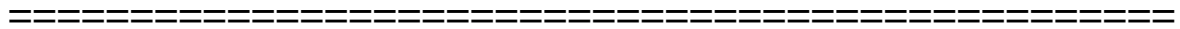


**КЛИНИКА ПО НЕВРОЛОГИЯ НА МБАЛ - НАЦИОНАЛНА
КАРДИОЛОГИЧНА БОЛНИЦА, ЕАД - СОФИЯ**



Д-р Бехидже Баязидова Садарзанска-Терзиева

**КОМПЛЕКСНО ПРОУЧВАНЕ НА КЛИНИЧНИ,
ЕЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧНИ, КОГНИТИВНИ И
ИМУНОЛОГИЧНИ МАРКЕРИ ЗА ПРОГНОЗА НА РИСКА
ОТ КОНВЕРСИЯ НА КЛИНИЧНО ИЗОЛИРАН СИНДРОМ
В МНОЖЕСТВЕНА СКЛЕРОЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на научна и образователна
степен "Доктор"**

Научни ръководители:

проф. д-р Пламен Цветанов, дмн

доц. д-р Любомир Хараланов, дм

Научна специалност

03.01.19 Неврология

София, 2015

Дисертационния труд съдържа 195 стандартни машинописни страници, 32 таблици, 40 фигури. Книгописът включва 353 заглавия, от които 22 на кирилица и 331 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 06.10.2015г. от 14 ч. в Учебната зала на МБАЛ-НКБ, ЕАД, София, съобразно заповед на Изпълнителния Директор N 292/13.07.2015, пред научно жури в състав:

1. Проф. д-р Стефка Янчева, дмн (рецензия)
2. Доц. д-р Красимир Генов, дм (рецензия)
3. Доц. д-р Аделаида Русева, дм (становище)
4. Проф. д-р Пламен Цветанов, дмн (становище)
5. Доц. д-р Любомир Хараланов, дм (становище)

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МБАЛ-НКБ, ЕАД - София и на разположение на интересувашите се на адрес: София 1309. ул. "Коньовица" № 65.

Забележка: Номерата на главите, таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АС	Амплитудно съотношение
ЕП	Евокирани потенциали
ЗЕП	Зрителни евокирани потенциали
ИОА	Интерокуларна асиметрия
ИХА	Интерхемисфериална асиметрия
КИС	Клинично изолиран синдром
КМБ	Кръвно-мозъчна бариера
ЛВ	Латентно време
МРТ	Магнитно-резонансна томография
МС	Множествена склероза
мССЕП	Мозъчно-стволови слухови евокирани потенциали
ОН	Оптичен неврит
ССЕП	Соматосензорни евокирани потенциали
ЦНС	Централна нервна система

Използвани съкращения на думи и изрази на английски език

АСIVAT	Анитколаген тип IV антитета
АЕАТ	Антиеластинови антитета
АТЕАТ	Антитропоеластинови антитета
СIVP	Колаген тип IV пептиди
EDP	Еластин деградационни пептиди
EDSS	Разширена скала за оценка на инвалидността
MMP	Матриксни металопроотеинази
PASAT	Тест за скорост на обработка на слуховата информация
SDMT	Symbol Digit Modalities Test
TIMP	Тъканен инхибитор на металопроотеиназите

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ	4
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	6
3. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ.....	8
4. РЕЗУЛТАТИ ОТ СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ.....	19
5. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....	45
6. ИЗВОДИ.....	54
7. ПРИНОСИ.....	56
8. ПУБЛИКАЦИИ И ЦИТИРАНИЯ.....	58

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Клинично изолираният синдром (КИС) се дефинира като първи демиелинизиращ епизод, подозрителен за множествена склероза (МС), при който поради отсъствие на разпространеност на автоимунния процес във времето не са изпълнени критериите на McDonald и съавт., 2010.

Прогнозирането на риска от конвертиране на КИС в дефинитивна форма на МС е важен от клинична гледна точка въпрос, на който на този етап не е намерено окончателно решение. Особена роля се отрежда на имунологичните маркери, поради важната роля на автоимунните механизми за отключване и протичане на възпалителната увреда на нервните проводници.

При пациентите с КИС е установен повишен IgG синтез и наличие на олигоклонални ивици в ликвора, но тези имунологични промени все още не са валидизирани в клиничната практика като прогностични биомаркери за конверсия в МС. Експерименталните проучвания показват увеличена експресия на матриксни металопроотеинази (ММР), ММР-2 и ММР-9 около плаките и в мозъчната тъкан при алергичен енцефаломиелит. Установено е сигнификантно повишение на ММР-9 в ликвора на болните с МС, но не откриваме литературни данни за проучвания на серумните нива на ММР-2, ММР-9, техните ендogenous инхибитори TIMP-1 и TIMP-2 и субстратите на металопроотеиназната активност еластин и колаген тип IV при КИС.

На базата на разработена от Байданов и сътр., (1987) оригинална ELISA методика за количествено определяне на антиеластинови и антиколагенови антитела в серума, ние изследвахме метаболизма на екстрацелуларните матриксни протеини и синтезираните срещу тях антитела при пациенти с КИС и МС.

Евокираните потенциали (ЕП) се прилагат повече от 30 години в диагностиката на МС, както и за мониториране на хода на заболяването и оценка на ефективността на модифициращите хода на болестта лекарства. Спорни са, обаче остават възможностите на мултимодалните ЕП за прогноза на риска от конверсия на КИС в дефинитивна МС.

Когнитивните нарушения при МС се развиват в 40 до 70% от случаите като подкоров тип деменция и ако се диагностицират при пациенти с КИС се асоциират с по-висок риск за прогресия в МС, но техните прогностични възможности не са достатъчно проучени.

Тези и други дискутабилни и нерешени на този етап въпроси от теоретично и практическо естество при КИС и МС ни мотивираха да проведем настоящото проучване.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Ц Е Л:

Комплексно да се проучат промените на клинични, електрофизиологични, невроизобразителни, когнитивни и имунологични показатели при пациенти с КИС и се оцени прогностичната им стойност за определяне на риска за конверсия в множествена склероза.

С оглед постигане на тази цел е необходимо да се решат следните задачи:

З А Д А Ч И:

- 1. Да се сравни честотата на конверсия в дефинитивна множествена склероза на пациенти с монофокална и мултифокална неврологична симптоматика при първи демиелинизиращ епизод и се определи прогностичното значение на вида на клинично засегнатата функционална система.**
- 2. На основата на функционални скали да се определи тежестта на пристъпа на пациентите с първи демиелинизиращ епизод и се оцени тяхната прогностична роля за прогресия в множествена склероза.**
- 3. Да се проучат прогностичните корелации на психометричните параметри на пациентите с първи демиелинизиращ епизод с клинични, неврофизиологични и невроизобразителни показатели.**

4. Да се установи прогностичното значение за прогресия в множествена склероза на броя на демиелинизиращите лезии, установен чрез магнитно-резонансна томография на пациенти с първи демиелинизиращ епизод.
5. Да се анализират промените на електрофизиологични показатели, отразяващи демиелинизацията и аксоналната увреда на бялото мозъчно вещество и зрителния нерв при пациенти с първи демиелинизиращ епизод, и се определи тяхната прогностична стойност.
6. На основата на количествени имунологични методики да се изследва активността на MMP-9, TIMP, както и нивата на EDP, CIVDP и синтезирани срещу тях антитела в серума на пациенти с първи демиелинизиращ епизод и се определи прогностичния риск на установените промени за конверсия в множествена склероза.

3. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ

3.1. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ

За изпълнение на поставените задачи от януари 2008 до декември 2013 год. във Втора неврологична клиника на УМБАЛ "Д-р Г. Странски" ЕАД–Плевен и Неврологичен кабинет на АИМПСИПНБ "Академика" ЕООД–Плевен след получаване на информирано съгласие са изследвани 154 лица, 50 болни с първи демиелинизиращ епизод и 104 здрави контроли. Електрофизиологичните проучвания са провеждани в Кабинет по електрофизиология на нервната система на УМБАЛ "Д-р Г. Странски" ЕАД–Плевен, а имунологичните проучвания - в Катедрата Биология на Медицински университет - Плевен. Финансовите средства са осигурени по Научен проект № 2/2011.

В началото на проучването са изследвани:

50 пациенти с първи демиелинизиращ епизод (средна възраст 35,7 ± 10,3 (16-58), жени (66%). Участниците са от различни региони на страната.

Пациентите с първи демиелинизиращ епизод отговарят на следните включващи и на нито един от изключващите критерии:

Включващи критерии:

- Болни с настъпил монофокален или мултифокален неврологичен дефицит с продължителност не по-малка от 24 часа и не повече от 3 месеца от неговото начало.
- МРТ установени в T₂ секвенция наличие на поне 2 лезии с размер >3 mm, поне една от които с овоида форма или с перивентрикуларна или инфратенториална локализация.

- Отсъствие на друго заболяване, което би могло по-добре да обясни клиничната и МРТ находка.
- Липса на фебрилитет, инфекция или белези на енцефалопатия.

Исключващи критерии:

- Клиника на пълна или изолирана трансверзална лезия на гръбначен мозък
- Двустранен оптичен неврит
- Дефицит на вит. В12
- Съпътстващи демиелинизиращата лезия мозъчно-съдови заболявания
- Системни неопластични или автоимунни заболявания

Всички изследвания и тестове са проведени в началото на проучването преди провеждане на лечение за пристъп или DMT.

Болните с първи демиелинизиращ епизод са проследени проспективно в продължение на 5 години. Съгласно ревизираните критерии на McDonald и съавт., (2010), **42 (84%) от пациентите с първи пристъп покриха критериите за MS: 27 (54%) през първата година, а други 15 (30%) в рамките на 5 години. 8 (16%) от болните не показаха клинични или МРТ белези за дисеминация във времето и пространството (КИС).**

След 5 - годишния проследяващ период групите са:

I. Първа група болни с MS (n=42; 69,05% жени),

II. Втора група болни с КИС (n=8; 4 жени (50%)

Постановката на проучването и поставените задачи наложиха да се използват 4 контролни групи здрави лица (n=104; 53 жени (50, 96%).

Контролни групи:

- 1. Контролна група за имунологични изследвания (n=27, средна възраст $32,6 \pm 9,6$ (20-54), от които 13 жени (48,2%).**
- 2. Контролна група за когнитивни тестове (n=25, средна възраст $41,8 \pm 11,09$), от които мъже 12 (48%). Средните години на образование $15,5 \pm 2,3$ години, съответстват на тези на проучваните болни.**
- 3. Контролна група за ЗЕП и мССЕП (n=27, средна възраст $37,8 \pm 9,8$, от които жени 13 (49%).**
- 4. Контролна група за ССЕП при стимулация на *n.medianus* и *n.tibialis* (n=25) средната възраст на изследваните лица е $39,8 \pm 10,2$ (20-58), от които жени 14 (56%).**

Всички участници в контролните групи са здрави лица с нормален неврологичен, психичен и соматичен статус.

Една част (n=23; 92%) от контролната група за СЕП са здрави индивиди, останалите (n=2; 8%) са изследвани по повод радикулерни оплаквания, но без сетивен и/или двигателен дефицит и нормални параметри от неврографията на сетивни и двигателни нерви (вкл. късни отговори).

От проучването са изключени болните с неврографаски доказана изразена полиневропатия и/или компресивен синдром с оглед достоверна оценка не само на централното сетивно проводно време (независещо от периферното забавяне), но и на отделните пикови ЛВ.

3.2. МЕТОДИ

3.2.1. КЛИНИЧЕН МЕТОД

Снета е подробна анамнеза за наличие на субективни оплаквания, рискови фактори, минали, придружаващи заболявания. Физикалният статус включва измерване на ръст с ръстомер, тегло, изчисляване на BMI, измерване на артериално налягане според препоръките на СЗО.

Обективизирането на неврологичния дефицит се базира на общоприети **клинични скали**:

- Скалата за отчитане на общия функционален дефицит по Kurtzke и съавт. (1983) - **Expanded Disability Status Scale (EDSS)**.

Всяка от функциите се оценява с точки. Увеличението в тази 10-степенна скала е със стъпка от 0,5 точки, като всяко покачване е израз на влошаване с нарастване на инвалидността.

- За допълнителна оценка е прилагана приетата от 1994 г. скала MSFC и нейната ревизия от 2001г. **MSFC** е съставена от 3 теста: 25-Foot Walk, 9HPT и когнитивни функции оценени с PASAT.

- **Ambulation index (AI)** скала за оценка на походката.

3.2.2. НЕВРОФИЗИОЛОГИЧЕН МЕТОД

3.2.2.1. СОМАТОСЕНЗОРНИ ЕВОКИРАНИ ПОТЕНЦИАЛИ (ССЕП)

Изследванията се провеждат на 4 - канален апарат *Medtronic* версия 5.09 със стандартни, доставени от производителя електроди. Прилагат се общоприети техники за отвеждане на рутинни ССЕП.

При всички изследвани болни се измерват двустранно следните параметри:

- за ССЕР при стимулация на n.medianus - абсолютни P / N13, N20 ЛВ, интерпикови N13-N20 ЛВ, N20-P25 (peak-to-peak) амплитуда, ляво-дясно N20-P25 и N13-N20 разлика в ЛВ, ляво-дясно N20-P25 амплитудно съотношение (АС);
- за ССЕР при стимулация на n.tibialis – абсолютни N22, P37 (P40) ЛВ, интерпикови N22 - P37 (P40) ЛВ, P37 (P40); (peak-to-peak) амплитуда, ляво-дясно P37 (P40) разлика в ЛВ и ляво-дясно P37(P40) АС.

3.2.2.2. ЗРИТЕЛНИ ЕВОКИРАНИ ПОТЕНЦИАЛИ (ЗЕР)

ЗЕР се получават след стимулация с шахматен алтерниращ pattern с честота 2Hz и двуканален монтаж, съобразени със стандарта на Американското дружество по клинична неврофизиология за ЗЕР и с ISCEV стандарт за рутинни ЗЕР.

За абнормни се считат ЛВ по-дълги от средната +3 SD.

3.2.2.3. МОЗЪЧНО-СТВОЛОВИ ЕВОКИРАНИ ПОТЕНЦИАЛИ (МССЕР)

Използван е двуканален монтаж, като апаратната настройка е съгласно Препоръчителния стандарт за кратколатентни слухови ЕР на Американското дружество по клинична неврофизиология.

Измерват се пиковите ЛВ на основните компоненти I, III, V, интерпиковите ЛВ на I-III, I-V, III-V, разликите в пиковите и интерпиковите ЛВ при левостранна и десностранна стимулация, АС на I/V или I/IV-V компонент.

За количествена оценка на абнормностите в мултимодалните ЕР се използва 6-точкова скала, модифицирана от редица автори, на базата на конвенционалната 4 - точкова скала на Fukutake и съавт. (1998).

3.2.3. НЕВРОИЗОБРАЗИТЕЛНИ МЕТОДИ

3.2.3.1 Магнитно-резонансна томография (МРТ) е осъществена на главен мозък с контрастно вещество Gadolinium при всички болни, а при 32 (64%) от тях и на гръбначен мозък на апарат Siemens с мощност 1,5 Т. МРТ изследванията са извършени на един и същ апарат от лицензиран специалист, съобразно ревизираните през 2005 година критерии на Barkhof и сътр. (1997) и Tintore' и съавт. (2000) за дисеминация на лезиите във времето и в пространството.

Изходна МРТ е проведена средно $4,5 \pm 3,4$ (1-14) седмици след демиелинизиращия епизод. В случаите на кортикостероидно лечение за пристъпа (9,5%) МРТ е прилагана средно около 1 мес. след това, но не по-рано от 14-ия ден. Повторна МРТ е осъществена след $13,0 \pm 1,2$ (11-16) седмици при 54% от болните, при нов пристъп при (20%) от болните. След $52,6 \pm 4,8$ (47-66) седмици при 100% от тях, след $58 \pm 1,5$ (52-60) месеца при всички болни.

Прилагани са конвенционални T₁ и T₂ изобразявания, FLAIR, протона гъстота и контрастно усилване с Gadolinium при 100% от болните.

3.2.4. ПСИХОМЕТРИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Психометричните тестове PASAT, SDMT, BVSMT-R, MMSE, BDI-II са администрирани съгласно стандартизирани ръководства за приложението им. Данните са сравнени с 25 съответстващи по възраст, образование и пол здрави контроли.

Когнитивните функции на болните са оценявани със следните тестове: **Paced Auditory Serial Additional Test (PASAT), Symbol Digit Modalities Test (SDMT), Brief Visuospatial Memory Test - Revised (BVSMT-R), Mini Mental State Examination (MMSE)**, интервюирани са с Въпросника на Бек

за депресия - **BDI-II** и са анкетирани с въпросник (**MSQOL**) от 54 въпроса относно качеството на живот при МС.

Данните от анамнезата, физикален, EDSS, MSFC, MMSE, MSQOL, BDI-II са въведени в специално създадена за целта анкетна карта.

3.2.5. НЕВРО-ОФТАЛМОЛОГИЧЕН МЕТОД

Изследване на зрителната острота и цветна периметрия при всички болни при дебюта на заболяването.

3.2.6. ОТОНЕВРОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ за доказване на централен отоневрологичен синдром.

3.2.7. ЕЛЕКТРОМИОГРАФСКО ИЗСЛЕДВАНЕ за изключване на периферна невропатия или полиневропатия.

3.2.8. РЕНТГЕНОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

При отделни болни за изключване на туберкулоза и саркоидоза.

3.2.9. СЕРОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Серологично изследване за лаймска болест (ELISA) при болни, в чийто диференциално диагностичен план е изключването на заболяването.

Анти-нуклеарни, анти-неутрофилни цитоплазматични, анти-кардиолипидни, SS-A и SS-B антитела се изследват при съмнение за васкулити или синдром на Sjogren.

Хормони на щитовидната жлеза се изследват при съответните показания.

3.2.10. ИМУНОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

На всички изследвани лица е взета венозна кръв във вакутейнер от 10ml. Кръвта е събирана в сутрешните часове (7,30-9,30) и 12 часа след последното хранене. След 1 часов престой на стайна температура, кръвта се центрофугира на бавни обороти и отделения серум се разпределя в три химически чисти шишета, добре затворени и съхранявани на -50°C до изследването им чрез ELISA в Катедра Биология. В имунологичната лаборатория са разработени оригинални методики за определяне на EDP, CIVP, АЕАТ и АСІVАТ.

- **Определяне на EDP в серум.** Използва се ELISA методика, разработена от Baydanoff и съавт. (1987). Полиестерините плаки се накапват с $10\ \mu\text{g/ml}$ заешки антиеластини / антитропоеластинови IgG при инкубация за 3 часа на 37°C и пренощуване при 4°C . Следва запълване на кладенчетата на плаките с $100\ \mu\text{l}$ от тествания серум (разреждане 1:5) и инкубация за 1 час на 37°C . След инкубация с анти-овчи IgG пероксидазен имуноконюгат (Sigma, USA), разреден 1:10 000, реакцията се стопира с $50\ \mu\text{l}$ 8N сярна киселина. Резултатите се отчитат на апарат Micro Elisa Reader 210 (Organon Teknika, Belgium) при дължина на вълната от 492 nm.
- **Определяне на CIVP в серум** е извършвано по методика на Nikoloff и съавт. (2000). CIVP се определят в серум чрез ELISA метод. Всяко кладенче се сенсibiliзира с $100\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{g/mL}$ анти-човешко CIV моноклонално антитяло (C1926, Immunogen: human collagen type IV) и престоява на стайна температура за 3 часа, последвано от инкубация на 4°C през нощта. Антитялото разпознава епитоп, локализиран на 1 и/или $\alpha 2$ верига от човешки колаген тип IV. Блокирането на останалите незаети места от полиестерините кладенчета се извършва чрез инкубация за 24 ч. с 1% разтвор на говежди серум

албумин (BSA) (Sigma, USA) във фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS), рН 7,4, съдържащ 0,05% Tween 20. След това 100 μ L от серумните проби (разредени 1:5) или използвания чист човешки човешки пепсин - разграден CIV (0-600 ng/mL) (Sigma, USA), се поставят във всяко кладенче и се инкубират за 1 ч. на 37°C. 100 μ L. Прибавя се второ антитяло (мишо анти-човешко CIV моноклонално антитяло), конюгирано с хрянова пероксидаза във всяко кладенче и пробите престояват на 37°C за 1 ч. Орто-фенибenedиамин (0,4 mg/mL) се разтваря в цитратен буфер и по 100 μ L от този разтвор се прибавя към всяко кладенче за 30 мин. Реакцията се стопира с 50 μ l 8N сярна киселина. Резултатите се отчитат на апарат Microelisa Reader 210 (Organon Teknika, Belgium) при дължина на вълната от 492 nm. Използват се следните контроли: (1) субстратна контрола: в сенсibiliзираните с еластин или колаген кладенчета се добавя само буфер за разтваряне на пробите и колориметричен субстрат; (2) конюгатна контрола: пероксидаза-конюгираното антитяло се добавя директно към сенсibiliзираните с антиген кладенчета; (3) отрицателна контрола за оценка на специфичността на реакцията: антигенът се замества с разтвор на човешки серумен албумин; (4) положителна контрола: тестираните серуми се заместват с анти- α -еластинови или анти-колаген тип IV поликлонални антитела (Elastin Product Company, USA), разтворени 1:2000 в буфер за серуми. Всички серуми се тестват трикратно и се изчислява средна аритметична стойност \pm SE (стандартни единици).

- **Индиректна ELISA за изследване на анти- α -еластинови, антитропеластинови и антиколаген тип IV анитетела от клас IgG, IgM и IgA в човешки серум и ликвор.**

Микротитърните плаки (Microlon U-bottom, high binding, Greiner Bio One, Fricken-hausen Germany) се сенсibiliзират съответно с човешки

аортен α -еластин (EPC-USA), тропоеластинов антиген или човешки плацентарен колаген тип IV (Sigma) в концентрация 10 $\mu\text{g/ml}$ в карбонатен буфер с рН 9.6, по 100 μl в кладенче. След инкубация за 2 часа на 37°C и една нощ на 4°C, кладенчетата се блокират с 0,1% говежди серумен албумин и инкубират за 1 час на 37°C. Тестираните серуми, разредени 1:40 в PBS-Tween, се накапват по 100 μl в кладенче и се инкубират за 1 час на 37°C. Следва накапване на анти-човешки IgG или IgM пероксидазен конюгат (Sigma) в разреждане съответно 1:16 000 и 1:20 000 и инкубация за 1 час на 37°C. Като колориметричен субстрат се използва 0,8 $\mu\text{g/ml}$ О-фенилендиамин (Sigma), разтворен в 0,05 М цитратен буфер (рН 5,0) с 0,01% H_2O_2 . Кладенчетата се промиват трикратно с PBS-Tween 20 след всеки етап на тестирането. Реакцията се спира с добавянето на 50 μl 8N H_2SO_4 и абсорбцията се измерва на автоматичен микро-ELISA Reader (Coulter) при дължина на вълната 490 nm. Всички серуми се изследват трикратно и се изчислява средна аритметична стойност \pm SE.

- **За отчитане на концентрациите на MMP-9 и TIMP-1** се използва кит, базиран на принципа на сандвич ELISA (R&D systems, кат. № DMP900, DTM100). Според указанията на производителя, във всяко кладенче на плаките се накапват 50 μL тестиран серум, разреден 1:100 с калибратор дилуент или стандарт в различна концентрация, за построяване на стандартна права. След 2 часа на стайна температура и разклащане върху шейкър, плаките се промиват трикратно с 300 μL промиващ буфер на кладенче. След последното промиване се добавят 200 μL анти- MMP-9 или анти- TIMP-1 антитяло, конюгирано с пероксидаза и се инкубират за 1 час на стайна температура върху шейкър. Промиват се отново и се добавя по 200 μL субстратен разтвор към всяко кладенче. Инкубира се 30 мин. на стайна температура на тъмно. Реакцията се спира с 50 μL стоп разтвор и се измерва

екстинцията на автоматичен ELISA ридер ("Ceres UV900C" - Bio-Tec Instruments Inc.) на 450 nm. От всеки тестиран серум или стандарт, при всички тестирания се накапват по три кладенчета и се определя средноаритметична стойност на екстинкциите. Изчисляват се концентрациите на MMP-9 и TIMP-1 за всеки тестиран серум по формула, получена от стандартна права, която е построена въз основа на екстинкциите на стандартите в различни концентрации.

3.2.11. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОД

Статистически анализ на данните е осъществен чрез използването на статистическа програма Statgraphics Plus Version 2.1.

За анализа на резултатите е използван корелационен анализ на Pearson, рангов корелационен анализ на Spearman, корекционен критерий χ^2 (хи-квадрат). Средните величини са сравнявани с еднофакторен вариационен анализа (ANOVA). H-критериите на Kruskal Wallis при сравняване на медианните стойности на параметрични величини и U-критерии при съпоставка на показателите за относителен дял.

За статистически достоверни са приети резултатите с ниво на значимост ($p < 0,05$).

4. РЕЗУЛТАТИ ОТ СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ

А. КЛИНИЧНИ РЕЗУЛТАТИ

4.1. Сравнение на демографски показатели при болни с множествена склероза, клинично изолиран синдром и контролна група

Анализът на разпределението по пол показва, че в двете пациентски групи (КИС и МС) сигнификантно ($p < 0,05$) преобладават жените, докато в контролната група, двата пола са представени равномерно ($p > 0,05$).

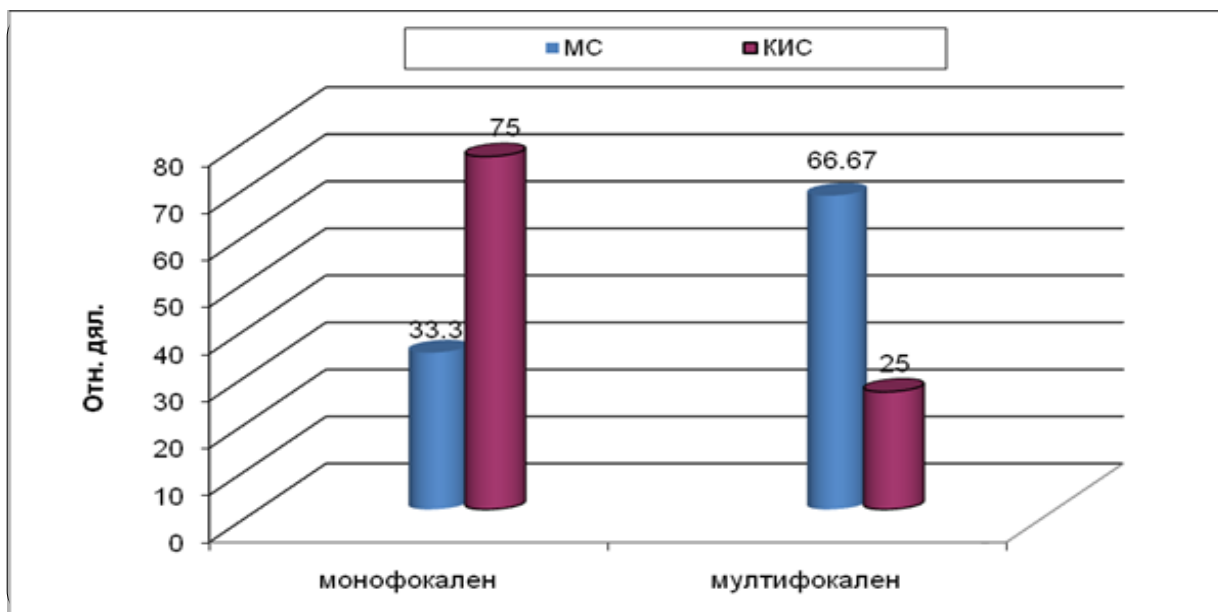
Най-честата коморбидност при болните с МС са ендокринни заболявания: автоимунен тиреоидит ($n=1$; 0,023%), тиреотоксикоза ($n=2$; 0,047%), захарен диабет тип II ($n=2$; 0,047%); микроаденом на хипофизата ($n=2$; 0,047%); увеит ($n=2$; 0,047%); иридоциклит ($n=1$; 0,023%) и артериална хипертония ($n=3$; 0,071). Един от пациентите с КИС е с тиреотоксикоза (0,13%).

4.2. Разпространение и локализация на клиничната увреда при пациенти с МС и КИС

4.2.1. Разпространение на клиничната увреда при МС и КИС

При КИС делът на пациентите с монофокално начало на неврологичната симптоматика при първи пристъп е значително по-висок - $2/3$, в сравнение с тези с мултифокално - $1/3$. При болните с конверсия в МС два пъти по-чест е мултифокалният дебют (фиг. 1).

Статистически значима е разликата между двете групи болни и корелацията между монофокално и мултифокално начало и развитието на дефинитивна МС през изследвания период е голяма - $r = 0,8$; ($p < 0,05$).



Фиг. 1. Процентно разпределение на болните с МС и КИС според клиничното начало

4.2.2. Локализацията на клиничната увреда при МС и КИС

При сравнение на локализацията на симптомите при първи пристъп се установява сигнификантна разлика между двете групи болни ($p < 0,05$). При пациентите с МС (табл.1) преобладават случаите с пирамидна лезия. На второ място са със стволови симптоми, следвани от сетивни, ОН и комбинация от тях (зрителни и сензорни; двигателни нарушения с малко-мозъчни и частична увреда на гръбначния мозък).

Най-честата типична проява на болните с КИС е била с едностранен неврит на зрителния нерв. Еднакъв е процент на случаите със сетивни и стволови нарушения. При един пациент дебютът е със слабост на IV на V пръст на ръката, наподобяващ улнарна пареза.

Клиничната, демографската и МРТ характеристика на болните от двете клинични групи е представена на (табл. 1).

Табл. 1. Демографска, клинична и МРТ характеристика на болните

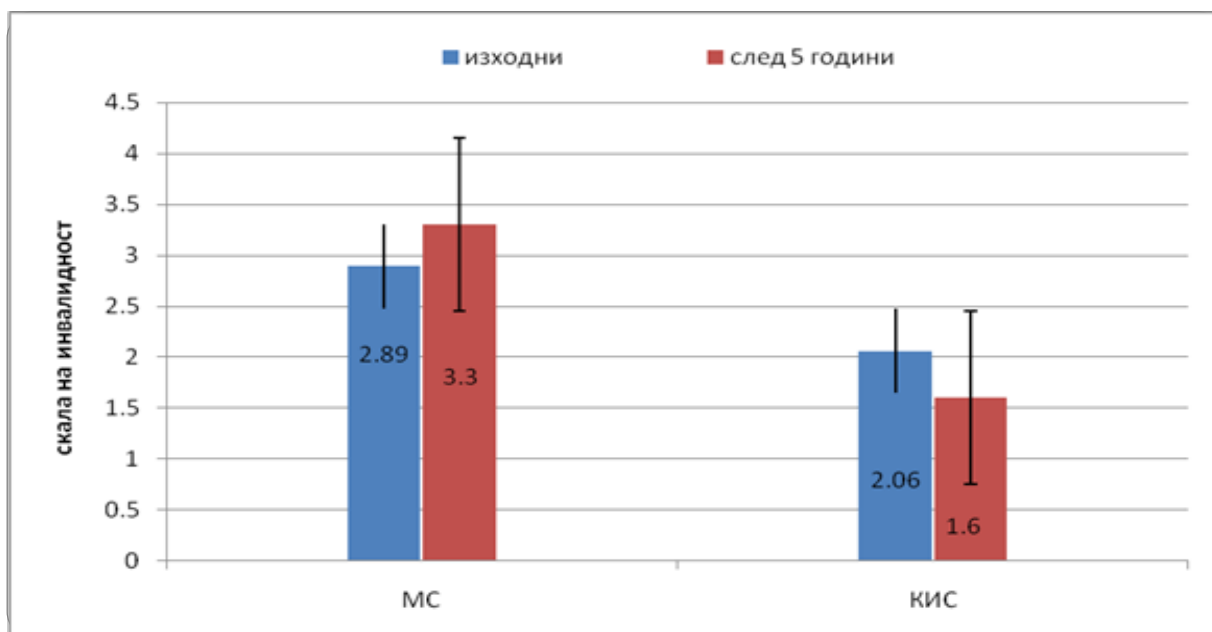
	МС (n=42)	КИС (n=8)	P
Средна възраст	38,9 ± 10,3	32,4 ± 9,5	0,02
Мъже - n (%)	13 (30,95)	3 (37,5)	NS
Начални симптоми			
Моторни симптоми	17 (40,5)	1 (12,5)	0,04†
Сензорни симптоми	5 (11,9)	2 (25,0)	NS
Мозъчно-стволови симптоми	8 (19,0)	2 (25,0)	NS
Малко-мозъчни симптоми	3 (7,14)	0 (0,0)	-
Зрителни симптоми	3 (7,14)	3 (37,5)	NS
Аферентни (сетивни+зрителни)	3 (7,14)	0 (0,0)	-
Еферентни (моторни+церебеларни)	3 (7,14)	0 (0,0)	-
EDSS начален	3,1 ± 0,2 (2,5-4,0)	2,1 ± 0,01 (2,0-2,5)	0,001†
МРТ изходна			
МРТ 1-2 критерии на Barkhof	31 (73,81)	8 (100)	0,059†
МРТ 3-4 критерии на Barkhof	11 (26,19)	0 (0,0)	
Брой начални МРТ лезии > 9	36 (85,71)	1 (12,5)	0,0002†
Брой начални МРТ лезии < 9	6 (14,29)	7 (87,5)	0,0002†
Gd-усилени МРТ лезии	7 (16,6)	0 (0,0)	0,001†

МРТ – МС характерни лезии на магнитно-резонансна томография; **EDSS** - скала за инвалидността по Kurtzke; **Gd** - засилващи се от гадолиниум МРТ лезии; **n** - брой; **P** - ниво на значимост; **NS** - без сигнификантна разлика; † **Kruskal-Wallis Test** при разпределение различно от нормалното

4.3. Сравнение на инвалидността при пациенти с МС и КИС

Първоначалната оценка на инвалидността чрез стандартизирания неврологичен преглед (фиг. 2) по Kurtzke и съавт. (1983), показва сигнификантно по-висок изходен EDSS сбор ($p>0,05$) при пациентите с конверсия в МС, в сравнение с този при КИС.

Количествената оценка на увредата на неврологичните функции при МС е по-висока, както в началото, така и след 5 години ($p=0,0001$).



Фиг. 2. Средни стойности на инвалидността определена чрез EDSS на пациенти с МС и КИС

4.3.1. Сравнение на скалите за инвалидност (MSFC) при пациенти с МС и КИС

Резултатите от MSFC изразени в трансформиран z-скор при първото изследване не се различават значимо ($p>0,05$) между проучваните болни.

Тенденцията за влошаване в изпълнението на отделните тестове на MSFC при пациентите с конверсия в МС започва през първата година след началото на заболяването (при 20% в един, 55% в два показателя, 5% и в трите теста от MSFC). Динамиката на усреднения z-скор при трикратно

изследване на постоянен контингент болни, е по-отчетлива на 1-та година, дори и в случаите без промяна в EDSS-а за съответния период.

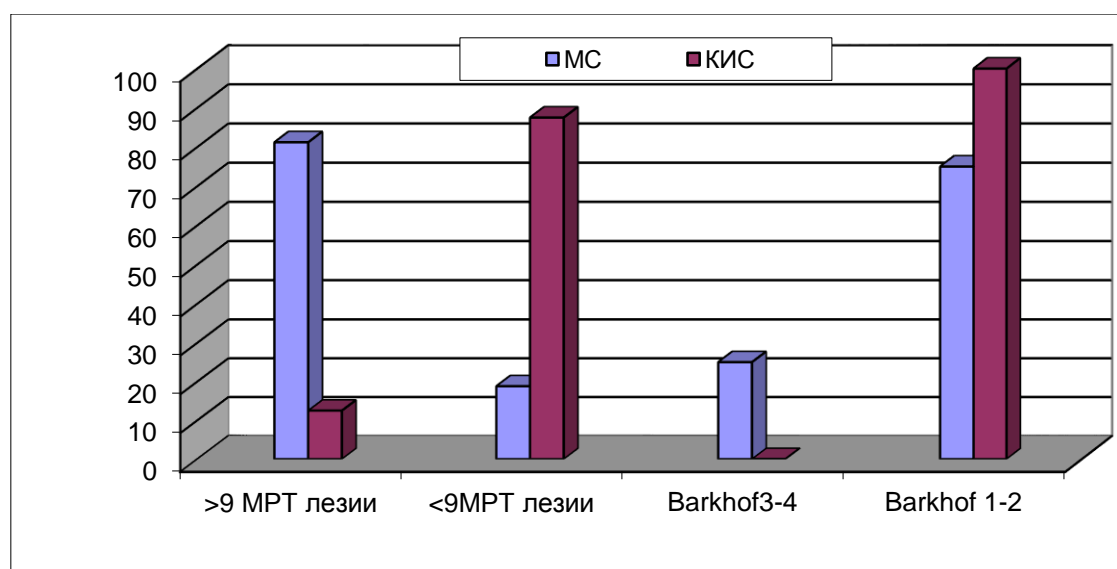
При КИС на първата година се отчита леко подобрене в z-скора, което се задържа на същото ниво след 5 години. Финалната MSFC оценка е със значимо по-нисък z-скор за болните с МС, в сравнение с КИС ($p < 0,05$).

Б. НЕВРОИЗОБРАЗИТЕЛНИ РЕЗУЛТАТИ

Според броя на изпълнените критерии на Barkhof и съавт. (1997) болните са разпределени в три групи: първа - 0 критерия, втора - 1 или 2, трета - 3 или 4.

У пациентите с МС сигнификантно по-висок ($p < 0,05$) е относителният дял на болните с повече от 9 лезии при изходното определяне чрез МРТ, които покриват 3-4 критерия на Barkhof (фиг. 3), в сравнение с КИС.

В групата на КИС значимо ($p < 0,05$) преобладават тези с по-малко от 9 лезии (1-2 критерии на Barkhof); (фиг. 3). Сред тях не се установяват с инфратенториална и спинална локализация на лезиите.



Фиг. 3. Процентно разпределение на пациентите с МС и КИС според броя на МРТ лезиите и броя изпълнени МРТ критерий на Barkhof

В. ЕЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧНИ РЕЗУЛТАТИ

1. ЗРИТЕЛНИ ЕВОКИРАНИ ПОТЕНЦИАЛИ

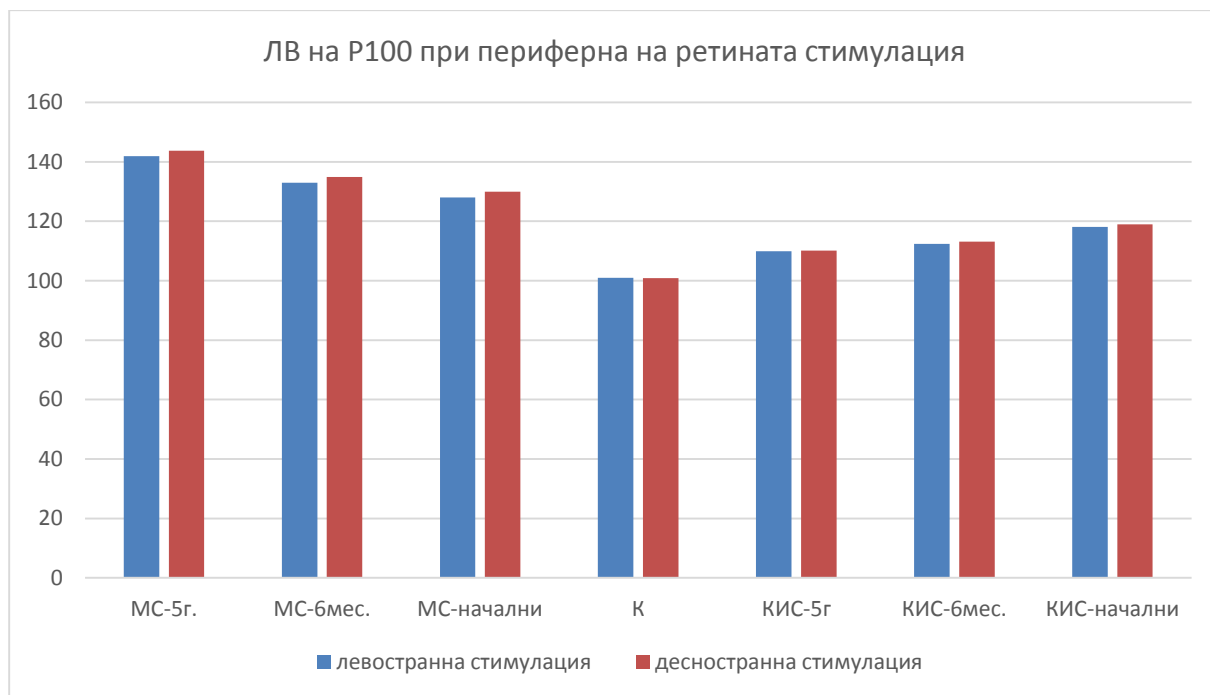
1.1 Сравнение на промените в ЛВ на ЗЕП при МС, КИС и контролна група

ЗЕП се записват средно $3,6 \pm 3,2$ седмици (1-12) от клиничното начало при всички болни, след $24,6 \pm 0,88$ месеца (23-27) при 25 (50%) и след $55 \pm 8,0$ (52-60) месеца – при 50 от тях (100%).

Средните изходни ЛВ на N75 и P100 на ЗЕП на пациентите с МС са значимо ($p < 0,05$) по-удължени при периферна и фовеална на ретината стимулация, независимо от стимулираната страна, в сравнение с контролите, и несъществено ($p > 0,05$) при съпоставка с КИС.

Повторно изследване след 6мес. в групата на КИС показва значима редукция на ЛВ на P100 при периферна на ретината стимулация. При болните с конверсия в МС, обратно - за пролонгиране на ЛВ и при двата вида стимулация, но по-изразено при периферна на ретината стимулация (фиг. 4).

В края на проследявания период разликите в ЛВ на P100 между изследваните групи болни са сигнификантни ($p < 0,05$) само при периферна на ретината стимулация.



Фиг. 4. Динамика на ЛВ на P100 (msec.) на ЗЕП при пациентите с МС, КИС и контролна група здрави лица

При началното измерване средноаритметичната стойност на ИХА и ИОА на вълновите компоненти N75 и P100 е над установената от нас норма +3SD и в двете клинични групи, независимо от вида на стимулацията ($p > 0,05$).

Промяната във времето на ИХА и ИОА не е еднопосочна. Значимо намаление на ИОА настъпва след преживян ОН, а на ИХА след успешно повлияване от DMT на лезията по хода на зрителните пътища в дадена хемисфера. Обратно, увеличението на ИХА вероятно се дължи на появата на нова лезия по протежение на зрителните пътища.

Допълнително болните с първи пристъп, подозрителен за МС, са разделени в две подгрупи при изследване на ЗЕП: подгрупа 1 - клинично начало с ОН и подгрупа 2 - без клиника и/или анамнеза за ОН.

1.2. Сравнение на промените в ЛВ на ЗЕП при болните с първи демиелинизиращ епизод в двете подгрупи с ОН и без ОН

Резултатите от изследването показват, че при пациентите с първи пристъп и клинично начало с ОН усреднените ЛВ на N75 и P100 са сигнификантно ($p < 0,05$) по-удължени **при фовеална на ретината стимулация**, в сравнение с тези без ОН (табл. 2).

Статистически достоверната разлика в ЛВ на N75 и P100 между засегнатото и незасегнатото око в подгрупата с ОН е в основата на значимата ИОА P100 ($p < 0,05$).

Не се установяват съществени различия по отношение на ИХА за N75 и P100.

Табл. 2. Разпределение на пациенти от подгрупите с оптичен неврит и без оптичен неврит при първи демиелинизиращ епизод според средните латентни времена на N75 и P100 (msec.) при фовеална на ретината стимулация

	Фовеална на ретината стимулация			
Първи демиелинизиращ епизод N=50	Оптичен неврит N=12		Без оптичен неврит N=38	
	Левостранна	Десно- странна	Левостранна	Десно- странна
ЛВ N75 (msec.)	92,67 ± 12,45	99,6 ± 8,04	81,58 ± 10,07	85,07 ± 10,53
ЛВ P100	139,69 ± 20,2	140,16 ± 22,07	126,3 ± 20,57	127,53 ± 18,57

При сравнение на ЛВ на N75 **при периферна на ретината стимулация**, анализът на данните показва значима разлика ($p < 0,05$) между

подгрупата с ОН и тези без ОН и несъществена ($p>0,05$) за средните ЛВ на P100.

При болните с ОН усреднените стойности на параметрите на засегнатото око са сигнификантно по-удължени ($p<0,05$), в сравнение с незасегнатото, респ. значима е и ИОА за N75 и P100.

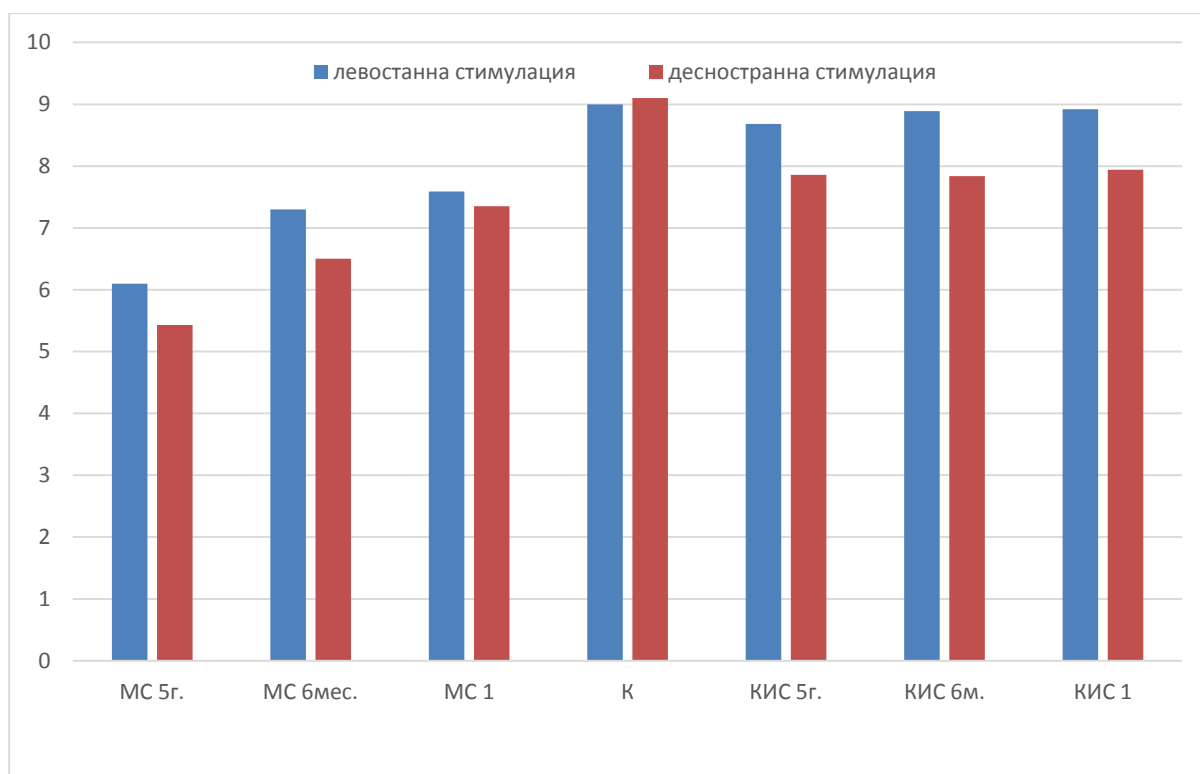
Несъществена ($p>0,05$) е разликата между двете подгрупи по отношение на средноаритметичните стойности на ИХА за N75 и P100 при периферна на ретината стимулация.

1.3. Сравнение на промените в конфигурацията на отговорите и средните амплитуди на ЗЕП при МС, КИС и контролна група

Изходната конфигурация на ЗЕП отговорите е променена и в двете клинични групи в сравнение с контролите ($p<0,05$).

Начално измерените амплитуди се различават сигнификантно между пациентите с МС и КИС при левостранна ($p=0,01$) и десностранна стимулация ($p=0,027$) и незначимо ($p>0,05$) между КИС и контролите (фиг. 5).

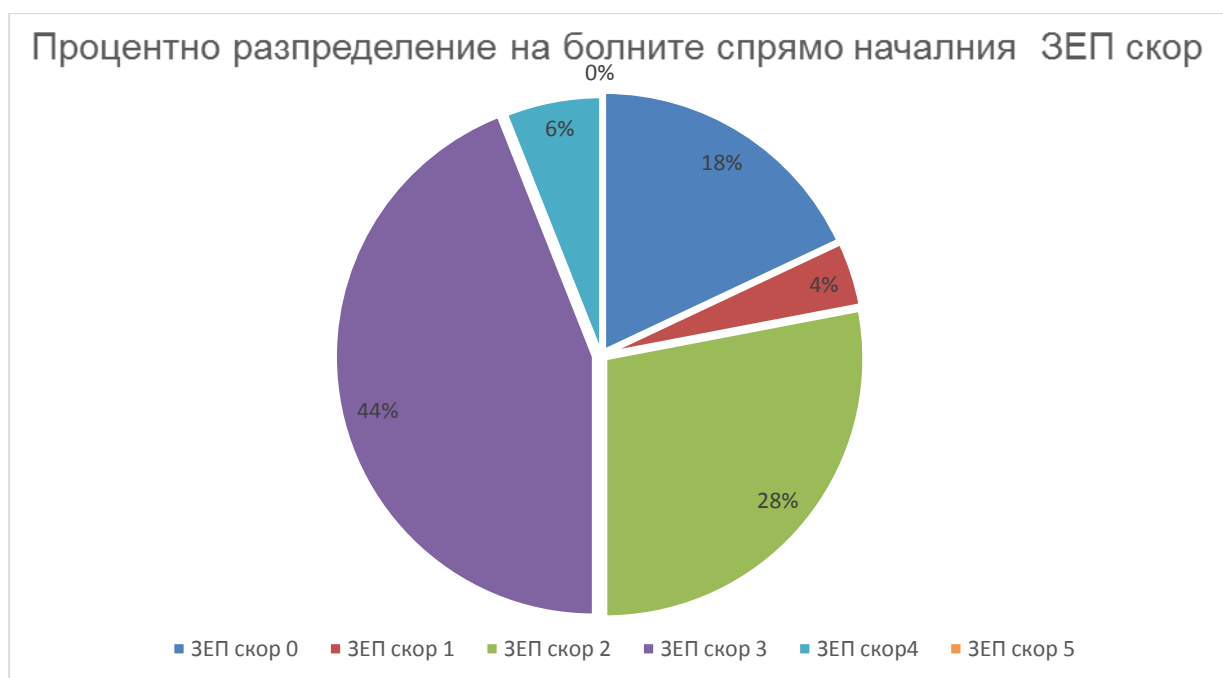
След 6 месеца конфигурационните нарушения перзистират, но без съществена промяна ($p>0,05$), докато амплитудите на ЗЕП в групата болни с конверсия в МС показват сигнификантна ($p<0,05$) тенденция за намаление, вероятно свързана с постепенна прогресия на заболяването (фиг. 5). Най-изразено е това при последното 3-то ЗЕП изследване при болните с МС.



Фиг. 5. Средни стойности на амплитудите на P100 на пациенти с МС, КИС и контролна група при левостранна и десностранна стимулация през различни периоди

1.4. Характеристика на болните при първи демиелинизиращ епизод на базата на количествени параметри - ЗЕП сбор

Началната оценка на ЗЕП сбора (фиг. 6) показва при 82% от болните с първи пристъп нарушения в тази модалност. Разпределението на пациентите спрямо тежестта на ЗЕП промените установява сигнификантно ($p < 0,05$) по-висок процент болни с умерени ЗЕП абнормности, в сравнение с тези с ниски и високи стойности.



фиг. 6. Характеристика на пациентите с първи демиелинизиращ епизод според началния ЗЕП скор

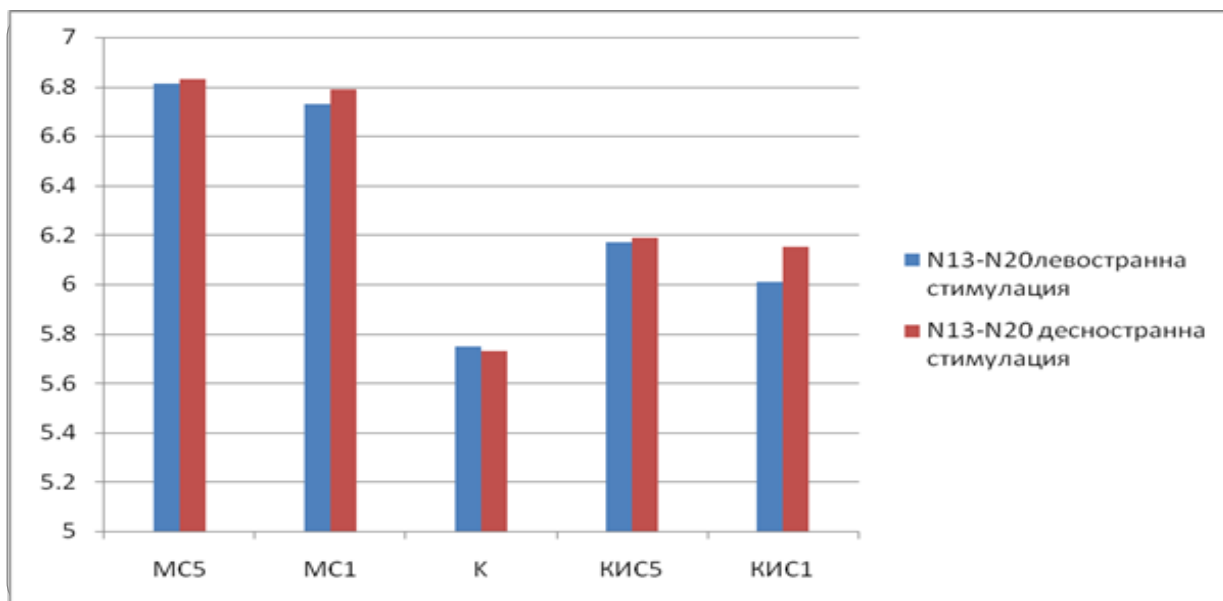
2. СРАВНЕНИЕ НА ПРОМЕНИТЕ В СОМАТОСЕНЗОРНИТЕ ЕВОКИРАНИ ПОТЕНЦИАЛИ

2.1. Сравнение на промените в Интерпиковите интервали N13-N20

ССЕП са изследвани средно $3,85 \pm 3,09$ седмици (1-12) след клиничното начало при 35 болни (70%) и след $57 \pm 1,8$ (52-60) месеца.

Анализът на интерпиковите интервали (N13-N20) при стимулация на n.medianus показва сигнификантна разлика при левостранна ($p=0,0006$) и десностранна стимулация ($p=0,0001$) между двете пациентски групи в началото (фиг. 7) и незначима между КИС и контролите ($p>0,05$).

В края на периода ЛВ на централното проводно време съществено са пролонгирани при левостранна ($p=0,004$) и десностранна стимулация ($p=0,004$) при болните с МС и КИС.

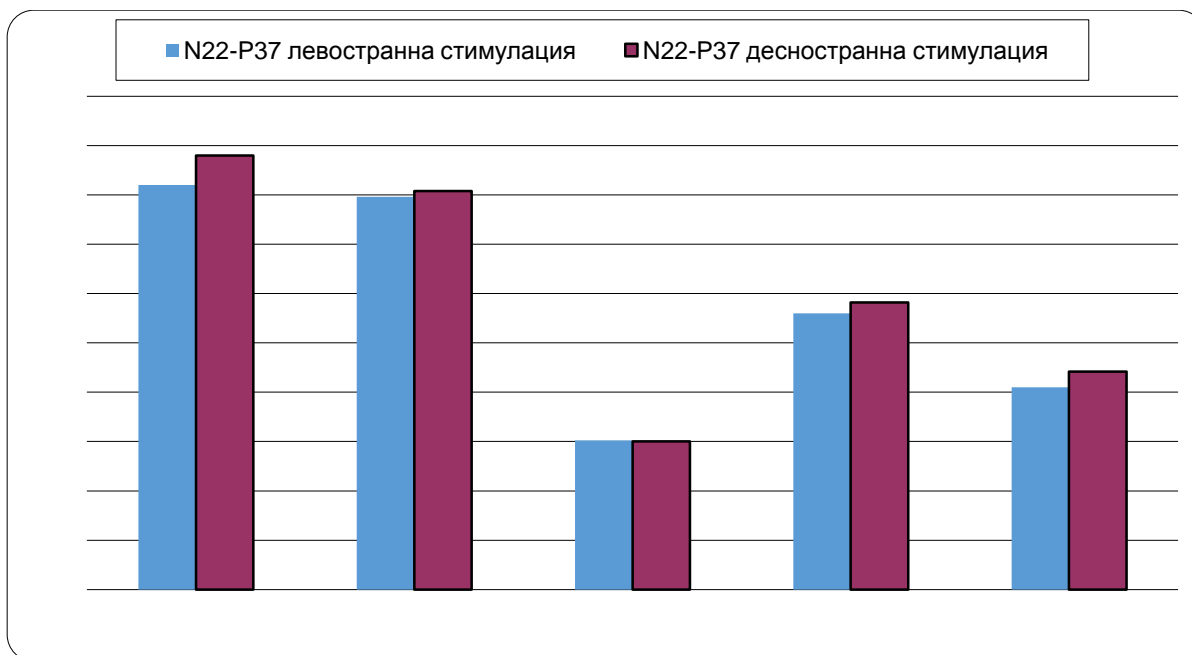


Фиг. 7. Сравнение на пациенти с МС и КИС и контролна група според изходните латентни времена (msec.) на N13-N20 при левостранна и десностранна стимулация на n. Medianus

2.2. Сравнение на промените в интерпиковите интервали N22-P37 при МС и КИС

Статистически значимо по-забавени са ЛВ на N22-P37 при пациенти с МС при левостранна ($p=0,001$) и десностранна ($p=0,003$) стимулация, в сравнение с КИС и контролната група (фиг. 8).

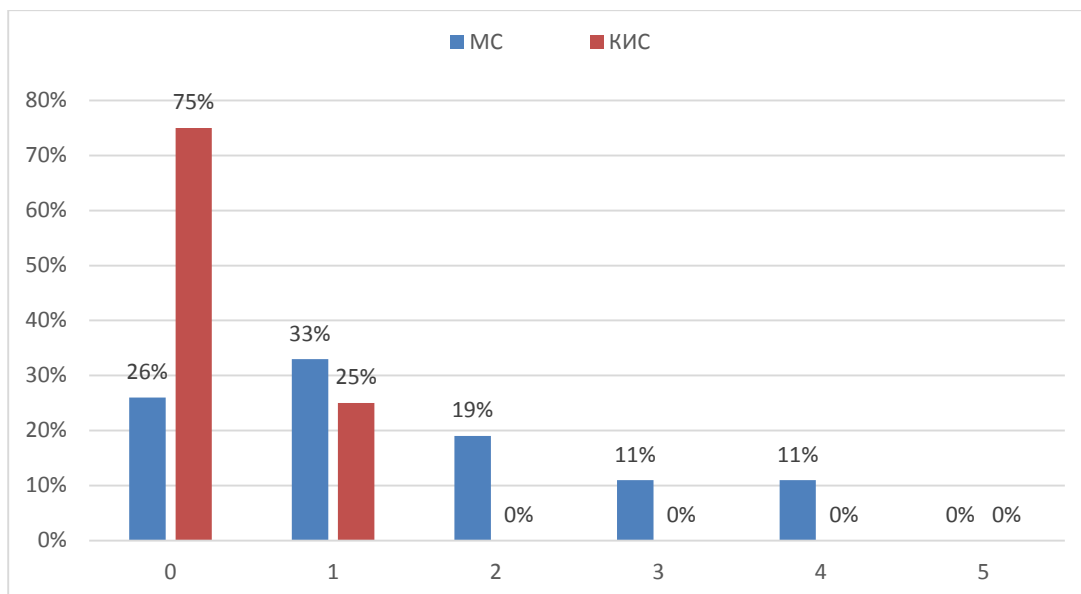
Запазва се тенденцията за нарастване на интерпиковите интервали при болните развили МС, като разликата остава съществена в същите граници при левостранна ($p=0,003$) и десностранна ($p=0,004$) стимулация в края на периода.



Фиг. 8. Сравнение на пациенти с МС, КИС и контролна група според интерпиковите интервали (msec.) на N22-P37 при левостранна и десностранна стимулация на *n. tibialis*

2.3. Характеристика на болните при първи демиелинизиращ епизод на базата на количествени параметри - ССЕП сбор

Според данните от общата оценка на абнормностите в изходните ЛВ и амплитуди на основните пикови компоненти и интерпикови интервали на ССЕП при стимулация на *n. medianus* и *n. tibialis* с конвенционалната количествена скала се установява сигнификантно разлика ($p=0,006$) между изследваните групи болни в началото на периода. При пациентите с конверсия в МС индивидуалния изходен ССЕП сбор е $1,6 \pm 1,1$, при КИС $0,25 \pm 0,5$ (фиг. 9).



фиг. 9. Разпределение на болните с МС и КИС спрямо индивидуалния ССЕП скор при I-то изследване

3. СРАВНЕНИЕ НА ПРОМЕНИТЕ В МОЗЪЧНО-СТВОЛОВИТЕ СЛУХОВИ ЕВОКИРАНИ ПОТЕНЦИАЛИ

3.1. Сравнение на промените в ЛВ на I, III, V пиков компонент и интерпиковите интервали I-V, I-III, I-V

МССЕП и ЗЕП са изследвани в еднакви времеви интервали при всички болни.

Средните изходни ЛВ на I, III и V пиков компонент на мССЕП при всички изследвани лица са в границите на нормата (mean + 2,5 SD).

Интерпиковите интервали не се различават значимо ($p > 0,05$) в началото на проучването.

В края на периода при болните с МС сигнификантно ($p < 0,05$) са удължени ЛВ на I-III, I-V при левостранна стимулация, в сравнение с КИС и контролите.

3.2. Сравнение на промените в амплитудното съотношение I/V компонент

Няма съществена разлика ($p > 0,05$) при анализа на AC на I/V компонент при MC, КИС и контролите при ипси- и крос-стимулация при първото изследване.

За 5-годишния период стойностите на I/V се променят значимо ($p < 0,05$) в групата на болните с MC и разликата с КИС става сигнификантна ($p < 0,05$).

3.3. Характеристика на болните спрямо индивидуалния мССЕП скор

Разпределението на пациентите спрямо началния мССЕП скор показва незначима разлика ($p > 0,05$) в двете групи болни. При MC средната оценка е 1,1 точки, докато пациентите с КИС са без абнормности в тази модалност.

След 5 години се установява динамика с увеличение на мССЕП скор 1,7 при болните с MC, без увеличение при КИС ($p > 0,05$).

4. Сравнение на мултимодалните евокирни потенциали от изследваните модалности при MC и КИС

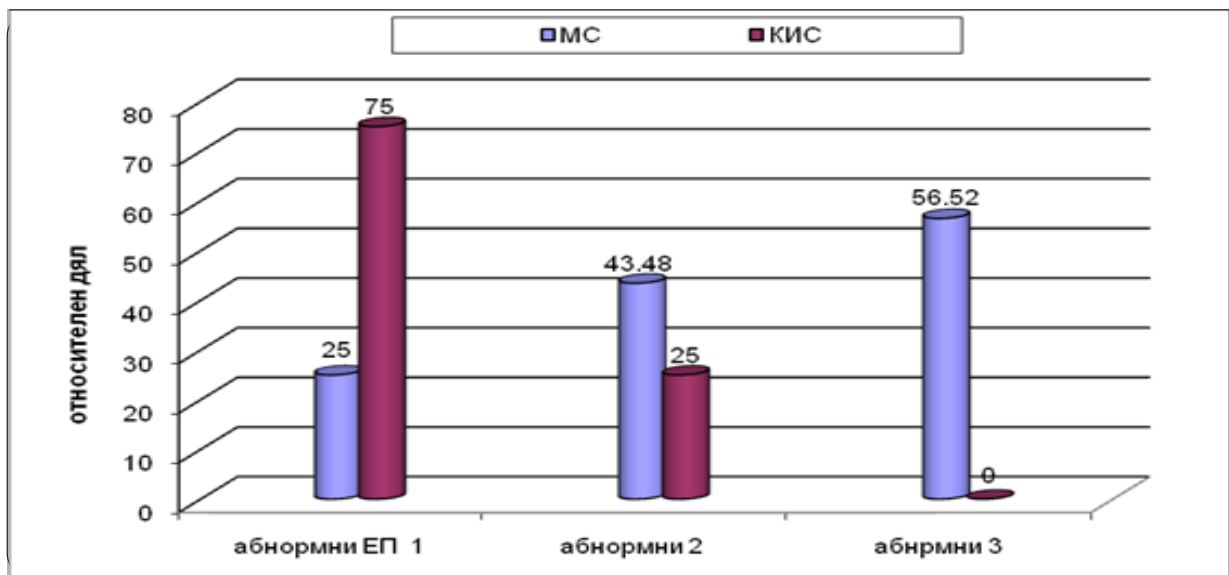
При анализа на общия сбор от изходните ЕП от различни модалности (ЗЕП, мССЕП и ССЕП при стимулация на n.medianus и n.tibialis) - глобални евокирани потенциали и използването на 6-точкова скала, се установява значима разлика в двете групи болни ($p = 0,0001$). При MC средно броят на точките в скалата е 2 пъти по-висок, в сравнение с общия брой точки при КИС.

Делът на изследваните пациенти (фиг. 10) с 1 абнормен ЕП е значително по-висок (75%) при КИС. Комбинацията от 2 абнормни ЕП при

първи пристъп (ЗЕП + ССЕП, ЗЕП + мССЕП, мССЕП + ССЕП) сигнификантно ($p < 0,05$) по-често се наблюдава при МС, в сравнение с КИС.

Началната промяна и в 3-те вида ЕП е по-съществена ($p < 0,05$) при болни с МС.

Не се установяват болни с КИС и 3 абнормни потенциали на началното изследване. Корелацията между изходния брой абнормни ЕП и развитието на дефинитивна МС през изследвания период е голяма ($r = -0,60$; $p = 0,0005$).



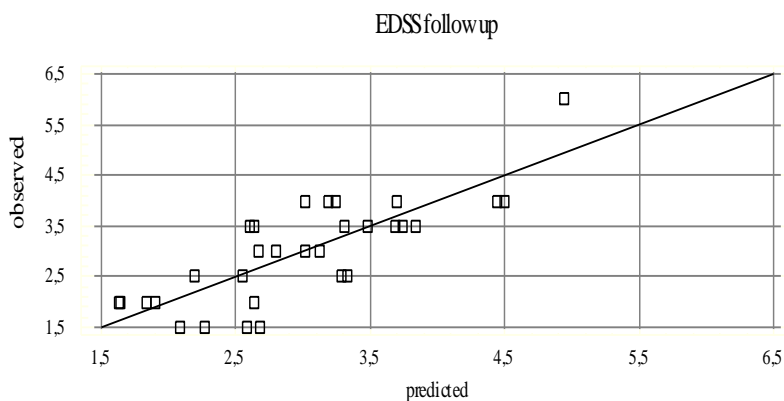
Фиг. 10. Процентно разпределение на пациентите с МС, КИС според броя на установените в началото абнормни евокирани потенциали

5. Корелационни зависимости между клиничните и електрофизиологични показатели при болните с МС и КИС

На основата на многофакторен вариационен анализ се установяват самостоятелната и комбинираната прогностична стойност на клиничните (монофокална, мултифокална симптоматика) с броя и локализацията на МРТ

лезиите (под, над 9 лезии, корова, инфратенториална, спинална) и електрофизиологичните маркери – ЛВ, амплитуди на ЗЕП и ССЕР.

Мултифокалната неврологична симптоматика ($r=0,36$; $p=0,04$), дебют с двигателен дефицит (фиг. 1, табл. 1), начална инвалидност - EDSS над 3,0 ($r=-0,74$; $p=0,0001$), (фиг. 2), в комбинация с изходно установени над 9 МРТ лезии ($r=0,59$; $p=0,0001$), (фиг. 3), удължени ЛВ на ЗЕП ($r=-0,42$; $p=0,04$), (фиг. 4), забавено централно проводно време при стимулация на n.medianus ($r=-0,51$; $p=0,005$), (фиг. 7) и пролонгирани ЛВ при стимулация на n.tibialis ($r=-0,39$; $p=0,03$), (фиг. 8) при пациенти с първи демиелинизиращ епизод, корелират с висок риск от конверсия в МС в рамките на 5 години. Мултирегресионният анализ описва най-добре тази зависимост със следния модел (фиг. 11):



фиг. 11. Положителна корелация между инвалидност, централно проводно време от долни и горни крайници и ЛВ на Р 100 на ЗЕП $r=0,63$ $p=0,0001$

Г. ИМУНОЛОГИЧНИ РЕЗУЛТАТИ

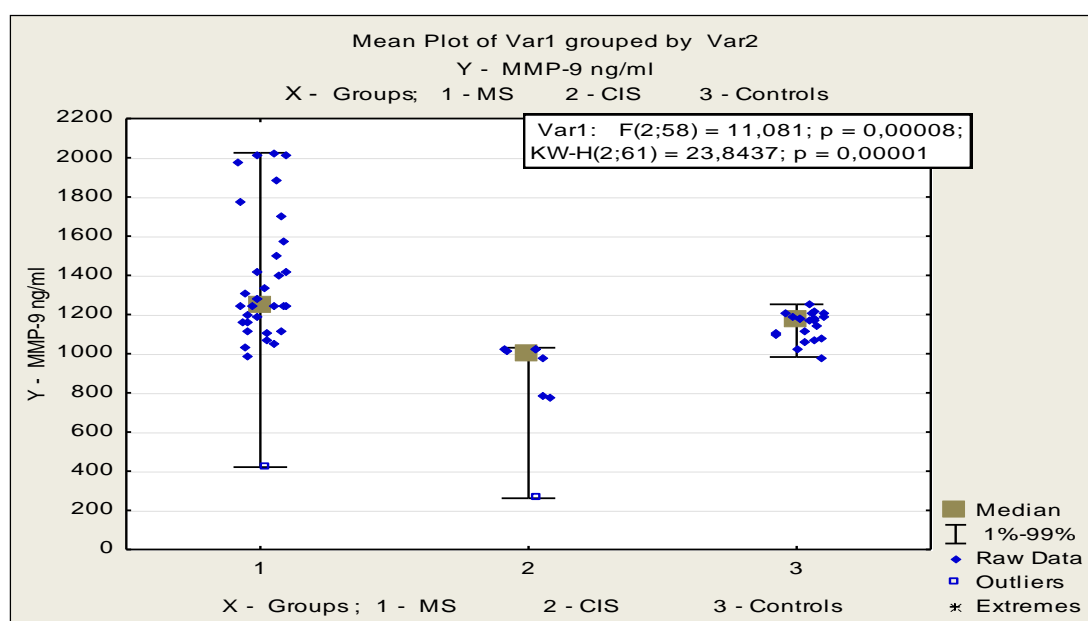
Имунологичните изследвания са проведени средно 5 седмици след клиничното начало (1-12). Повторно изследване средно 16 месеца (12-21) след първи пристъп и трето измерване, средно след 55 месеца (50-60).

1. Сравнение на промените на имунологичните показатели между болните с МС с КИС и контролна група

1.1. Промени в активността на MMP и TIMP в серума на болните с МС, с КИС и контролна група.

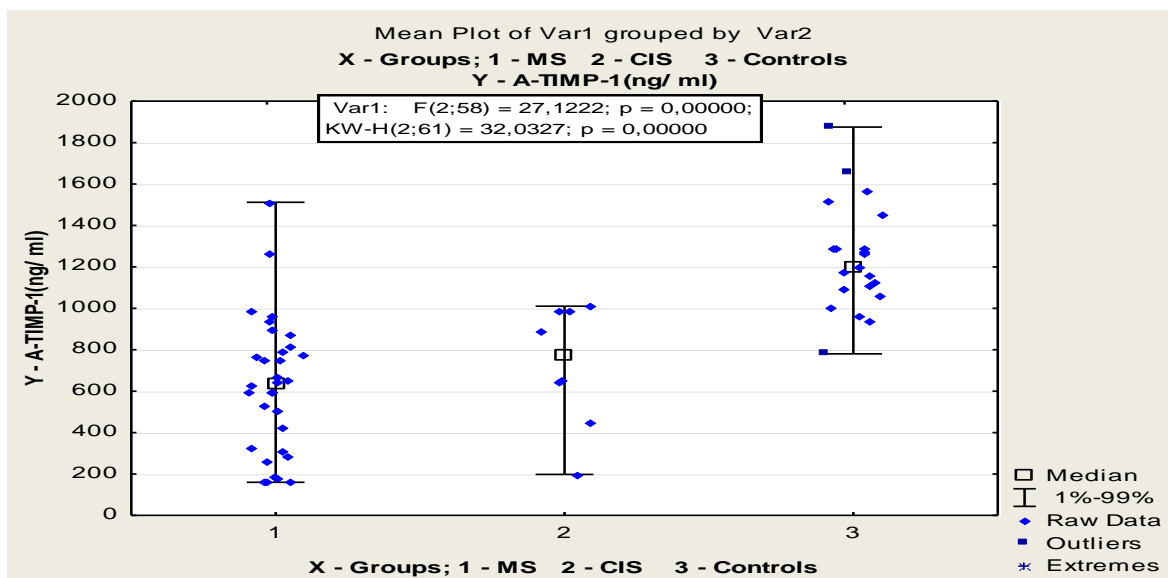
Серумните концентрации на MMP-2 и TIMP-2 в трите изследвани групи се различават несигнификантно ($p > 0,05$) както в началото, така и в края на изследвания период.

При анализа на данните от изходните стойности на MMP-9 (ng/ml) се установяват статистически значимо ($p = 0,0001$) по-високи медианни серумни нива при болните с МС, в сравнение с КИС и здравите контроли (фиг. 12).



Фиг. 12. Разпределение между болните с МС, КИС и контролите според средните стойности на MMP-9 ng/ml в началото

Средните изходни нива на TIMP-1 (ng/ml) са сигнификантно по-високи ($p < 0,0001$) в контролната група в сравнение с пациентите с МС и КИС (фиг. 13) в началото на изследвания период.



Фиг. 13. Разпределение между болни с МС, КИС и контролна група според средните стойности на TIMP1 (ng/ml)

1.2. Промени в метаболизма на еластин при болни с МС, КИС и контролна група

При пациентите с МС и КИС на основата на болестно повишената активност на MMP-9 е налице повишен метаболизъм на екстрацелуларния матриксен протеин - еластин.

1.2.1. Промени в серумните нива на EDP на болни с МС, КИС и контролна група

Установяват се значимо по-високи ($p < 0,05$) серумни концентрации на EDP, измерени в екстинции в началото на периода при пациентите с МС, в сравнение с КИС и тези на контролната група .

В края на проучването разликата между МС и КИС е недостоверна ($p > 0,05$).

1.2.2. Промени в серумните нива на АЕАТ на болни с МС, КИС и контролна група

Сигнификантно по-високи са средните изходни стойности на АЕАТ от група М (ng/ml), ($p = 0,003$) при болните с КИС в сравнение с МС и здравите контроли.

Резултатите от проучването показват съществена разлика в средните нива на IgG АЕАТ ($p < 0,05$) между болните с конверсия в МС и контролите, и несъществена ($p > 0,05$) между МС и КИС.

1.2.3. Промени в метаболизма на тропоеластин при болни с МС, КИС и контролна група

Увеличената еластолиза се съпровожда от еластосинтеза, която се характеризира с увеличение на ТЕ и сигнификантно ($p < 0,05$) увеличение в серума на АТЕАТ при пациентите с МС и КИС.

Статистически значимо по-високи ($p = 0,001$) са измерените средни изходни нива на АТЕАТ от клас IgG в групата на болните с МС, в сравнение с контролната група. Разликата между МС и КИС в началото и в края на периода е несъществена ($p > 0,05$).

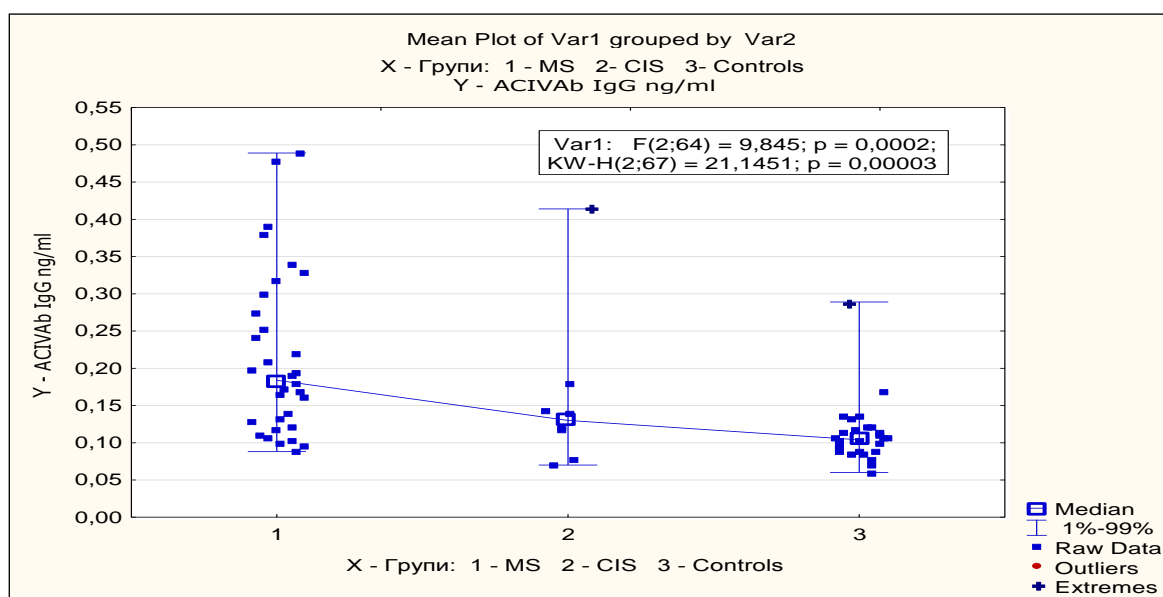
1.3. Промени в метаболизма на колаген при болни с МС, КИС и контролна група

Абнормно промененото MMP-9/TIMP-1 съотношение при МС и КИС е съпроводено с патологично повишен колагенов метаболизъм. В хода на болестния процес е увеличена деградация на колагеновите пептиди, респ. засилена продукцията на антитела срещу тях.

1.3.1. Промени в серумните нива на ACIVAT на болни с МС, КИС и контролна група

Не се установяват значими различия между трите групи по отношение на ACIVAT от IgM клас (табл. 3).

Най-високи ($p < 0,0001$) IgG ACIVAT нива се намират при болните с МС (Фиг. 14) в сравнение с КИС и контролите.



фиг. 14. Сравнение на серумните нива на IgG ACIVAT при болни с МС и КИС и контролна група от здрави лица

В зависимост от изходните стойности на серумните ACIVAT пациентите са разделени в две подгрупи: позитивни ($>P95$) и негативни ($<P95$).

Проспективното проследяване в рамките на 5 години показва (табл. 3), че 60% от болните с патологично повишени (>95 перцентил) IgG ACIVAT конвертират в МС ($p < 0,0005$).

Табл. 3. Имунологични показатели при болни с МС и КИС

Серумни нива		Относителен дял / Брой		
		МС (n=32)	КИС (n=8)	Контроли (n=27)
АСIVAT IgM	Под P95	56,3/18	37,5/3	51,8/14
	Над P95	43,7/14	62,5/5	48,2/13
АСIVAT IgG	Под P95	40,6/13	75,0/6	96,3/26
	Над P95	59,4/19**	25,0/2	3,7/1
АЕАТ IgM	Под P95	93,8/30**	50,0/4	92,6/25
	Над P95	6,2/2	50,0/4	7,4/2
ММР-9	Под P95	43,7/14	87,5/7	100/27
	Над P95	56,3/18**	12,5/1	0, 0/0

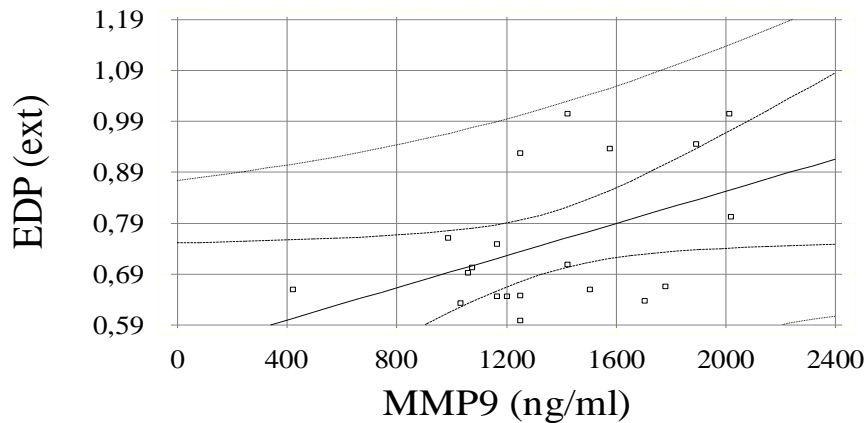
*Използвани съкращения: АСIVAT IgG, АСIVAT IgM (антиколаген тип4 антитела от клас IgG и IgM); МС - множествена склероза; КИС - клинично-изолиран синдром; АЕАТ IgG, АЕАТ IgG - анти-еласинови антитела от клас IgG и IgM; P95-95 перцентил; n- брой **- $p < 0,0005$; * $p < 0,005$*

2. Мултивариационен анализ и прогностични модели на имунологичните промени

Освен проучване на метаболизма на ЕЦМП са изследвани и корелациите на променените показатели с клинични, МРТ и електрофизиологични показатели. Определяна е тяхната диагностична и прогностична стойност за развитие на дефинитивна МС.

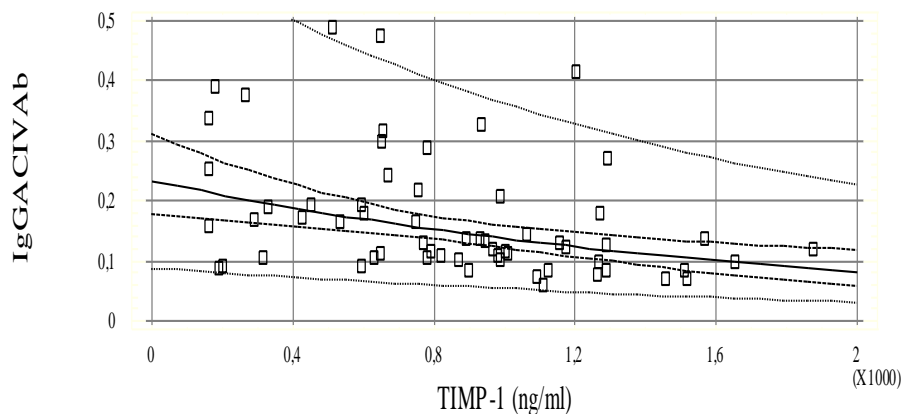
Нивата на IgG АСIVAT корелират позитивно с активността на ММР-9 ($r = 0,37$; $p = 0,003$) и негативно с TIMP-1 ($r = -0,43$; $p = 0,0008$). Промените на антителата са независими от пола, възрастта, мултифокалната неврологична симптоматика, EDSS, броя на лезиите на МРТ и изходните нива на MMP-2 ($p > 0,05$).

Средните изходни нива на MMP-9 корелират умерено позитивно с EDP ($r=0,47$, $p=0,0009$; фиг. 15) и с IgG ACIVAT ($r=0,37$, $p=0,003$) и негативно с IgM AEAT($r= -0,41$, $p=0,0009$).



Фиг. 15. Модел на връзката между MMP9 и EDP ($EDP=0,51+0,00016$ MMP-9); $p=0,0001$; $p=0,0009$

Установява се умерена негативна корелация между TIMP-1 и серумните начални нива на ACIVAT от клас IgG (фиг. 16), ($r= -0,43$, $p=0,0009$).



Фиг. 16. Модел на връзката между IgG ACIVAT= $0,251555-0,0000936395$ *TIMP-1; $r= -0,43$ $p=0,0008$

Д. ПСИХОМЕТРИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ БОЛНИ С МС и КИС

1. Сравнение на психометричните показатели при болни с МС и КИС

1.1. Сравнение на промените в PASAT при болни с МС и КИС

Средните изходни стойности на PASAT са значимо по-ниски ($p < 0,05$) при пациентите с МС при сравнение с болните с КИС и с контролите (табл. 4). На първата година, през целия период и особено на 5-та година сигнификантно ($p < 0,05$) намалява броят на правилните отговори при болните с конверсия в МС, докато при КИС промяната е несъществена ($p > 0,05$).

1.2. Сравнение на промените в SDMT при болни с МС и КИС

Сигнификантно по-висок ($p < 0,05$) е броят на коректните отговори от теста за зрително-перцептуална обработка на информацията при КИС, в сравнение тези с МС (табл. 4) и почти еднакъв с контролите.

1.3. Сравнение на промените в BVSMT-R при болни с МС и КИС при първи пристъп

Параметрите на BVSMT-R при нашите болни, тестващи краткотрайна памет, заучаване и ретенция, се различават значимо от нормалните ($p < 0,05$), както в началото, така и след 5 години (табл. 4). При пациентите с конверсия в МС, подчертано намалена е способността за концентриране, разпределение на вниманието и краткосрочната памет. Те водят до по-нисък сбор точки при тях ($p < 0,05$), в сравнение с болните с КИС.

Табл. 4. Резултати от невропсихологичните тестове

Невропсихологични тестове	МС Mean ± SD	КИС Mean ±SD	К Mean ± SD	р
PASAT	32,2 ± 7,2	46,9 ± 10,1	50,9 ± 2,1	p=0,0001
BVSMT-R Общо	15,4 ± 8,7	20,1 ± 7,0	23,8 ± 5,2	p=0,0001
Заучени				
BVSMT-R с отложено припомняне	6,2 ± 1,4	8,1 ±1,4	9,3 ± 0,7	p=0,0001
BVSMT-R raw score	58.5 ± 13.9	71,7 ± 7.8	63,2 ± 5,9	p= 0,04
SDMT	44,9 ± 7,2	54,6 ± 6,9	55,9 ± 3,5	p=0,0001
BDI-II	5,73 ± 1,28	2,62 ± 1,4	1,10 ± 0,65	p=0,0001
MMSE	27,59± 1,16	28,8± 1,49	29,2± 1,58	p=0,04

Данните са средни аритметични (SD) PASAT - Paced Auditory Serial Additional Test; BVSMT-R - Brief Visuospatial Memory Test-Revised; SDMT- Symbol Digit Modalities Test; BDI-II Въпросник на Бек за депресия † Kruskal-Wallis Test при разпределение различно от нормалното

1.4. Сравнение на промените в MMSE при болни с МС и КИС при първи пристъп

Приложението на по-стандартните и къси тестове като MMSE не ($p>0,05$) показва разлика между проучваните групи болни (табл. 4).

1.5. Сравнение на промените във въпросника за депресия при МС и КИС при първи пристъп

При анализа на данните от въпросника за депресия BDI-II (табл. 4) двете групи болни се различават сигнификантно ($p<0,05$) по между си и с тези на контролите. Най-честото емоционално нарушение при пациентите с МС е депресията, следвана от дисфория, които са средни по степен. Тези афективни нарушения влияят негативно върху ексекутивните функции,

справянето с реални житейски ситуации и рефлектират върху качеството им на живот – MSQOL.

2. Корелации на психометричните тестове с клинични, МРТ и електрофизиологични параметри

Общият сбор точки от **PASAT** корелира негативно с възрастта ($r = -0,38$; $p = 0,03$), централното ССЕРП проводно време за горни ($r = -0,38$; $p = 0,03$) и долни крайници ($r = -0,32$; $p = 0,04$) и инвалидността ($r = -0,42$; $p = 0,01$). Когнитивните нарушения са свързани в умерена степен с броя и локализацията на T1 и T2 лезиите ($r = 0,41$; $p = 0,01$) и с депресията ($r = 0,49$; $p = 0,004$).

Умерена е корелацията между резултатите от теста за зрително-пространствена памет (**SDMT**) и броя на лезиите на МРТ ($r = 0,64$; $p = 0,0001$), броя изпълнени критерии на Barkhof ($r = 0,31$; $p = 0,04$) и зрителната функция, обективизирана с ЛВ на ЗЕРП ($r = 0,45$; $p = 0,0008$). Негативна е връзката с възрастта на проучените болни ($r = -0,42$; $p = 0,01$), началната инвалидност ($r = -0,40$; $p = 0,02$), и депресията ($r = -0,48$; $p = 0,006$). **Общият брой точки на BVSMТ-R, тестващ зрително-пространствената функция, е в отрицателна връзка с инвалидността ($r = -0,40$; $p = 0,02$) и с ЛВ на ЗЕРП ($r = -0,65$; $p = 0,0004$). Умерена по степен е корелацията между крайния сбор от BVSMТ-R с броя на лезиите на МРТ ($r = 0,47$, $p = 0,04$) и афективните нарушения ($r = 0,30$, $p = 0,04$).**

Промяната в повече от 3 невропсихологични теста при скрининговото изследване на болни с първи демиелинизиращ епизод, прогнозира по-висок риск за ранно засягане на познавателните способности и по-бърза инвалидизация.

5. ОБСЪЖДАНЕ

Настоящото проучване изследва корелациите на клинични, имунологични, невроизобразителни, електрофизиологични и когнитивни показатели при пациенти с КИС и се определя тяхното прогностично значение за оценка на риска от развитие на МС.

Данните от демографската структура на проучените пациенти с КИС потвърждава ролята на пола като рисков фактор за МС. Сигнификантно преобладават жените като съотношението е 2:1. В основата на това явление стои ефектът на половите хормони. При начало на болестта след 4-та декада леко преобладават мъжете.

В литературата има съобщения, че късната експозиция на EBV предшествващи травми и хирургични интервенции, тютюнопушенето, повишават риска за МС. Това не се потвърди в резултатите ни. Вероятните причини са младата възраст на проучените лица и малкият им брой.

Мултифокалното начало на неврологичната симптоматика при изследваните от нас болни с КИС е свързано с по-висок риск за конверсия в МС. Тези данни са в унисон с други прогностични проучвания. Полисимптомната изява при дебюта на заболяването отговаря на един от основните критерии за дисеминация на процеса в пространството, но не намира потвърждение от други автори като надежден клиничен белег за развитието на МС.

Анализът на клиничното начало при нашите пациенти, развили МС, показва доминиране на моторни нарушения и нарастване на честотата им с напредване на възрастта. Характерни за тях са асиметричност в локализацията и тежестта, както и дисоциация на симптомите на увреда на централния двигателен неврон.

При проучените болни с КИС най-честата моносимптомна изява беше ОН, както е и по литературните данни.

Първоначалната оценка на инвалидността, определена чрез EDSS, при изследваните от нас пациенти показва значимо по-високи стойности при болните с МС, в сравнение с КИС. Това е свързано с клинично начало с пирамидни и малкомозъчни нарушения. Непълното им възстановяване корелира и с по-високата бъдеща инвалидност. Резултатите от проучването съвпадат със съобщенията, описващи, че по-късият интервал между първи и втори пристъп, по-честите рецидиви в първите 2 години на заболяването и мултифокалното начало са индикатор за по-лоша прогноза.

При нашите болни с КИС по-високата изходна стойност на EDSS се дължи на пациентите с ОН, с частична интернуклеарна офталмопареза и със сетивни симптоми. След 5-годишен период оценката на инвалидността е намалена, т.к. пациентите с двигателни нарушения и полисимптомно начало са покрили ревизираните критерии на McDonald и съавт. (2010) за МС, а останалите с КИС, са имали обратно развитие на дефицита.

Анализът на неврологичните симптоми на изследваните от нас болни показва, че пълното им възстановяване след първия пристъп, дебюта със сензорни симптоми, липсата на втора клинична атака за проследения период заедно с ниската крайна инвалидност, попадат сред белезите описани и в други сравнителни проучвания с добра прогноза.

Болните от двете клинични групи в началото на проучването не се различават по оценените със z-сбор на MSFC, но след 1 година разликата е сигнификантна. Индивидуалната оценка на пациентите с МС показва, че влошаването в 1 или 2 от параметрите на MSFC (9-HPT и PASAT), понижава z-скор, което в повечето случаи не се отразява на EDSS, но предсказва бъдеща инвалидност след 2-та година. Това е в потвърждение на данните от други публикации. Подобрените резултати от MSFC се обясняват с подобрене в протичането и с оставането на болните ни в групата на КИС. Увеличеното време на 25FW при пациентите с МС корелира с промяна в

EDSS през всички периоди, което е очакван резултат с оглед значимостта на самостоятелното придвижване в оценката на EDSS.

Дискутабилни остават предимствата на SDMT пред PASAT при детекция на когнитивните нарушения. В проучването ни тестът за слухова обработка, поддържане на активно внимание и скорост на превключването му (PASAT), се понижава значимо на 1-та година, и е по-чувствителен маркер, в сравнение с този оценяващ зрительно-пространствена памет (SDMT). На 5-та година подчертано по-ниски са резултатите и в двата теста, но влошаването в PASAT е по-изразено, което съответства на резултатите и на други автори.

Данните от проучването потвърждават валидизираната роля на MPT като предиктор за конверсия на КИС в МС. При първото невроизобразяване пациентите, които според критериите на Barkhof и сътр. (1997) имат под 9 лезии, остават с КИС на 5-та година, за разлика от тези с МС, които още в началото покриват 3-4 критерия имат над 9 лезии.

MPT находката (брой и локализация на изходните лезии) при нашите болни с първи демиелинизиращ епизод и клинична изява различна от ОН, предсказват не само конверсия в сигурна МС, но и развитие на бъдеща умерена инвалидност, което съвпада с описаното от редица изследователи.

Сравнението на тестовете, оценяващи когнитивните функции на анализирани от нас пациенти, показва по-добри изходни резултати от PASAT, SDMT, BVSMТ-R при болните, останали с КИС, в сравнение с тези с МС. Вероятно това се дължи на по-малкия брой MPT лезии. По същата причина когнитивно по-съхранени са пациентите с първично-прогресивна форма пред тези със вторично-прогресиента.

Както показват нашите и резултатите на други изследователи, нивото на образование и афективното състояние (тревожност, депресия, мотивация) оказват сигнификантно влияние върху общия брой точки от PASAT.

Евокираните потенциали са с доказана диагностична стойност в клиничната практика, а в последната декада се изследва и прогностичната им роля. Сравнението на средните изходни ЛВ на N75 и P100 на ЗЕП в проучването ни показва значимо забавена и с конфигурационни нарушения зрителна аферентация при болните с КИС и МС, независимо от вида на стимулацията (фовеална и периферна на ретината). Промените и в двете групи пациенти се дължат на клинично начало с ОН и високата сензитивност на ЗЕП. В подгрупата болни с дебют с ОН съществено поудължени са усреднените ЛВ на P100 при фовеална стимулация, вероятно поради по-високата честота на увреда на папило-макулното снопче при тях.

Установените от нас промени се дължат на преобладаващи в ранните етапи процеси на възпаление и демиелинизация, но значимо по-ниските амплитуди съответстват на твърдението, че невродегенерацията също стартира тогава. В подкрепа на това становище е оптичната кохерентна томография, която показва изтъняване на слоя нервни влакна в ретината, дори при случаите с първи демиелинизиращ епизод.

Информативността на ЛВ, амплитудите и конфигурационните нарушения при изследваните от нас болни нараства при проследяване на тези параметри във времето. Установява се устойчива тенденция за намаление на амплитудите на отговорите и пролонгиране на ЛВ при пациентите с конверсия в МС и при двата вида стимулация, но с отчетлива динамика при периферна на ретината стимулация. Проспективно проследените пациенти със статистически значима редукция на амплитудите на ЗЕП на 6-ия месец достигат умерена инвалидизация в рамките на 3 години, резултат, съвпадащ с данните на други автори.

При нашите болни с КИС, изявен с ОН при проследяващи изследвания след 6 месеца и на 1-та година, ЛВ на P100 на засегнатото око намаляват, а с това и ИОА, амплитудите достигат границите на нормата, докато промените в конфигурацията на отговорите и ИХА се променят незначимо.

Началните усреднени ЛВ на N13, коровият пиков компонент N20 и N13-N20 на ССЕР, отведени след стимулация на n.medianus при пациентите ни с конверсия в МС, са сигнификантно по-удължени и корелират с умерена бъдеща инвалидност, което е аналогично с намереното от други изследователи. Сред болните ни няма такива с липсващи компоненти N9 и/или N13 и/или N20. Вероятно се дължи на локализацията и размера на лезиите, които водят до демиелинизация, а не до аксонална увреда или засягане на генератора, въпреки по-широкото му корово представителство и смесена корово-подкорова локализация.

В рамките на настоящия дисертационен труд ССЕР отведени след стимулация на n.tibialis, показват статистически значимо удължени ЛВ на коровия пиков компонент и централното проводно време при болните с конверсия в МС, в сравнение с КИС. Това се обяснява с частична увреда на подкоровото бяло вещество, която не води до загуба на компоненти на отговора на ССЕР, а до пролонгирането им. Установените промени на ССЕР след стимулация на n.tibialis съответстват на данните на известни неврофизиолози и са в тясна връзка с инвалидността, която се обективизира с EDSS. Недостатък на тази скала е акцентът върху възможността за самостоятелно движение при високите ѝ оценки. Следователно дори и една спинална лезия сериозно повлиява EDSS и не случайно най-силна е корелацията на ССЕР особено от долни крайници и инвалидността.

Данните от изследването на мССЕР показват, че пациентите ни с КИС в началото са били без абнормности в тази модалност. В хода на проследяването при малък брой болни с конверсия в МС се установява абнормно I/V AC, удължени пикови и/или интерпикови ЛВ (III, V, I-V, I-III, III-V) с ясно изразена латерализация и сред тях няма такива с липсващи пикови компоненти. Резултатите корелират и с МРТ находка от по-малки стволови лезии, локализирани под горната част на ствола, т.к. над това ниво латерализацията не е сигурна поради двустранни слухови проекции.

Алтернативен метод за количествено определяне на неврофизиологичните абнормности е използването на конвенционална скала, при която се комбинират няколко неврофизиологични изследвания в една отразяваща интегрирано всички сензорни функции глобална скала. В настоящото проучване при пациентите с МС начално оцененият брой на точки в тази скала е 2 пъти по-висок, в сравнение с КИС и потвърждава прогностичната им роля.

В ограниченият брой публикации при болни с КИС, ЕП биха могли да идентифицират пациентите с по-висок риск за инвалидизация, въз основа на изходните им мултимодални ЕП. Това е частично потвърдено от нас, поради малкия брой пациенти с начално установени промени и в трите изследвани модалности.

В последните години широко се проучват някои от **имунологичните маркери** на еластиновата, колагеновата обмяна и крайните гликирани продукти като белег за съдово стареене, при различни клинични манифестации на МСБ, ССЗ и ЗД.

В настоящата разработка промените на АСІVАТ при пациенти с КИС показват, че абнормно високите серумни нива на АСІVАТ от ІgG клас, при първия демиелинизиращ епизод корелират с повишен риск от развитие на МС. Според нас това е първото съобщение за наличие на положителна зависимост между клиничния ход на КИС и нивата на тези антитела.

Колаген тип ІV заедно с протеогликаните и гликопротеините са градивен елемент на базалните мембрани на почти всички тъкани. Този фибрилераен протеин може да бъде дефрагментиран под влияние на различни патологични процеси, а продуктите на тази деструкция СІVР да се появяват в серума. В редица случаи разграждането на СІVР е предизвикано от производство на насочени срещу антигенните детерминанти на колагена автоантитела, каквато е вече установена при някои автоимунни заболявания. В други случаи синтезата на СІVР антитела е вторична и

последва първоначалната деструкция на колагена. В последните години се установи, че серумните нива на IgG ACIVAT позитивно корелират и с развитието на микроваскуларни усложнения при ЗД с диабетна нефропатия, ретинопатия и полиневропатия.

Биологичната база на хуморалния отговор срещу CIVP при MC е все още неясна, но е известно, че този структурен белтък заема основно място във формиране на КМБ. Неговите антигенни детерминанти са таргет на автоантитела, синтезирани срещу тях, подобен патологичен синтез е установен и при увреда на гломерулната базална мембрана при гломерулонефрит.

Известно е, че стартирането на автоимунния процес при MC започва в периферните лимфни възли, след което патологичният процес се трансферира в ЦНС. С помощта на ММР проникналите през КМБ имунни клетки отделят протеинази, основно място между които заема колагеназа, водеща до фрагментация на колаген и поява в серума на продуктите на тази деструкция - CIVP. Същите са мощен стимул за синтез на CIVP антитела, които от своя страна вероятно допълнително увреждат колагеновите влакна и утежняват бариерната дисфункция.

В нашето пручване са анализирани и промените в еластиновия метаболизъм. Той също е активиран в известна степен при пациентите с конверсия в MC, което води до нарастване нивата на EDP в серума. Този процес е следван от повишен синтез на антитела срещу тях, което обяснява достоверните корелации на IgG AEAT и EDP.

По литературни данни серумните **антитела срещу тропоеластина** и еластина са отделно специфични и корелират със съответните им пептидни нива. Съотношението на АТЕАТ към нивата на АЕАТ е показател за процесите на синтез и разграждане. Съществено по-високите серумни нива на IgG АТЕАТ в групата на болните ни развили MC, показват, че подобно

на системната склероза, протичат паралелно и двата процеса на продукция и деградация на еластина.

Резултатите от изследването установяват значимо по-високи стойности на MMP-9 в серума на болните с конверсия в МС, които са сходни с данните на други автори. Waubant и съавт. (1991) намират положителна корелация между повишените серумни нива на MMP-9 и Gd-усилените T1 лезии на МРТ. Това не се потвърди в резултатите ни, най-вероятно поради малкият брой болни с начално установена с МРТ "активна плака".

Увеличените плазмените нива на MMP-9 при пациентите ни с КИС могат да се разглеждат като маркер за нежелани процеси на съдово ремоделиране с последваща перманентна левкоцитната трансмиграция, а не само при пристъп с увреда на КМБ.

Сигнификантно увеличените концентрации на MMP-9 при проучените от нас пациенти с конверсия в МС са съпроводени от значимо по-ниски серумни нива на TIMP-1, което е израз на дисрегулация. От една страна е налице свръхактивация на MMP-9, от друга, неефективен контрол на инхибитора им TIMP-1. Съотношението MMP-9 / TIMP -1 би могло да се използва за осигуряване на *in vivo* оценка на протеолитичния потенциал на MMP-9 за увреда на извънклетъчния матрикс.

В проучването ни с използването на количествен ELISA метод, се установяват абнормно увеличени серумни нива на ACIVAT от клас IgG при пациенти с КИС конвертиращи в МС. Тези антитела корелират с повишен риск от развитие на МС и биха могли да се използват като прогностичен индикатор за определяне на рискови за конверсия пациенти.

За да се внедрят тези методи в клиничната практика са необходими повече проучвания, по-дългосрочно проследяване на по-голям контингент болни, подбор на участниците в ранен етап след първи пристъп подозрителен за МС. Това би изяснило динамиката на колагеновия и

еластинов метаболитъм при КИС и значението им за диагнозата и прогнозата при тези болни, както и терапевтичните подходи към тях.

Проспективният характер на проучването, строгото придържане към ревизираните критерии на McDonald и съавт. (2010), използването на подходящи за целта статистически методи, както и установените съществени тенденции при анализ на резултатите подкрепят тяхната достоверност, въпреки сравнително малкия брой болни.

В заключение, комплексната оценка на клинични, имунологични, електрофизиологични и когнитивни показатели е оптимален подход за определяне на пациентите с КИС застрашени от прогресия в МС.

6. ИЗВОДИ

- 1. Установяването на удължени латентни времена при изследване на соматосензорни евокирани потенциали при стимулация на n.medianus и n. tibialis на пациенти с КИС с мултифокален неврологичният дефицит, е надежден прогностичен маркер за конверсия в МС в рамките на 5 години.**
- 2. Наличието на електрофизиологични белези на ранна в рамките на 6 месеца от началото на пристъпа аксонална дегенерация на нервните влакна, установено при изследване на ЗЕП и ССЕП на болни с КИС, корелира с повишен риск от развитие на МС в рамките на 3 години.**
- 3. Клинико-електрофизиологично-невроизобразителната констелация от инвалидност по време на пристъпа с общ EDSS сбор >3, сигнификантно удължено латентно време на ССЕП n.tibialis >2 SD в сравнение с контролна група здрави лица и >9 лезии от началното МРТ изследване идентифицира субгрупа от болни с КИС с висок риск от развитие на МС.**
- 4. Резултатите от психометричните тестове при болните с КИС достоверно корелират с демографските, неврофизиологичните и невроизобразителните показатели и имат самостоятелна прогностична стойност при оценка на риска от конверсия.**
- 5. При пациентите с МС и КИС повишената активност на MMP-9 и/или недостатъчната инхибиция от страна на ендогенения им инхибитор - TIMP-1 води до патологично активиран метаболизъм на**

екстрацелуларните матриксни протеини колаген тип IV и еластин и съответно сигнификантно повишение на серумните нива на деградационните им пептиди и синтезираните срещу тях антитела.

- 6. Абнормно повишените нива на ACIVAT от IgG клас и повишената MMP-9 активност при пациенти с КИС корелират със сигнификантно увеличен риск от развитие на МС.**

7. ПРИНОСИ

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ ПРИНОСИ

1. За първи път в страната и чужбина при пациенти с МС и КИС се установява болестно повишен метаболизъм на колаген тип IV, основен структурен белтък на кръвно-мозъчната бариера.
2. За първи път в страната и чужбина се установява положителна зависимост между клиничния ход на КИС и нивата на антителата срещу разградните продукти на колаген тип IV.
3. За първи път в страната и чужбина при пациенти с МС комплексно се анализират корелациите на промените в метаболизма на ЕЦМП и синтезираните срещу тях антитела с клинични, електрофизиологични и невроизобразителни показатели.
4. За първи път в страната при болните с КИС се установява позитивна зависимост между абнормно променени електрофизиологични параметри, отразяващи демиелинизиращата и аксонална увреда на оптичния нерв (зрителни евокирани потенциали) и бялото мозъчно вещество (соматосензорни евокирани потенциали) и риска от развитие на МС.
5. За първи път приложената у нас констелация на психометрични тестове с демографски, неврофизиологични и невроизобразителни показатели може да се използва при оценка на тяхната комбинирана прогностична стойност за определяне на риска от конверсия в МС.

6. Потвърждава се при болните с МС установената в чужбина зависимост на клиничния ход на заболяването и изходните серумни нива на матриксните металопротеинази.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИ ПРИНОСИ

1. Разработена е имунологична методика за количествено определяне в серума на болни с МС и КИС на циркулиращи деградационни продукти на метаболизма на екстрацелуларните матриксни протеини еластин и колаген.
2. Разработена е имунологична методика за количествено определяне в серума на болни с МС и КИС на антиколаген тип IV и на антиеластинови антитела.
3. Установяването на абнормно променено съотношение на MMP-9/ TIMP-1 може да се използва за надеждна *in vivo* оценка на протеолитичния потенциал на MMP-9 за увреда на екстрацелуларния матрикс при болните с МС.
4. Количественото определяне на основата на ELISA на ACIVAT от IgG клас при болни с КИС може да се използва като надежден серумен прогностичен маркер в комплексната оценка на риска от конверсия в МС.
5. Използването на стандартизирани когнитивни тестове при болни с първи демиелинизиращ пристъп може да се използва като допълнителен метод в комплексната оценка на риска от конверсия на болните с КИС.

8. Научни публикации и съобщения свързани с темата на дисертацията

Научни публикации

1. Садарзанска-Терзиева, Б., Тоцев, Н., Цветанов, П. Клинично изолиран синдром: прогноза и превенция на риска от конверсия в дефинитивна мултиплена склероза. сп. "Българска Неврология", юли 2014, 172-175
2. Садързанска-Терзиева, Б., Цветанов, П., Hegde, V., Хараланов, Л., Стаменов, Б., Атанасова, М. Абнормно високи нива на MMP-9 в серума на пациенти с клинично изолиран синдром корелират с повишен риск от конверсия в MS. сп. "Българска Неврология", декември 2014, 242-245
3. **Sadarzanska-Terzieva, B., Tsvetanov, P., Hegde, V., Haralanov, L., Stamenov, B., Atanasova, M. Abnormally High Levels of Anti-collagen Type IV IgG Antibodies in the Serum of Patients with a Clinically Isolated Syndrome Correlated with an Increased Risk of Conversion to MS. *Clin. Neurol. Neurosurg*, 133, 2015, 30-33, IF=1,636**

Научни съобщения

1. **Садързанска-Терзиева, Б.,** Цветанов, П., Цанева, В., Атанасова, М. Проспективно имунологично проучване на диагностичната и прогностична стойност на промените в метаболизма на еластин деградационните и колаген тип IV пептиди при клинично изолиран синдром и множествена склероза. P52, Втора постерна сесия. XII Национален конгрес по неврология, Боровец, 19-21 май, 2011
2. **Садързанска-Терзиева, Б.,** Цветанов, П., Стаменов, Б. Клинични, невроизобразителни и електрофизиологични прогностични маркери за конверсия на CIS в MS. P217, Втора постерна сесия. Национална конференция по неврология, Златни пясъци, 12-15 юни, 2014
3. **Садързанска-Терзиева, Б.,** Цветанов, П., Стаменов, Б. Корелации на неврофизиологични, невроизобразителни и психометрични показатели при пациенти със CIS. P216, Втора постерна сесия Национална конференция по неврология, Златни пясъци, 12-15 юни, 2014
4. Лисичков, И., Цветанов, П., Стаменов, Б., **Садързанска, Б.,** Илиева, Б., Цанева, В. Тежестта на Паркинсоновата болест корелира с латенцията и времето на реакция на P300. P202. Втора постерна сесия Национална конференция по неврология, Златни пясъци, 12-15 юни, 2014
5. Цветанов, П., Атанасова, М., Русева, А., **Садързанска-Терзиева, Б.,** Цанева, В., Клисурски, М. Биомаркери за съдова атеросклеротична увреда: промени в метаболизма на екстрацелуларните матриксни белтъци, металопроотеинази и антитела срещу матриксни белтъци при Ишемичен мзъчен инсулт. P21, Първа постерна сесия. XII Национален конгрес по неврология, Боровец, 19-21 май, 2011

Summary

COMPLEX PROGNOSTIC STUDY ON CLINICAL, ELECTROPHYSIOLOGICAL, COGNITIVE AND IMMUNOLOGICAL MARKERS FOR ASSESSMENT OF RISK OF CONVERSION OF CLINICALLY ISOLATED SYNDROME TO MULTIPLE SCLEROSIS

Clinically Isolated Syndrome (CIS) is a term describing the first demyelinating event in patients with symptoms suggestive of multiple sclerosis.

Predicting the risk of conversion of CIS to definitive MS has a great significance in patient management. The most important prognostic risk factors for MS are multifocal distribution of symptoms, a number of MRI lesions as well as the presence of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid. The advance in neuroimaging technics plays a supportive role to choose the proper treatment strategies in these cases. However, the individual therapeutic approach in each patient is crucial but still debatable. Autoimmune inflammation has a major role in pathogenesis of MS, therefore search of immunological markers for the presence and activity of the disease still continues.

In the present study the serum levels of anti-collagen-type-IV antibodies in patients with CIS were assessed in order to determine their predictive value for conversion to MS. Also, the ACIVAbs levels were compared with some well-established immunological markers of inflammation such as proinflammatory serum metalloproteinase type 9 and anti-inflammatory tissue inhibitor of metalloproteinases type 1.

In conclusion, patients with CIS converting to MS have abnormally raised serum levels of IgG ACIAbs. These antibodies deserve further investigation as a possible biomarker for disease progression in CIS. However, only complex evaluation of clinical, electrophysiological, and immunological examination is the optimal clinical approach to identify CIS patients with high risk of conversion to MS.