraza kao i metodološke razlike, analitička svojstva načelno istih metoda i različitih proizvođača testova za specifične IgG. ASI nije mjerilo jačine imunosnog odgovora, a ukupna je količina intratekalno sintetiziranih IgG-ova na specifične viruse < 2 % od ukupno intratekalno sintetiziranog IgG-a. U ovom istraživanju, MRZ nalazi nisu pokazali prediktivnu vrijednost za konverziju CIS-a u MS (udio MRZ reakcije na najmanje 2 patogena je podjednak i u CIS-u i u MS-u; p = 1) dok druga istraživanja svojim dokazima snažno podupiru uključenje MRZ-a u dijagnostički postupak i njegovu ulogu za ranu primjenu terapije. Štoviše, podupiru MRZ analizu čak i kod negativnih OB-ova koji imaju kliničku sumnju (104, 111, 137).

Identifikacija faktora koji utječu na rizik konverzije u MS je važna kako bi se omogućilo prognoziranje za iskorištavanje ranijih intervencijskih strategija, što dalje donosi potencijal da se proširi razumijevanje o biološkim mehanizmima koji pokreću MS.

U ovom istraživanju također su procijenjena dva modela logističke regresije s KFLC parametrima za konverziju CIS-a u MS. Oba modela bila su povezana s konverzijom CIS-a u MS, no najbolji model predstavljala je kombinacija $Q_{KFLC\text{-}a}$ s dobi kojem je vrijednost OR iznosila 6,606 (p = 0,015). Ovo je značilo da su se u slučaju povećanja vrijednosti $Q_{KFLC\text{-}a}$ za 1, povećavali izgledi za dijagnozu MS 6,606 puta. Istovremeno, dob smanjuje izglede za nastanak MS-a, odnosno povećanjem starosti za 1 godinu smanjuju se izgledi za dijagnozu MS 0,945 puta, što ukazuje da stariji pacijenti koji imaju vrijednost Q_{KFLC} povećanu za jedan, imaju i mogućnost druge bolesti koja nije MS, dok kod mlađih pacijenata ista vrijednost Q_{KFLC} daje i veći izgled za potvrdu dijagnoze MS-a. U istraživanju Kuhle i suradnika (154), dob kod pacijenata s CIS-om je bila inverzno povezana što je u skladu s ovim istraživanjem, jer je i ovdje dobiveno da je dob inverzno povezana, te da mlađi pacijenti s većom vrijednosti bilo kojeg KFLC parametra (Q_{KFLC} ili $KFLC_{indeks}$), imaju veći omjer vjerojatnosti za konverziju u MS nego stariji pacijenti koji pri istoj vrijednosti navedenih parametara mogu imati drugu dijagnozu. I Montalban (158) je potvrdio da je mlađa dob kod pojave ove bolesti povezana s višim rizikom od konverzije iz CIS-a u MS.

U istraživanju Kuhle i suradnika (154), žene su bile u blago višem riziku od MS-a, ali ovo nije doseglo statistički značaj, što je u skladu s ovim istraživanjem. Istraživanje Menendeza i suradnika (147) prikazuje da se rizik od konverzije iz CIS-a u MS povećava s vrijednostima $KFLC_{indeksa}$ većih od 10,62.

Kao u već navedenom istraživanju Valencia Vera i suradnika (113) i u ovom istraživanju bi se kao pojedinačan parametar za konverziju CIS-a u MS mogao predložiti $KFLC_{indeks}$ te je kategorizacija prema dijagnozama, pokazala da se pacijenti sa sumnjom na dijagnozu CIS-a vjerojatno neće konvertirati u MS ako je $KFLC_{indeks}$ manji od 4,44 u periodu od dvije godine. Za vrijednosti do 104,54 izgledi su bili podjednaki, a vrijednosti $KFLC_{indeksa}$ iznad 104,54 su ukazivali na moguću dijagnozu MS-a. Zbog toga bi se upravo na pacijentima koji imaju vrijednosti $KFLC_{indeksa}$ iznad 4,44 mogla pravovremeno primijeniti terapija, pogotovo ako se uzme u obzir da su 2 godine istraživanja još uvijek nedovoljno dugo razdoblje za pouzdan zaključak o konverziji te da će se u duljem periodu sigurno još više pacijenata konvertirati iz CIS-a u MS. Razdoblje konverzije je u najvećem udjelu do 5 godina, no može nastati i nakon više od 10 godina što potvrđuje retrospektivna studija Fillipija i suradnika (122).

U ovom istraživanju, KFLC pokazatelji pokazuju dijagnostičku relevantnost za CIS i MS. Svi parametri KFLC-a u bolesnika koji su u periodu od dvije godine konvertirali u MS značajno su više nego kod bolesnika koji su još uvijek CIS te oni svojom prediktivnom ulogom mogu pridonijeti ranoj dijagnozi i pravodobnoj terapiji.

6. ZAKLJUČCI

1. Slobodni laki lanci kapa tipa, posebice parametar $KFLC_{indeks}$, pokazali su se kao osjetljiv i specifičan kvantitativni parametar za dijagnostiku klinički izoliranog sindroma i multiple skleroze.

2. Koncentracije KFLC-a značajno su više u inicijalnih pacijenata s CIS-om prema ostalim neurološkim pacijentima, te u pacijenata koji su konvertirali u MS u odnosu na ostale pacijente s CIS-om.

3. Određivanje $KFLC_{indeksa}$ može pridonijeti odluci o ranoj dijagnozi MS-a i terapiji. Vrijednosti > 104,54 sa specifičnošću 95 % upućuju na konverziju u MS dok vrijednosti između 4,44 i 104,54 mogu biti dodana vrijednost uz ostale dijagnostičke metode koje govore u prilog MS-u. Pacijenti s $KFLC_{indeksom}$ < 4,44 nemaju izgleda za razvoj MS-a.

4. KFLC parametri nisu pokazali značajno veću osjetljivost od OB dijagnostike, a u odnosu na Reiberov model pokazali su točnost koja podupire napuštanje Reiberovog modela.

5. U odnosu na OB dijagnostiku parametri Q_{KFLC} i $KFLC_{CSF}$, pokazali su najbolju točnost. Budući da Q_{KFLC} u svojem izrazu uključuje serumski KFLC, čime korigira moguću pasivnu difuziju kroz krvno-likvorsku barijeru, ističe se kao pouzdaniji parametar za procjenu intratekalne sinteze.

6. Q_{KFLC} bi mogao naći primjenu za dokazivanje intratekalne sinteze u početnoj obradi pacijenata sa sumnjom na CIS i usmjeriti dokazivanje OB-ova složenijom metodom IEF-a samo za vrijednosti Q_{KFLC-a} između 0,0148 i iznad 0,0270. Takav pristup za 65 % smanjuje broj OB testiranja, što umanjuje troškove za reagense, ljudski rad i vrijeme.

7. Rezultati MRZ reakcija u ovom istraživanju nisu pokazali doprinos dijagnostici.

8. Višestruka logističko-regresijska analiza pokazala je da su životna dob i KFLC parametri povezani s konverzijom CIS-a u MS. Najveću statističku značajnost i omjer izgleda postigao je matematički model u čijem su polinomu varijable životna dob (-OR) i Q_{KFLC} (+OR).

7. LITERATURA

1. Trbojević-Čepe M, Štraus B. Cerebrospinalna tekućina. U: Čvorišćec D, Čepelak I, urednici. Štrausova medicinska biokemija. 3. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2000. str. 558-88.
2. Watson MA, Scott MG. Clinical utility of biochemical analysis of cerebrospinal fluid. Clin Chem 1995;41:343-60.
3. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. Physiol Rev 2013; 93:1847-892.
4. Guyton A, Hall J. Medicinska fiziologija. 10. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2003. str. 712.
5. Venkatesh B, Scott P, Ziegenfuss M. Cerebrospinal fluid in critical illness. Crit Care Resusc. 2000;2(1):42-54.
6. Davson H, Segal MB: Physiology of the CSF and Blood-Brain Barriers. Boca Raton: CRC Press, 1996.
7. Sanchez AL, Martinez-Bazan C, Gutierrez-Montes C, Criado-Hidalgo E, Pawlak G, Bradley W. On the bulk motion of the cerebrospinal fluid in the spinal canal. J Fluid Mech. 2018;841:203-227.
8. Krstić RV. Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology. 1. izdanje. Berlin: Springer; 1991. str. 498.
9. Ueno M, Chiba Y, Murakami R, Matsumoto K, Kawauchi M, Fujihara R. Blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in normal and pathological conditions. Brain Tumor Pathol. 2016;33(2):89-96.
10. Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, Fuente J, Grazu V et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspective on tracking and neuroimaging. Particle and Fibre Toxicology. 2010, 7:3.
11. Deeken JF, Loscher W. The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. Clin Cancer Res. 2007;13:1663-74.
12. Holdgate A, Cuthbert K. Perils and pitfalls of lumbar puncture in the emergency department. Emergency Medicine. 2001; 13:351-58.
13. Orešković D, Klarica M. A new look at cerebrospinal fluid movement. Fluid Barriers CNS. 2014;11:16.

14. Sandberg-Wollheim M, Olsson T. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: Yes. Multiple Sclerosis Journal. 2013;19(6):714-16.
15. Reale M, Sanchez-Ramon S. Lipids at the cross-road of autoimmunity in multiple sclerosis. Curr Med Chem. 2017;24(2):176-192.
16. Trapp BD, Nave KA. Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?. Annual Review of Neuroscience. 2008;31:247-269.
17. Zadro I. Epidemiologija multiple skleroze. U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 36-47.
18. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. Lancet 2008; 372:1502-17.
19. Bašić Kes V, Polegubić M. Patogeneza multiple skleroze. U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 48-87.
20. Lawrence S, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. Nature Reviews Immunology 2003;3:483-92.
21. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concept in the immunopatogenesis of multiple sclerosis. Nature Reviews Neuroscience 2002;3:291-301.
22. Weiner HL. Multiple sclerosis is an inflamatory T-cell-mediated autoimmune disease. Arch Neurol 2004;61:1613.
23. Fowler TJ and Skadding JW. Clinical Neurology, London: Hodder Arnold, 2003; str. 413-20.
24. Bašić Kes V, Dimitrović A. Dijagnostika multiple skleroze. U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 88-101.
25. Charil A, Yousry TA, Rovaris M, Barkhof F, De Stefano N, Fazekas F et al. MRI and the diagnosis of multiple sclerosis: expanding the concept of „no better explanation“. Lancet Neurol. 2006;5:841-52.
26. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. Mult Scler. 2008;14(9):1157–74.
27. Kelly SB, Chaila E, Kinsella K, Duggan M, Walsh C, Tubridy N et al. Using atypical symptoms and red flags to identify non-demyelinating disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012;83:44-48.
28. Brinar V. Demijelinizacijske bolesti središnjeg živčanog sustava. U: Brinar V i sur. Neurologija za medicinare. Zagreb: Medicinska naklada, 2009. str. 302-337.

29. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. Neurology. 1996;46:907-911.
30. Brinar V, Petelin Ž. Multipla skleroza – klinička slika, dijagnostika i liječenje. Neurologija. 2003;(9):50:66-70.
31. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. Eur Neurol. 2014;72(1):1-5.
32. Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis. Neurol Clin.1995;13:119-146.
33. Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. Neurology. 2003;61(11):1528-32.
34. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. Brain. 2010;133(7):1900-13.
35. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ et al-Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology. 2014;83(3):278-86.
36. Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. Autoimmun Rev.2014;13:518-24.
37. Senel M, Tumani H, Lauda F, Presslauer S, Mojib-Yezdani R, Otto M, et al. Cerebrospinal fluid immunoglobulin kappa light chain in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. PloS One. 2014 Apr 2:9(4):e88680.
38. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndrome. Lancet Neurol. 2012;11:157-69.
39. Marcus JF, Waubant EL. Updates on Clinically Isolated Syndrome and Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. Neurohospitalist. 2013 Apr; 3(2): 65–80.doi: 10.1177/1941874412457183.
40. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. Neurology. 2009;72(9):800–805.
41. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Multiple Sclerosis 1. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet*. 2016; 389: 1336–1346.
42. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurology. 2018;17(2):162-73.

43. Polman CH, Reingold SC, Edan G et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria." Ann Neurol. 2005;58(6):840–46.
44. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol. 2001;50(1):121–127.
45. Garcia Merino A, Blasco MR. Confirming the MS diagnosis. Int MS J. 2007;14(2):58–63.
46. Wiendl H, Toyka KV, Rieckmann P, et al. Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: current therapeutic recommendations. J Neurol. 2008;255(10):1449–1463.
47. Habek M. Klinički izolirani sindrom U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 178-92.
48. Rovira A, Leon A. MR in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: an overview. Eur J Radiol. 2008;67(3):409–414.
49. De Stefano N, Giorgio A, Tintore M, Amato MP, Kappos L, Palace J, et al. Radiologically isolated syndrome or subclinical multiple slerosis: MAGNIMS consensus recommendations. Multiple Sclerosis Journal. 2018;24(2):214-21.
50. Radulović-Prenc L, Sepčić J, Vidović I, Prenc M. New Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. Glas. Pul. Boln. 2011:8:8-12.
51. Montalban X, Tintoré M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. Neurology. 2010;74:427-34.
52. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald Criteria. Ann Neurol. 2011;69:292–302.
53. Vukasović I. Likvorska dijagnostika u bolesnika s multiplom sklerozom. U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 146-56.
54. Trbojević-Čepe M, Vogrinc Ž. Inflammation and humoral immune response within the CNS compartment: characteristic features and cerebrospinal fluid analysis. Biochemia Medica, 2004;14(1-2):1-36.
55. Zadravec D. Magnetna rezonancija (MR) neuroimunoloških bolesti i diferencijalna dijagnoza. U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 88-101.

56. Schumacher GA, Beebe GW, Kibler RF, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. Ann NY Acad Sci 1965; 122: 552–68.
57. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. Ann Neurol 1983; 13: 227–31.
58. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: Survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. Clinical Chemistry 1995;41(2):256-63.
59. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. Arch Neurol 2005;62:865-70.
60. Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C, Killestein J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis – the long road to clinical application. Nat Rev Neurol 2015;110:585-96.
61. Tselis A. Evidence for viral etiology of multiple sclerosis. Semin Neurol 2011;31:307-16.
62. Jarius S et al. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity? J. Neurol. Sci. 2009;280:98-100.
63. Jarius S et al. Polyspecific, antiviral immune response distinguishes multiple sclerosis and neuromyelitis optica. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2008;79:1134-36.
64. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. Journal of the Neurological Sciences 2001;184:101-22.
65. Link H, Tibbling G.Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. Scand JClin Lab Invest 1977;37(5):397–401.
66. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al.Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. J NeurolNeurosurg Psychiatry 1994;57(8):897–902.
67. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)–a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J Neurol Sci 1994;122(2):189–203.
68. Brettschneider J, Claus A, Kassubek J, Tumani H. Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. J Neurol 2005;252(9):1067–73.

69. Tumani H, Hegen H. CSF Albumin: Albumin CSF/Serum Ratio (Marker for Blood-CSF Barrier Function). U: Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE, Tumani H. Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology. 1. izdanje. Berlin: Springer, 2015. str. 112-114.
70. Thomas L. Labor und diagnose. Frankfurt/Main: TH Verlagsgesellschaft GmbH, Marburg 2005.
71. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, Bernardi G, Adam P, Monteiro de Almeida S, et al. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by anInternet-based group discussion. Clin Chem Lab Med 2003;41(3):331–337.
72. Petereit H, Sindern E, Wick M. Liquordiagnostik. Leitlinien und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie. Springer Medizin, 2007.
73. Trbojević-Čepe M. Mozak kao imunološki privilegirano mjesto. U: Bašić Kes V i suradnici. Neuroimunologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2015. str. 26-34.
74. Souverijn JHM, Serrée HMP, Peet R, Grenzebach Smit W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis. Comparison of various formulae with the "gold standard" of isoelectric focusing. J Neurol Sci 1991; 102:11-16.
75. Öhman S, Ernerudh J, Forsberg P, Hendriksson A, von Schenck H, Vrethem M. Comparison of seven formulae and isoelectrofocusing for determination of intrathecally produced IgG in neurological diseases. Ann Clin Biochem 1992; 29:405-410.
76. Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. Acta Neurol Scand 2000; 102:322-325.
77. Sellebjerg F. Immunoglobulins in Cerebrospinal Fluid. U: Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE, Tumani H. Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology. 1. izdanje. Berlin: Springer, 2015. str. 116-126.
78. Öhman S. Points of view concerning the diffusion theory for blood-CSF barrier functionand dysfunction. J Neurol Sci 1994;126:240–245.
79. Öhman S, Forsberg P, Nelson N, et al. An improved formula for the judgement of intrathecallyproduced IgG in the presence of blood brain barrier damage. Clin Chim Acta 1989;181:265-72.

80. Öhman S, Ernerudh J, Forsberg P, et al. Improved formulae for the judgement of intrathecallyproduced IgA and IgM in the presence of blood CSF barrier damage. Ann Clin Biochem 1993;30(Pt 5):454–62.
81. Sellebjerg F, Christiansen M, Rasmussen LS, et al. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis.Quantitative assessment of intrathecal immunoglobulin synthesis by empirical formulae.Eur J Neurol 1996;3:548–59.
82. Reiber H. Liquordiagnostik. In: Thomas L (Hrsg) Labor und Diagnose, 6. Aufl. Med Verl Ges, Marburg, 2005.
83. Stangel M et al. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. Nat Rev Neurol. 2013;9:267-76.
84. DeCarli C, Menegus MA, Rudick RA. Free light chains inmultiple sclerosis and infections of the CNS. Neurol 1987;37:1334–8.
85. Bradwell AR. Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevylite). University of Birmingham, 5th edition. 2008. str. 194-197.
86. Taradi M. Građa protutijela i antigenskih receptora limfocita B. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Škudar-Lukinović V, Marušić M i sur. Imunologija. Medicinska Naklada: Zagreb, 2010. str. 58-79.
87. Luxton RW, McLean BN, Thompson EJ. Isoelectric focusing versus quantitative measurements in the detection of intrathecal local synthesis of IgG. Clin Chim Acta 1990;187:297-308.
88. DeCarli C, Menegus MA, Rudick RA. Free light chains in multiple sclerosis and infections of the CNS. Neurology 1987;37:1334-8.
89. Khoury SJ, Weiner HL. Kappa light chains in spinal fluid for diagnosing multiple sclerosis. JAMA 1994;272:242-3.
90. Lamers KJ, de Jong JG, Jongen PJ, Kock-Jansen MJ, Teunissen MA, Prudon-Rosmulder EM. Cerebrospinal fluid free kappa light chains versus IgG findings in neurological disorders: qualitative and quantitative measurements. J Neuroimmunol 1995;62:19-25.
91. Krakauer M, Schaldermose Nielsen H, Jensen J, Sellebjerg F. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 1998;98:161-5.
92. Jenkins MA, Cheng L, Ratnaike S. Multiple sclerosis: use of light-chain typing to assist diagnosis. Ann Clin Biochem 2001;38:235-41.

93. Kaplan B, Aizenbud BM, Golderman S, Yaskariev R, Sela BA. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology 2010;229:263-71.
94. te Velthius H, Knop I, Stam P, van den Broek, Klaasse Bos H, Hol S, et al. N Latex FLC – new monoclonal high-performance assays for determination of free light chain kappa and lambda. Clin Chem Lab Med 2011;49:1323-32.
95. Villar M, Espino M. High levels of cerebrospinal fluid free kapa chains predict conversion to multiple sclerosis. Clin Chim Acta 2012;413:1813-6.
96. Presslauer S, Milosavljevic D, Brücke T, Bayer P, Hübl W. Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis. J Neurol. 2008; 255:1508-14.
97. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, Parigger S, Schneider-Koch G, et al. Kappa Free Light Chains: Diagnostic and Prognostic Relevance in MS and CIS. PLoS ONE. 2014;9:e89945
98. Reiber H. Polyspecific antibodies without persisting antigen in multiple sclerosis, neurolupus and Guillain-Barre syndrome: immune network connectivity in chronic diseases. Arq. Neuro-Psiquiatr. 2017;75:8:580-88.
99. Felgenhauer K, Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. Clin Investig 1992;70:28-37.
100. Godec MS, Asher DM, Murray RS, et al. Absence of measles, mumps, and rubella viral genomic sequences from multiple sclerosis brain tissue by polymerase chain reaction. Ann Neurol. 1992;32:401–404.
101. Hottenrott T, Dersch R, Berger B, et al. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response in neurosarcoidosis, acute disseminated encephalomyelitis and autoimmune encephalitis compared to multiple sclerosis in a tertiary hospital cohort. Fluids Barriers CNS. 2015;12:27.
102. Bednarova J, Stourac P, Adam P. Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis. Acta Neurol Scand. 2005;112:97–102.
103. Puccioni-Sohler M, Kitze B, Felgenhauer K, et al. The value of CSF analysis for the differential diagnosis of HTLV-I associated myelopathy and multiple sclerosis. Arq Neuropsiquiatr. 1995;53:760–5.
104. Hottenrott T, Dersch R, Berger B, Rauer S, Huzly D, Stich O. The MRZ reaction in primary progressive multiple sclerosis. Fluids and Barriers of the CNS. 2017;14:2.

105. Kaunzner UW, Kumar G, Askin G, Gauthier SA, Nealon NN, Vartanian T, et al. A study of patients with aggressive multiple sclerosis at disease onset. Neuropsychiatric Disease and Treatment. 2016;12:1907-1912.
106. Katz Sand IB, Lublin FD. Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. Continuum (Minneap Minn) 2013;19:4:922-43.
107. Giles PD, Heath JP, Wroe SJ. Oligoclonal bands and the IgG index in multiple sclerosis: uses and limitations. Ann Clin Biochem 1989;26:317-23.
108. Karamehić J, Delić-Šarac M, Subašić D, Jukić T, Ćorić J, Panjeta M, et al. Reibergram and Oligoclonal Bands in Diagnosis of Multiple Sclerosis. Med Arh 2012;66:4:222-5.
109. Delić-Šarac M, Izetbegović S, Karamehić J, Subašić D, Šaban A, Jukić T, et al. Detection methods of immunoglobulin IgG in CSF and serum. Med Arch 2013;67:5:368-71.
110. Schwenkenbecher P, Sarikidi A, Bonig L, Wurster U, Bronzlik P, Suhs KW, et al. Clinically isolated syndrome according to McDonald 2010: Intrathecal IgG synthesis still predictive for conversion to multiple sclerosis. Int J Mol Sci 2017;18:10:2061.
111. Brettschneider J, Tumani H, Kiechle U, Muche R, Richards G, Lehmensiek V, et al. IgG antibodies against Measles, Rubella, and Varicella Zoster Virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. PloS One 2009;4:11:e7638.
112. Gupta A, Al-Dasuqi K, Xia F, Askin G, Zhao Y, Delgado D, et al. The use of non-contrast MRI to detect gadolinium-enhancing multiple sclerosis brain lesions: a systematic review and meta-analysis. AJNR Am J Neuroradiol 2017; 38(7):1317-22.
113. Valencia-Vera E, Martinez-Escribano Garcia-Ripol A, Enguix A, Abalos-Garcia C, Segovia-Cuevas MJ. Application of κ free light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker in multiple sclerosis diagnosis: development of a diagnosis algorithm. Clin Chem Lab Med 2018;56:4:609-13.
114. Colton T. Statistics in Medicine. Little, Brown and Company, New York, NY, 1974.
115. Kamath DJ, Xavier D, Sigamani A, Pais P. High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) & cardiovascular disease: An Indian perspective. Indian J Med Res. 201;142(3):261–8.
116. Vukasović I. Neurološke bolesti. U: Topić E, Primorac D, Janković S. Medicinskobiokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska Naklada, 2004. str. 158-73.

117. Goffette S, Schluep M, Henry H, Duprez T, Sindic CJM. Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75:308–310.
118. Sindic CJ, Laterre EC. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. J Neuroimmunol. 1991;33:63–72.
119. Zeman D, Kušnierová P, Švagera Z, Všianský F, Byrtusová M, Hradílek P, et al. Assessment of Intrathecal Free Light Chain Synthesis: Comparison of Different Quantitative Methods with the Detection of Oligoclonal Free Light Chains by Isoelectric Focusing and Affinity-Mediated Immunoblotting. PLoS One. 2016 Nov 15;11(11):e0166556. doi: 10.1371/journal.pone.0166556. eCollection 2016.
120. Hoedemakers RM, Pruijt JF, Hol S, Teunissen E, Martens H, Stam P, et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. Clin Chem Lab Med. 2011;50(3):489-95.
121. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2013;262:1-10. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.06.014. Epub 2013Jul 26
122. Filippi M, Preziosa P, Meani A, Ciccarelli O, Mesaros S, Rovira A, et al. Prediction of a multiple sclerosis diagnosis in patients with clinically isolated syndrome using the 2016 MAGNIMS and 2010 McDonald criteria: a retrospective study. The Lancet Neurology, 2018;17(2):133-142.
123. Kabat EA, Moore DH, Landow H. An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. J Clin Invest 1942;21:571–577.
124. Susse M, Hannich M, Petersmann A, Zylla S, Pietzner M, Nauck M et al. Kappa free light chains in cerebrospinal fluids to identify patients with oligoclonal bands. Eur J Neurol, 2018;25(9):1134-1139.
125. Vanja Bašić Kes et al. Recommendations for diagnosis and management of multiple sclerosis. Acta Clin Croat 2012; 51:117-135
126. Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H. Neurobiology of multiple sclerosis. in: McAlpine's Multiple Sclerosis, Churchill Livingstone Ed. 1999; 283-316.

127. Ohe Y, Ishikawa K, Itoh Z, Tatemoto K: Cultured leptomeningeal cells secrete cerebrospinal fluid proteins. Journal of Neurochemistry, 1996; 67: 964-971.
128. Cserr HF. Convection of brain spinal fluid. In: Shapiro K, Marmarou A, Protnoy H (eds) Hydrocephalus. New York, Raven Press.1992; 59-68.
129. McMorris FA, McKinnon RD. Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease. Brain Pathol 1997;6(3):313-29.
130. Johnson ES, Ludwin SK. The demonstration of recurrent demyelination and remyelination of axons in the central nervous system. Acta Neuropathol 1998; 53: 93-98.
131. Tintore M, Rovira A, Rio J, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. Brain 2015; 138: 1863–74.
132. Presslauer S, Milosavljevic D, Huebl W, Aboulenein-Djamshidian F, Krugluger W, Deisenhammer F, et al. Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: A multicenter study. Mult Scler. 2016 Apr;22(4):502-10.
133. Tintoré M, Rovira A, Río J, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? Neurology 2008; 70: 1079–1083.
134. Desplat-Jégo S, Feuillet L, Pelletier J, Bernard D, Chérif AA, Boucraut J. Quantification of immunoglobulin free light chains in cerebrospinal fluid by nephelometry. J Clin Immunol 2005;25:338–45.
135. Duranti F, Pieri M, Centonze D, Buttari F, Bernardini S, Dessi M. Determination of κFLC and κ Index in cerebrospinal fluid: a valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. J Neuroimmunol. 2013;263(1-2):116-20.
136. Mares J, Herzig R, Urbanek K, Sladkova V, Sklenarova J, Bakarek V, et al. Correlation of the IgG index and oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. Biomed papa Med Fac Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 2008;152:247-9.
137. Brecht I, Weissbrich B, Braun J, Toyka KV, Weishaupt A, Buttmann M. Intrathecal, polyspecific antiviral immune response in oligoclonal band negative multiple sclerosis. PLoS One. 2012;7(7):e40431. doi: 10.1371/journal.pone.0040431.
138. Stich O, Kluge J, Speck J, Rauer S. Oligoclonal restriction of antiviral immunoreaction in oligoclonal band-negative MS patients. Acta Neurol Scand. 2015 Jun;131(6):381-8. doi: 10.1111/ane.12350.

139. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, et al. Cerebrosinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: A meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013;84:909–14.
140. Zeman D. Free light chains in the cerebrospinal fluid. Do we still need oligoclonal IgG?. Clin Chem Lab Med. 2018;56(7):1011-14.
141. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. Lancet Neurol 2014; 13: 113–26.
142. Rinker JR 2nd, Trinkaus K, Cross AH. Elevated CSF free kappa light chains correlate with disability prognosis in multiple sclerosis. Neurology 2006;67:1288–90.
143. Bayart JL, Muls N, van Pesch V. Free kappa light chains in neuroinflammatory disorders: Complement rather than substitute?. Acta Neurologica Scandinavica. 2018; doi: 10.1111/ane.12969.
144. Gurtner KM, Shosha E, Bryant SC, Andreguetto BD, Murray DL, Pittock SJ, et al. CSF free light chain identification of demyelinating disease: comparison with oligoclonal banding and other CSF indexes. Clin Chem Lab Med. 2018;56(7):1071-80.
145. Christiansen M, Carstensen Gjelstrup M, Stilund M, Christensen T, Petersen T, Moller HJ. Cerebrospinal fluid free kappa light chains and kappa index perform equal to oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Clin Chem Lab Med; 2018; doi: 10.1515/cclm-2018-0400.
146. Makshakov G, Nazarov V, Kochetova O, Surkova E, Lapin S, Evdoshenko E. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis. PloS One, 2015;10(11), doi: 10.1371/journal.pone.0143375.
147. Menéndez-Valladares P, García-Sánchez MI, Cuadri Benítez P, Lucas M, Adorna Martínez M, Carranco Galán V, et al. Free kappa light chains in cerebrospinal fluid as a biomarker to assess risk conversion to multiple sclerosis. Mult Scler J Exp Transl Clin. 2015;16:1:1-9.
148. Rudick RA, Cookfair DL, Simonian NA, et al. Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFNb-1a) for relapsing multiple sclerosis. J Neuroimmunol 1999; 93:8–14.
149. Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers HMLM, Croockewit SA, Joosten I, van der Molen RG. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. Clin Chem Lab Med. 2018;56:312-22.

150. Vasilj M, Klarić M, Vrkić N, Mikulić I, Marković Boras M, Jelić-Knezović N, et al. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid of patients with identified oligoclonal immunoglobulin G. Psychiat Danub. 2017;29 (Suppl 2):124-8.
151. Pieri M, Storto M, Pignalosa S, Zenobi R, Buttari F, Bernardini S. KFLC Index utility in multiple sclerosis diagnosis: Further confirmation. J Neuroimmunol. 2017;309:31-3.
152. Passerini G, Dalla Costa G, Sangalli F, Moiola L, Colombo B, Locatelli M, et al. Free Light Chains and Intrathecal B Cells Activity in Multiple Sclerosis: A Prospective Study and Meta-Analysis. Mult Scler Int. 2016;2016:2303857. doi: 10.1155/2016/2303857. Epub 2016 Dec 28. PMID: 28116160
153. Zeman D, Kušnierová P, Bartoš V, Hradílek P, Kurková B, Zapletalová O. Quantitation of free light chains in the cerebrospinal fluid reliably predicts their intrathecal synthesis. Ann Clin Biochem. 2016 53(Pt 1):174-6.
154. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adiutori R, Bianchi L, Topping J, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. Mult Scler. 2015;21:1013-24.
155. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. Lancet Neurol 2016; 15: 292–303.
156. Martinelli V, Dalla Costa G, Messina MJ, Di Maggio G, Sangalli F, Moiola L, et al. Multiple biomarkers improve the prediction of multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. Acta Neurol Scand. 2017;136(5):454-61.
157. Raphael I, Webb J, Stuve O, Haskins WE, Forsthuber TG. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis: how far we have come and how they could affect the clinic now and in the future. 2015;11(1):69-91.
158. Montalban X. CIS diagnostics and predictors of conversion to CDMS. Multiple Sclerosis and Related Disorders. 2014;3:764-7.

8. POPIS KRATICA

ALT	alanin-aminotransferaza
APTV	aktivirano parcijalno protrombinsko vrijeme
ASI	indeks specifičnih protutijela
AST	aspartat-aminotransferaza
AUC	površina ispod krivulje
CIS	klinički izolirani sindrom
CMV	citomegalovirus
CSF	cerebrospinalna tekućina
CT	kompjuterska tomografija
DIS	diseminacija u prostoru
DIT	diseminacija u vremenu
D-CIS	dijagnoza CIS-a
D-MS	dijagnoza MS-a
EBV	Epstein-Barrov virus
FLC	slobodni laki lanci
HHV6	humani herpes virus 6
HIV	virus humane imunodeficijencije
HSV	herpes simplex virus
IEF	izoelektrično fokusiranje
IFCC	Međunarodna Federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgG_{indeks}	indeks imunoglobulina G
IgM	imunoglobulin M
IQR	interkvartilni raspon
KFLC	kapa slobodni laki lanci
$KFLC_{CSF}$	kapa slobodni laki lanci u cerebrospinalnoj tekućini
$KFLC_{indeks}$	indeks kapa slobodnih lakih lanaca
$KFLC_{serum}$	kapa slobodni laki lanci u serumu

KLB	krvno-likvorska barijera
KMB	krvno-moždana barijera
LFLC	lambda slobodni laki lanci
LoD	limit detekcije
LoQ	limit kvantifikacije
+LH	pozitivan omjer vjerojatnosti
-LH	negativan omjer vjerojatnosti
M	medijan
MAGNIMS	magnetna rezonancija u multiploj sklerozi
MCV	prosječni volumen eritrocita
MR	magnetna rezonancija
MRZ	morbili, rubeola, varičela zoster
MS	multipla skleroza
OB	oligoklonske vrpce
ONB	ostale neurološke bolesti
OR	omjer izgleda
PV	protrombinsko vrijeme
+PV	pozitivna prediktivna vrijednost
-PV	negativna prediktivna vrijednost
Q_{Alb}	kvocijent albumina
Q_{KFLC}	kvocijent kapa slobodnih lakih lanaca
RIS	radiološki izolirani sindrom
ROC	vrsta statističke metode za određivanje dijagnostičke točnosti
SŽS	središnji živčani sustav

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE

Ćurlin (Vasilj) Marina
Kralja Tomislava 67,
88260 Čitluk (Bosna i Hercegovina)
vasiljmarina87@gmail.com



RADNO ISKUSTVO

2018 - Sveučilišni magistar medicinske biokemije i laboratorijske medicine

Sveučilišna klinička bolnica Mostar (Zavod za patologiju, citologiju i sudsku medicinu)

2017 – Viši asistent na kolegiju Anorganska kemija 1

Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru

2014 – Sveučilišni magistar medicinske biokemije i laboratorijske medicine

Sveučilišna klinička bolnica Mostar (Zavod za laboratorijsku dijagnostiku)

OBRAZOVANJE

2013 – Student na doktorskom studiju

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2012–2014 Sveučilišni magistar medicinske biokemije i laboratorijske medicine

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2009–2011 Magistar biologije i kemije

Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru

2006–2009 Bachelor biologije i kemije

Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru

BIBLIOGRAFIJA

1. Vasilj M, Basic Kes V, Vrkic N, Vukasovic I. Relevance of KFLC quantification to differentiate clinically isolated syndrome from multiple sclerosis at clinical onset. Clin Neurol Neurosurg 2018; 174:220-9.

2. Vasilj M, Klarić M, Vrkić N, Mikulić I, Marković Boras M, Jelić Knezović N, Šoljić V. Kappa Free Light Chains In Cerebrospinal Fluid of Patients With Identified Oligoclonal Immunoglobulin G. Psychiatr Danub 2017;29(Suppl. 2):124-8.

3. Jelić-Knezović N, Galijašević S, Lovrić M, Vasilj M, Selak S, Mikulić I. Levels od Nitric Oxide Metabolites and Myeloperoxidase in Subjects With Type Diabetes Mellitus on Metformin Therapy. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2018 doi:10.1055/a-0577-7776.

4. Marković Boras M, Čaušević A, Brizić I, Mikulić I, Vasilj M, Jelić-Knezović N. A relation of serum homocystein, uric acid and C-reactive protein level in patients with acute myocardial infarction. Med Glas, 2018. 1;15(2):101-8.

KONGRESI

Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology on the Occasion of the 40th Anniversary, HDBMB 2016, Split

1. Talić S, Martinović-Bevanda A, Odak I, Marković M, Vasilj M, Crnjac N; Acetylcholinesterase inhibitory activities of extracts isolated from immortelle (Helichrysum italicum (Roth) G. Don) (poster)

2nd International Congress of Chemist and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina: 2016, Sarajevo,

1. Talić S, Odak I, Vasilj M, Marković M. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Extracts From Teucrium polium subsp. capitatum (L.) Arcang. (poster)
2. Jelić-Knezović N, Galijašević S, Vasilj M, Azinović I, Mikulić I, Marković M. Levels of Myeloperoxidase in Plasma of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus without Cardiovasculat Complications (poster)

PROJEKTI

Sudjelovanje na projektima Federalnog ministarstva obrazovanja i znanosti:

1. Slobodni laki lanci imunoglobulina G u likvoru i serumu bolesnika s klinički izoliranim sindromom (voditelj projekta: prof. dr. sc. Miro Klarić)

NAGRADA

Rektorova nagrada 2009. godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet **Doktorski rad**

SLOBODNI LAKI LANCI IMUNOGLOBULINA U LIKVORU I SERUMU BOLESNIKA S KLINIČKI IZOLIRANIM SINDROMOM

Marina Vasilj

Uvod: Multipla skleroza (MS) je kronična upalna bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS), a prvi napad bilježi se kao klinički izolirani sindrom (CIS). Dijagnostika uključuje u prvom redu nalaz magnetske rezonancije (MR) te dokazivanje intratekalne sinteze oligoklonskih IgG vrpci metodom izoelektričnog fokusiranja (IEF) s imunofiksacijom. Novija istraživanja pokazala su da likvor takvih bolesnika sadrži visoku koncentraciju slobodnih lakih lanaca, osobito kapa tipa (KFLC).
Svrha istraživanja bila je ispitati dijagnostičku i prediktivnu vrijednost određivanja slobodnih lakih kapa lanaca u cerebrospinalnoj tekućini (CSF) u usporedbi s kvalitativnim postupkom određivanja oligoklonskih vrpci (OB, u pacijenata s CIS-om koji su kroz dvije godine konvertirali u MS.
Metode i ispitanici: U 151 pacijenta primljenih na Klinici za neurologiju sa sumnjom na CIS mjereni su imunonefelometrijskom metodom KFLC, ukupni IgG i albumin u CSF-u i serumu, izračunati kvocijenti CSF/serum (Q_{KFLC}, Q_{IgG} i Q_{Alb}) i indeksi $KFLC_{indeks}$ (Q_{KFLC}/Q_{Alb}) te IgG_{indeks}(Q_{IgG}/Q_{Alb}) u odnosu na albumin, te je izoelektričnim fokusiranjem s imunofiksacijom procijenjeno prisustvo OB-a. Na temelju kliničke slike, OB-a i magnetske rezonancije (MR) 50 pacijenata svrstano je u ostale neurološke bolesti (ONB), a 101 u CIS od kojih je 50 konvertiralo u MS (D-MS) unutar 2 godine.
Rezultati: Analizom i usporedbom ROC krivulja te usporedbom medijana KFLC parametara tražena je optimalna granična vrijednost u odnosu na dijagnozu CIS-a i konverziju u MS. ROC analiza za točnost detekcije intratekalne sinteze pokazala je najbolje rezultate za Q_{KFLC} s površinom ispod krivulje (AUC) od 0,891 uz graničnu osjetljivost od 0,027 s dijagnostičkom osjetljivošću od 73,2 % i specifičnošću od 96,0 %. Dijagnostička točnost $KFLC_{indeksa}$ za konverziju CIS-a u MS pokazala je AUC 0,840 i graničnu vrijednost 9,092. Vrijednosti Q_{KFLC} ispod 0,0148 i iznad 0,0270 upućuju da nije potrebno raditi metodu IEF-a s imunofiksacijom za dokazivanje OB-a. Vrijednost $KFLC_{indeksa}$ manja od 4,44 ne upućuje na konverziju u MS unutar dvije godine dok vrijednost $KFLC_{indeksa}$ iznad 104,54 upućuju na moguću dijagnozu MS.
Zaključak: Primjena KFLC parametara mogla bi poslužiti kao pretražna metoda, a OB bi se mogao koristiti samo u nerazjašnjenim kliničkim slučajevima. KFLC parametri u bolesnika koji su konvertirali u MS značajno su viši te svojom prediktivnom ulogom mogu pridonijeti ranoj dijagnozi i pravodobnoj terapiji.

Ključne riječi: slobodni laki kapa lanci, multipla skleroza, klinički izolirani sindrom, oligoklonske IgG vrpce, izoelektrično fokusiranje, imunofiksacija
Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
Rad sadrži: 96 stranica, 12 slika, 14 tablica i 158 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Mentori: **izv. prof. dr. sc. Nada Vrkić,** izvanredni profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
prof. dr. sc. Vanja Bašić Kes, redoviti profesor, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenjivači: **dr. sc. Željka Vogrinc,** znanstvena suradnica, Klinički bolnički centar Zagreb
prof. dr. sc. Lada Rumora, redoviti profesor u trajnom zvanju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
izv. prof. dr. sc. Fran Borovečki, izvanredni profesor, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Rad je prihvaćen: **23. siječnja 2019. godine**

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry **Doctoral thesis**

FREE LIGHT IMMUNOGLOBULIN CHAINS IN CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM IN PATIENTS WITH CLINICALLY ISOLATED SYNDROME

Marina Vasilj

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) with the first relapse recorded as clinically isolated syndrome (CIS). The diagnostic primarily includes MRI findings and demonstration of intrathecal synthesis of oligoclonal IgG bands with a qualitative method of isoelectric focusing (IEF) with immunofixation. Recent studies have shown high concentrations of free light chains in CSF in these patients, especially kappa type (KFLC).

The objective of the study was to evaluate diagnostic and predictive value of determination of KFLC in CSF compared to the qualitative procedure of determination of oligoclonal bands (OB) in patients with CIS who have converted to MS during a two-year period.

Methods and patients: For 151 patients with suspected CIS, who were admitted to Clinic of Neurology, concentrations of KFLC, total IgG and albumin in CSF and serum were measured by an immunonephelometric method. CSF/serum quotients (Q_{KFLC}, Q_{IgG} and Q_{Alb}) and indices $KFLC_{index}$ (Q_{KFLC}/Q_{Alb}) and IgG_{index}(Q_{IgG}/Q_{Alb}) were also calculated with regards to albumin, and the presence of OB was assessed with isoelectric focusing. Based on the clinical picture, OB and MRI findings, 50 patients were classified as „other neurological diseases (OND)“ and 101 patients were classified as CIS, 50 of which converted to MS (D-MS) in a two-year period.

Results: An optimal cut-off was determined with analysis and comparison of ROC curve, and with median comparison of KFLC parameters, with regards to CIS diagnosis and conversion to MS. ROC analysis for accuracy of intrathecal synthesis showed the best results for Q_{KFLC} with AUC of 0.891 and cut-off of 0.027 with the diagnostic sensitivity of 73.2 % and specificity of 96.0 %. The diagnostic accuracy of $KFLC_{index}$ for conversion of CIS to MS showed AUC of 0,840 and cut-off of 9.092. Q_{KFLC} values below 0.0148 and above 0.0270 indicate needlessness for a qualitative, technically demanding method of IEF with immunofixation for demonstration of OB. $KFLC_{index}$ value below 4.44 in patients with CIS does not indicate conversion to MS inside a two-year period while value of $KFLC_{index}$ above 104.54 is very indicative of this diagnosis.

Conclusion: The application of KFLC parameters could serve as a screening method, and OB could be used in undefined clinical cases only. KFLC parameters are significantly higher in patients who converted to MS, and can contribute to an early diagnosis and prompt therapy with their predictive role.

Ključne riječi: free light kappa chains, multiple sclerosis, clinically isolated syndrome, oligoclonal IgG bands, isoelectric focusing, immunofixation

This thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.

Thesis includes: 96 pages, 12 figures, 14 tables and 158 references. The original is written in Croatian language.

Mentors: **Nada Vrkić, PhD,** Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Vanja Bašić Kes, PhD, Full Professor, School of Dental Medicine University of Zagreb

Reviewers: **Željka Vogrinc, PhD,** Research Associate, University Hospital Center Zagreb
Lada Rumora, PhD, Full Professor with Tenure, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Fran Borovečki, PhD, Associate Professor, School of Medicine University of Zagreb

Thesis accepted: **January 23rd, 2019**