

NAZIV DISERTACIJE: ZNAČAJ SPECIFIČNIH KVANTITATIVNIH VARIJACIJA IMUNOLOŠKIH PARAMETARA KOD PACIJENATA SA MULTIPLIM SKLEROZOM

Autor: Marina Delić-Šarac

Mentor: Prof. dr. Jasminko Karamahić

Datum odbrane: 23.11.2016.

DOI: <https://doi.org/10.17532/DD.2016.07>



Imuni sistem čovjeka je složen sistem organa i tkiva koji je neophodan za normalnu funkciju cijelog organizma čovjeka, jer ga štiti od stranih mikroorganizama, toksina ali i od vlastitih promijenjenih stanica kao što su npr. tumorske stanice. Jedna od najvažnijih sposobnosti imunog sistema je sposobnost da prepoznaje i reaguje na razne strane mikroorganizme ali ne reaguje na antigene sopstvenog organizma. Ova sposobnost se naziva imunološka tolerancija. U procesu normalnog sazrijevanja limfocita neprestano nastaju limfociti koji prepoznaju sopstvene antigene. pa upravo zbog toga i postoje mehanizmi koji spriječavaju njihovu reakciju na sopstvene antigene. Ukoliko dođe do poremećaja ovih mehanizama, nastaju autoimuna oboljenja. Multipla skleroza je oboljenje koje je zahvaća nervne stanice mozga i produžene moždine gdje dolazi do demijelinizacije čiji tačan uzrok ni danas nije poznat ali se smatra da je u osnovi poremećaj funkcije imunog sistema iako neki autori smatraju da su pogođene stanice koje proizvode mijelin. Smatra se da multipla skleroza određena distribucijom uzoraka. Etički aspekti. Ispitivanje će biti provedeno u skladu sa osnovnim principima Helsinške deklaracije (zadnja revizija 2008.g.) o pravima pacijenata uključenih u biomedicinska istraživanja. Rezultati. U ispitivanju je analizirano ukupno 118 uzoraka pacijenata poslanih sa Neurološke klinike Kliničkog Centra Univerziteta u Sarajevu (KCUS/UKCS) od kojih je bilo ukupno 81 ženski i 37 muških pacijenata. Od toga je bilo 44 pacijentice koje su imale tip 1 oligoklonalnih traka i 37 pacijenata sa tipom 2 oligoklonalnih traka. Chi-Squared Testom smo ispitivali statistički značaj zastupljenosti ispitanika muškog i ženskog spola. Zapanili smo da u skupini tipa 2 UG tj. pacijenata koji su suspekti na multiplu sklerozu nalazimo statistički značajnu zastupljenost pacijenata ženskog spola u odnosu na pacijente muškog spola. Kada smo ispitivali kontrolnu skupinu pacijenata istim statističkim testom, nismo uočili da postoji statistički značajna zastupljenost prema spolovima. Kada smo ispitivali vrijednosti limfocita u perifernoj krvi i likvoru dobili smo slijedeće. Distribucije se razlikuju od normalne raspodjele pa su rezultati ispitani neparametrijskim testom Mann Whitney testom kojim su dobijeni slijedeći rezultati. Između kontrolne skupine pacijenata tip 1 OIG i skupine pacijenata koji su suspekti na multiplu sklerozu tj. skupine sa tipom 2 OIG postoji značajna razlika u vrijednostima limfocita koje smo analizirali u uzorcima likvora. Kada smo iste vrijednosti provjerili T testom, takode je zabilježena statistički značajna razlika u prosječnim vrijednostima limfocita likvora. T testom je dokazano da između tipa 1 tj. kontrolnih ispitanika i ispitanika tipa 2 suspektih na multiplu sklerozu, postoji statistički značajna razlika u prosječnim vrijednostima limfocita likvora gdje u prosjeku veće vrijednosti limfocita imaju pacijenti iz skupine sa tipom 2 OIG IgG tj. pacijenti suspekti na multiplu sklerozu. Kada smo ispitivali vrijednosti B limfocita preko aberantnog markera CD19+CD5+ u perifernoj krvi i likvoru dobili smo slijedeće. Kada smo neparametrijskim Mann Whitney testom ispitivali vrijednosti B limfocita preko aberantnog markera CD19+CD5+ dobili smo da postoji značajna razlika u vrijednostima u perifernoj krvi dok nismo našli statistički značajnu vrijednost u uzorcima likvora koji su analizirani sa istim markerom. Kada smo ispitivali vrijednosti HLA-DR (B limfocita i aktiviranih T limfocita u perifernoj krvi i likvoru dobili smo slijedeće. Neparametrijskim Mann Whitney testom je takode utvrđeno i da postoji statistički značajna razlika između kontrolne skupine ispitanika i grupe 2 ispitanika i kod HLA DR varijable u likvoru, gdje se u prosjeku veće vrijednosti nalaze kod kontrolne skupine ispitanika. Kada smo HLADR varijablu ispitili i T testom zapanili smo da su rezultati slični kao i oni dobijeni Mann Whitney testom tj. nade se statistički značajna razlika vrijednosti HLADR u likvoru gdje u prosjeku veće vrijednosti HLADR imaju ispitanici kontrolne skupine. ZAKLJUČCI 1. Analizirano je ukupno 118 uzoraka pacijenata sa neurološke klinike KCUS od kojih 68 kontrola koji su imali tip 1 oligoklonalnih traka i 50 pacijenata koji su bili suspekti na multiplu sklerozu i prilikom analiziranja oligoklonalnih traka OIG IgG na OJ Klinička imunologija UKCS imali dokazan tip 2 OIG IgG. 2. Od ukupno analiziranih uzoraka u kontrolnoj skupini smo imali 44 pacijenata ženskog spola i 24 pacijenta muškog spola dok je u skupini sa tipom 2 pacijenata suspektih na multiplu sklerozu, bilo analizirano 37 uzoraka pacijenata ženskog spola i 13 uzoraka pacijenata muškog spola. Odnosno u kontrolnoj skupini ispitanika 65% ispitanika su žene dok je u skupini sa tipom 2 oligoklonalnih traka 73% ženskih ispitanika. 3. Dalje smo ispitali dob ispitanika. U kontrolnoj skupini ispitanika, koji su imali tip 1 oligoklonalnih traka tj. koji su imali normalan nalaz oligoklonalnih traka srednja ispitivana dob bila 42 godine života dok je kod ispitanika koji su imali tip 2 oligoklonalnih traka (koji ukazuje na postojanje intratekalne sinteze imunoglobulina IgG) srednja ispitivana dob bila 38 godina života. 4. Za sve ispitivane imunološke parametre je određena aritmetička sredina, standardna greška, interval pouzdanosti aritmetičke sredine, medijana, varijanca, standardna devijacija, minimalni i maksimalni rezultat, raspon vrijednosti, asimetrija i kurtioza. 5. Ispitali smo T i B limfocite periferne krvi i likvora koristeći monoklonalna antitijela CD3, CD5, CD4, CD8 za T limfocite i CD19, CD27+IgD+ za B limfocite i CD16*CD56+ za NK stanice te nismo našli značajnija odstupanja u ovim vrijednostima u perifernoj krvi i likvoru kod obje ispitivane skupine. 6. Kada smo neparametrijskim Mann Whitney testom ispitivali vrijednosti B limfocita preko aberantnog markera CD19+CD5+ dobili smo da postoji značajna razlika u vrijednostima u perifernoj krvi kod ispitanika suspektih na multiplu sklerozu, dok nismo našli statistički značajnu vrijednost u uzorcima likvora koji su analizirani sa istim markerom ni kod jedne ispitane skupine. 7. T testom je dokazano da između tipa 1 tj. kontrolnih ispitanika i ispitanika tipa 2 suspektih na multiplu sklerozu, postoji statistički značajna razlika u prosječnim vrijednostima limfocita likvora gdje u prosjeku veće vrijednosti limfocita imaju pacijenti iz skupine sa tipom 2 (HG IgG tj. pacijenti suspekti na multiplu sklerozu. 8. Neparametrijskim Mann Whitney testom je takode utvrđeno i da postoji statistički značajna razlika između kontrolne skupine ispitanika i grupe 2 ispitanika i kod HLA DR varijable u likvoru, gdje se u prosjeku veće vrijednosti nalaze kod kontrolne skupine ispitanika a isto to smo detektovali koristeći i T statistički test. 9. Ispitali smo vrijednosti interleukina 6, TNF alfa i cirkulirajućih imunih kompleksa 1 nismo našli značajnija odstupanja u obje ispitivane skupine, ni u uzorcima periferne krvi ni likvora, jer nismo pratili klinički tok bolesti već novootkrivene pacijente suspektne na multiplu sklerozu i kontrolne ispitanike. 10. Zaključili smo da ovo predstavlja uvod u dodatna istraživanja koja bi pratila efekat kliničkog oblika i težine kliničkog toka multiple skleroze na varijacije u imunološkim markerima.

Ključne riječi: multipla skleroza, imuni sistem, imunološki parametri, autoimuno oboljenje.

DISSERTATION TITLE:**Author:** Marina Delić-Šarac**Mentor:** Prof. dr Jasminko Karamehić**Date of defence:** 23. November 2016**DOI:** <https://doi.org/10.17532/DD.2016.07>

The immune system is a complex system of human organs and tissues, which is essential for normal function of the human body. as it role is in protection against foreign microorganisms, toxins, or from its own changed cells such as eg. tumor cells. One of the most important capabilities of the immune system is its ability to recognize and respond to a variety of foreign microorganisms or own changed cells. This ability is called immunological tolerance. If there is a disturbance of these mechanisms it can cause autoimmune diseases. Multiple sclerosis 1S a disease that affects the nerve cells of the brain and medulla oblongata where there is demyelination whose exact cause is still not known but is thought to be basically a disorder of the immune system, although some authors believe that the affected cells that produce myelin. It is believed that multiple sclerosis today affects more than 2.3 million people worldwide. The disease is not contagious nor directly inherited. Epidemiologists have identified factors that contribute to the spread of multiple sclerosis worldwide and that may help determine the cause of the disease. HYPOTHESIS Null hypothesis: Immunologic parameters are elevated in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis compared with the control group of patients. Alternate hypotheses: Immunologic parameters are not elevated in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis compared with control group of patients. The main objective of the research: Due to previous studies of the immune response in patients suspected of multiple sclerosis, this research wants to consolidate a wider range of immunological markers. with special emphasis on the role of immune T and B lymphocyte markers, IL-6, TNF-alpha and CIC (circulating immune complexes). The specific objectives of the research 1. To analyze the immunological parameters in the cerebrospinal fluid and serum of patients of Tlymphocytes CD4. CD8, CD3, HLA-DR and CD19 on B cells. CDI. Compare results obtained in controle group of patients with patients susceptible to multiple sclerosis 2. To analyze the expression of the immune and the intensity of expression of the marker in CSF and serum of patients and to compare these results (serum and CSF) in patients susceptible to multiple sclerosis patients and control groups. 3. Analysis of IL-6 by ELISA in patients with multiple sclerosis and controls and compare the obtained values in the cerebrospinal fluid and serum of patients. 4. Analyze the value of TNF-alpha ELISA method in patients with multiple sclerosis and controls and compare the obtained values in the cerebrospinal fluid and serum of patients. 5. Analyze CIC (circulating immune complexes) and compare the values obtained in the cerebrospinal fluid and serum of patlents with multiple sclerosis and values of CIC in the control group. This study should be a contribution to improving the diagnosis of multiple sclerosis through the T and B lymphocyte markers as well as other immunological parameters that are not used for now in the diagnosis of Bosnia and Herzegovina and have been recognized and presented in the studies of many authors (mentioned in the introduction). Research Methods: In this research was used several different methods which are processed collected samples of patients: Flow cytometry, ELISA, IEF. Results. We analyzed a total of 118 patient samples of which there were a total of 81 female and 37 male patients. There were 44 patients who had type I oligoclonal bands and 37 patients with type 2 oligoclonal bands. Statistically significant representation of male and female was examined with Chi -squared tests. We observed that in the group of type 2 OIG patients who are suspected to multiple sclerosis found a statistically significant representation of female patients relative to male patients. When we tested a control group of patients the same statistical test. we did not observe a statistically significant representation of gender. Between the control patients and type I Oh group of patients suspected that the multiple sclerosis. group with type 2 OIG is no significant difference in the values of lymphocytes that were analyzed in samples of cerebrospinal fluid. When we have the same values check T test, also recorded a statistically significant difference in average cell fluid. T test proved that from the 1. control individuals and patients of type 2 suspected of multiple sclerosis, a statistically significant difference in average cell fluid. where on average higher value cells have patients from the group with type 2 IgG ie OIG. patients suspected to multiple sclerosis. When we questioned the value of B lymphocytes via aberrant markers CD19 + CD5 + in peripheral blood and cerebrospinal fluid had the following. We found a statistically significant value in the fluid samples that have been analyzed via aberrant markers CD19 + CD5 +. We also found that there is a statistically significant difference between the control group patients and group 2 patients with HLA-DR ariables in CSF, which is on average higher values found in the control group patients. When«e HLADR variable examined and T test we observed that the results are similar to thosc btained by Mann Whitney test.

Key words: Multiple sclerosis, autoimmune disease, immune system, immunological parameters