PROTEOMIC ANALYSIS OF CEREBROSPINAL FLUID FOR RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS AND CLINICALLY ISOLATED SYNDROME

PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich - TAMBOR, Vojtěch - PIMKOVÁ, Kristýna - VU, Dai Long - KUČA, Kamil - ŠTOURAČ, Pavel - VALIŠ, Martin. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid for relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome. Biomedical Reports, 2016, 5(1), 35-40. ISSN 2049-9434.

Komentář k publikaci

Úvod

RS je chronické, zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému, které se vyznačuje demyelinizací a axonální ztrátou. Je nejčastější příčinou invalidity u mladých lidí. Až 50 % postižených ztratí schopnost samostatné chůze nebo práce do 15 let od stanovení diagnózy. Nevratné axonální poškození může nastat dříve, než dojde k rozvoji prvních klinických příznaků. Proto se intenzivně hledají nové markery, které umožní včasnou diagnózu a léčbu, což by vedlo ke zpomalení procesů onemocnění, které vedou k nevratnému poškození nervového systému. Proteomická analýza CSF zjistila řadu proteinů, jejichž koncentrace byla zvýšena u pacientů s RS (Stoop et al., 2010). Byly již publikovány proteomické studie představující kandidáty na biomarkery u RS (Ottervald et al., 2010), kde byly různé podskupiny RS porovnány s různými kontrolními skupinami. Tyto studie prokázaly velkou škálu potencionálních biomarkerů, pravděpodobně v důsledku různých proteomických přístupů a velkou heterogenitou RS. Většina dosud publikovaných prací se zaměřuje na majoritní část proteomu CSF - na proteiny. Bylo však prokázáno, že kromě vlastních proteinů tvoří řadu diagnosticky zajímavých molekul polypeptidové povahy také endogenní či nativní peptidy, které se nalézají v nízkomolekulárním segmentu proteomu CSF. Tyto peptidy mohou být produkovány proteázami, které jsou specificky regulovány při probíhajícím patologickém procesu. Abnormální aktivace proteáz a endogenní proteolytické aktivity byla popsána i v míšní tkáni u modelu RS (Jain et al., 2009). Dá se předpokládat, že díky kontaktu s CSF se vznikající nativní peptidy mohou uvolňovat do této tekutiny, kde pak mohou být využity jako specifické indikátory RS či jejich jednotlivých subtypů.

Cílem této studie bylo nalézt změny v nízkomolekulárním segmentu proteomu CSF a zjistit, jaké nativní peptidy a v jakém množství se nacházejí v mozkomíšní moku mezi

pacienty s CIS a RR RS oproti zdravé populaci. Takovéto polypeptidy mohou být potenciální nové diagnostické markery a mohou přispět k novým poznatkům o patogenezi onemocnění.

Metodika

Analyzovali jsme celkem 26 vzorků mozkomíšního moku (11 pacientů s CIS a RR RS a 15 vzorků zdravých kontrol). Vlastní analýza byla založena na přístupu, při němž jsou nativní peptidy separovány na kapalinovém chromatografu (LC) a analyzovány tandemovým hmotnostním spektrometrem (MS). Ke kvantitativnímu porovnání hladin analytů mezi skupinami pacientů byla využita metoda isobarického značení pro relativní kvantifikaci. Ke zpracování dat byl použit Perseus software.

Výsledy

Identifikovali jsme celkem 26 proteinů, které byly změněny oproti zdravým kontrolám. Tyto proteiny jsou adenosine deaminase CECR1, Cadherin-6, Calsyntenin-3, Chitinase-3-like protein 2, Dermcidin, Fibrillin-1, Histone H2B, Histone H4, Ig γ-1 chain C region, Ig heavy chain V-II region NEWM, Ig heavy chain V-III region BRO, Ig heavy chain V-III region GAL, Ig heavy chain V-III region WEA, Ig κ chain C region, Ig κ chain V-I region Lay, Ig κ chain V-II region TEW a Ig κ chain V-II region GM607, Ig κ chain V-III region SIE a Ig κ chain V-III region WOL, Immunoglobulin J chain, Mannan-binding lectin serine protease 1, Metalloproteinase inhibitor 1, Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8, Protocadherin-10, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase δ, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase γ, Reticulon-4 receptor, Zinc transporter ZIP10. Devět proteinů bylo zastoupeno v nižším množství, 17 proteinů bylo zastoupeno ve větším množství.

Diskuze a závěr

Celkem tři z námi identifikovaných proteinů prokázali Kroksveen *et al.* (2012) u nemocných s RR RS. Jednalo se o Ig γ-1 chain C region, Ig heavy chain V-III region BRO a Ig κ chain C region. Tyto proteiny mají významnou roli v počáteční aktivaci komplementu. Chitinase 3-like protein 2 je považován za rizikový faktor ve vztahu k nevratné progresi RS (Hinsinger et al., 2015). V naší práci byl prokázán signifikantní

vzestup tohoto proteinu oproti zdravé populaci. Význam dalších proteinů, jejichž změnu jsme pozorovali u pacientů s RS, není doposud uspokojivě vysvětlen a bude předmětem dalšího zkoumání.

LYMPHOCYTES IN THE TREATMENT WITH INTERFERON BETA-1 B

PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich - KLÍMOVÁ, Blanka - ANDRÝS, Ctirad - VOKURKOVÁ, Doris VALIŠ, Martin. Lymphocytes in the treatment with interferon beta-1 b. Multiple Sclerosis and Related Disorders, 2017, 18(neuvedeno), 29-32. ISSN 2211-0348.

Komentář k publikaci

Úvod

Jedním ze základních léků pro CIS nebo RR RS je INFβ-1b. Přesný mechanismus jeho účinku není znám, jedná se o lék s protizánětlivým a imunomodulačním efektem. Tlumí aktivitu subsetu Th1 T-lymfocytů pomocí indukce tvorby IL-10. Snižuje produkce prozánětlivého cytokinu IL-17. Vede k omezení prezentace antigenu a proliferace T-lymfocytů. Snižuje prostupnost hematoencefalické bariéry zablokováním adhezních interakcí, tlumením účinku matrixových metaloproteáz a migrace leukocytů (Markowitz, 2007; Anderton et Liblau, 2008; Chen et al., 2009; Chabot et al., 1997). V této práci byly vyšetřeny jednotlivé populace lymfocytů u nemocných s RS (CIS a RR RS). Cílem bylo najít znaky, které jsou ovlivněny u nemocných léčených INFβ-1b.

Metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 97 pacientů (25 mužů a 72 žen), kteří byli léčeni pro CIS nebo RR RS INFβ 1-b (ve formě podkožní injekce, v dávce 250 μg obden). Nemocným byly odebrány vzorky krve před zahájením léčby a po pěti letech léčby s cílem zjistit změny lymfocytárních populací. Jednalo se o lymfocyty, CD4+ T-lymfocyty, CD8+ T-lymfocyty, CD 19 (B lymfocyty), natural killer – NK buňky (CD3-/CD16+56+), CD3+/CD69+ buňky, CD5 buňky, CD25 buňky, CD3+/CD25+ buňky, CD5+/CD19+ buňky, CD4+/CD45RO+

buňky, CD8+/CD38+ buňky, CD 38 buňky, CD4+/CD45RA+ buňky, CD69 protein, CD40 protein, CD 40L v absolutních i relativních hodnotách a absolutní hodnotu leukocytů. K analýze definovaných znaků byla použita průtoková cytometrie. Ke statistickému zpracování byl použit program MATLAB® (MathWorks, Inc., USA).

Výsledky

Signifikantní pokles byl po pěti letech na hladině významnosti 1 % zjištěn u absolutních i relativních hodnot proteinu CD69, absolutních i relativních hodnot CD8+ T lymfocytů, celkového počtu leukocytů a absolutních hodnot NK buněk. Signifikantní pokles na hladině významnosti 5 % byl zjištěn u absolutní hodnoty lymfocytů, relativních hodnot CD4+ T lymfocytů, relativních hodnot CD3+/CD69+ buněk a absolutních hodnot CD8+/CD38+ buněk.

Diskuse

Bylo zjištěno signifikantní snížení parametru CD69. CD69 je specifický antigen ovlivňující proliferaci specifických genů a moduluje imunitní odpověď (Llera et al., 2001). Inhibuje zrání Th17 T-lymfocytů, které mají pravděpodobně rozhodující roli v imunopatogenezi RS (González-Amaro et al., 2013). Obdobně jako Zafranskaya et al. (2007) jsme prokázali signifikantní pokles CD8+ T-lymfocytů. CD8 T-lymfocyty přítomné v lézích mají regulační funkci ve vztahu k progresi onemocnění. Zprostředkovávají supresi Th-lymfocytů prostřednictvím sekrece perforinu, který je pro Th-lymfocyty cytotoxický. Rovněž způsobují transekci axonů a zvyšují vaskulární permeabilitu (Kasper et Shoemaker, 2010). CD3+/CD69+ představuje časně aktivované T-lymfocyty, CD69 se exprimuje na buňkách (na všech leukocytech) už 4h od působení aktivátoru, tj. ještě před vznikem nové DNA blastů (tzn. před buněčnou proliferací), ale jejich exprese klesá už po 24h. CD8+/CD38+ představují aktivované cytotoxické/supresorové T-lymfocyty, jejich zvýšená hodnota je u infekčních onemocnění a typická je vyšší hodnota u HIV pacientů. Ve sledované práci byl zaznamenán pokles CD8+/CD38+. Pokles jsme zaznamenali rovněž u NK buněk.

Závěr

Byť přesný mechanismus účinku INFβ není znám, léčba INFβ snižuje aktivitu RS a oddaluje konverzi do sekundárně progresivní formy. Studie prezentovala některé parametry periferní krve, které byly ovlivněny dlouhodobou léčbou INFβ-1b.

LYMPHOCYTE POPULATIONS AND THEIR CHANGE DURING FIVE-YEAR GLATIRAMER ACETATE TREATMENT

PAVELEK, Zbyšek - VYŠATA, Oldřich – SOBÍŠEK, Lukáš - KLÍMOVÁ, Blanka - ANDRÝS, Ctirad - VOKURKOVÁ, Doris – MAZUROVÁ, Radka - ŠTOURAČ, Pavel - VALIŠ, Martin. Lymphocyte populations and their change during five-year glatiramer acetate treatment. Neurologia i neurochirurgia Polska. 2018 (In press).

Komentář k publikaci

Úvod

Jedním z účinných preparátů v léčbě RS je GA. Působení GA je imunomodulační. GA tlumí zánět a současně má i vlastnosti neuroprotektivní. GA způsobuje přesmyk od aktivity subsetu Th1 T-lymfocytů k aktivitě subsetu Th2 T-lymfocytů. Subset Th1 T-lymfocytů je odpovědný za rozvoj cytotoxické reakce.Th1 T-lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny interferon γ (INFγ), Tumor Necrosis Factor β (TNFβ) a interleukin 2 (IL-2). Naproti tomu Th2 subset T-lymfocytů působí v antagonistickém vztahu k Th1 subsetu T-lymfocytů a produkuje protizánětlivé cytokiny IL-4 a IL-13. Pomocí antigen prezentujících buněk jako jsou monocyty a dendritické buňky mění GA funkci CD4+ and CD8+ T-lymfocytů. Váže se s vysokou afinitou na molekuly MHC (hlavní histokompatibilní komplex) II. třídy na buňkách prezentující MBP (bazický protein myelinu) a takto znemožňuje předkládání antigenních fragmentů odvozených od MBP. Tedy kompetuje s imunogenními fragmenty MBP o receptory na autoreaktivních T-lymfocytech a ty pravděpodobně anergizuje nebo způsobuje jejich apoptózu (Ziemssen et Schrempf, 2007).

Metodika

Ve studii byly analyzovány výsledky 72 pacientů (12 mužů a 60 žen), kteří byli léčeni pro CIS nebo RR RS GA (ve formě podkožní injekce, v dávce 20 mg denně). Nemocným byly odebrány vzorky krve před zahájením léčby a po pěti letech léčby s cílem zjistit změny lymfocytárních populací. Jednalo se o lymfocyty, CD4+ T-lymfocyty, CD8+ T-lymfocyty, CD 19 (B lymfocyty), natural killer – NK buňky (CD3-/CD16+56+), CD3+/CD69+ buňky, CD5 buňky, CD25 buňky, CD38 buňky, CD3+/CD25+ buňky, CD5+/CD19+ buňky, CD4+/ CD45RO+ buňky, CD8+/CD38+ buňky, CD4+/CD45RA+ buňky, CD69 protein, CD40 protein, CD 40L v absolutních i relativních hodnotách a absolutní hodnotu leukocytů. K

analýze definovaných znaků byla použita průtoková cytometrie. Ke statistickému zpracování byl použit system R (r-project.org).

Výsledky

Po pěti letech léčby byl zjištěn signifikantní pokles absolutních i relativních hodnot buněk CD3+/CD69+, absolutních i relativních hodnot proteinu CD69, relativních hodnot buněk CD8+/CD38+ a relativních hodnot buněk CD38. Signifikantní vzestup byl zaznamenán u absolutních i relativních hodnot buněk CD5+/CD45RA+ a absolutních hodnot buněk CD5+/CD45RO+.

Diskuse

Obdobně jako u léčby INFβ-1b, rovněž u dlouhodobé léčby GA jsme prokázali statisticky významné ovlivnění proteinu CD69, buněk CD8+/CD38+ a CD3+/CD69+. Navíc byl zaznamenán pokles relativních hodnot buněk CD38. Jejich funkce ovlivňuje imunitní odpověď (Malavasi et al., 2008).

CD4+/CD45RO+ patří mezi paměťové pomocné T-lymfocyty, tzn. lymfocyty, které se dostaly do kontaktu s antigenem. Tato populace se mění během věku, nejvyšší je v pozdním věku. CD4+/CD45RA+ jsou naivní pomocné T-lymfocyty, tzn. lymfocyty, které se ještě nedostaly do kontaktu s antigenem, tato populace se mění během věku, nejvyšší je v periferii novorozenců. V naší analýze byl prokázán vzestup hodnot těchto buněk. CD4+/CD45RO+ lymfocyty potlačují aktivaci genu NLRP3, který má jednu z klíčových rolí v aktivaci zánětu (Beynon et al., 2012). Prokázaný vzestup CD4+/CD45RO+ lymfocytů tak může ukazovat na jeden z mechanismů působení GA.

Závěr

GA snižuje riziko exacerbace onemocnění pomocí několika známých imunomodulačních mechanismů, přesto není jeho přesný mechanismus účinku znám. Studie prezentovala některé parametry periferní krve, které byly ovlivněny dlouhodobou léčbou GA.

SROVNÁNÍ ÚČINNOSTI SUBKUTÁNNĚ PODÁVANÉHO INTERFERONU BETA-1A 44 MG, DIMETHYL FUMARÁTU A FINGOLIMODU V REÁLNÉ KLINICKÉ PRAXI, MULTICENTRICKÁ OBSERVAČNÍ STUDIE

PAVELEK, Zbyšek – SOBÍŠEK, Lukáš – HORÁKOVÁ, Dana - VALIŠ, Martin. A comparison of efficacy of subcutaneous interferon β-1a 44 µg, dimethyl fumarate and fingolimod in the real-life clinical practise – a multicenter observational study. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2018; 81/ 114(4): 457– 465.

Komentář k publikaci

Úvod

Mezi etablované léky pro RR RS patří INFβ-1a 44ug, DMF a fingolimod. Cílem projektu, resp. výstupem z analýzy z registru ReMuS, bylo srovnat účinnost subkutánně podávaného INFβ-1a 44 µg, DMF a fingolimodu u pacientů s RR RS u nemocných, kterým byla zahájena tato léčba do 90 dní od počátku relapsu v reálné klinické praxi v České republice.

Metodika

Do projektu bylo zahrnuto celkem 279 pacientů s RR RS, kteří prodělali při léčbě první linie (INFβ-1a 22 µg 3 x týdně, INFβ-1a 30 µg 1x týdně, INFβ-1b 250 ug obden, teriflunomid 14 mg denně, GA 20 mg denně nebo GA 40 mg 3 x týdně) jeden relaps a kterým byla léčba změněna buď na INFβ-1a 44 µg nebo na DMF či fingolimod. Sledovanými parametry byly roční počet relapsů (ARR), doba do dalšího relapsu, zastoupení pacientů bez relapsu a změna EDSS po roce léčby u jednotlivých preparátů během 1 letého období od změny léčby.

Výsledky

Po změně terapie došlo u všech tří sledovaných preparátů během roční observace k signifikantnímu zlepšení analyzovaných parametrů. Při porovnání skupiny pacientů s léčbou INFβ-1a 44ug (83 pacientů) versus fingolimod nebo DMF (196 pacientů) bylo ve druhé skupině významnější zlepšení v parametru ARR a změna EDSS. Po spárování pacientů na

terapii INFβ-1a 44ug se skupinou léčenou DMF nebo fingolimodem v poměru 1:1 metodou propensity score matching (83 vs 83 pacientů) zůstal signifikantní vliv na zlepšení sledovaných parametrů před a po změně terapie v obou skupinách, neprokázali jsme ale již signifikantní rozdíl efektu mezi skupinami.

Diskuze a závěr

INFβ-1a 44 ug, DMF i fingolimod prokázaly svou účinnost v řadě studií, pokud došlo k jejich nasazení z důvodu nedostatečně účinné předcházející léčby (Schwid et al., 2005; Cohen et al., 2010; Fox et al., 2012). Výstupy z analýzy z registru ReMuS ukazují, že eskalace léčby na INFβ-1a 44ug, DMF i fingolimod příznivě ovlivňuje parametry změnu EDSS a čas do dalšího