

# Imunofenotipizacija u bolesnika s multiplom sklerozom liječenih okrelizumabom u KBC-u Split

---

**Radmilo, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:924777>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-30**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Radmilo**

**IMUNOFENOTIPIZACIJA U BOLESNIKA S MULTIPLOM SKLEROZOM**  
**LIJEČENIH OKRELIZUMABOM U KBC-U SPLIT**

**Diplomski rad**

**Akademska godina:**

**2021./2022.**

**Mentor:**

**Doc. dr. sc. Sanda Pavelin, dr. med.**

**Split, srpanj 2022.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Marija Radmilo**

**IMUNOFENOTIPIZACIJA U BOLESNIKA S MULTIPLOM SKLEROZOM**  
**LIJEČENIH OKRELIZUMABOM U KBC-U SPLIT**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2021./2022.**

**Mentor:**

**Doc. dr. sc. Sanda Pavelin, dr. med.**

**Split, srpanj 2022.**

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Definicija i etiologija.....	2
1.2. Epidemiologija.....	4
1.3. Patogeneza .....	6
1.4. Klinička slika .....	8
1.4.1. Klinički oblici.....	8
1.4.2. Simptomatologija.....	9
1.5. Proširena skala stanja invaliditeta .....	10
1.6. Dijagnoza.....	11
1.7. Liječenje .....	14
1.7.1. Akutno liječenje.....	14
1.7.2. Kronično liječenje.....	14
1.7.3. Simptomatsko liječenje .....	15
1.8. Okrelizumab.....	15
2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE .....	20
2.1. Primarni cilj istraživanja.....	21
2.2. Sekundarni ciljevi istraživanja .....	21
2.3. Hipoteze.....	21
3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	22
3.1. Organizacija istraživanja .....	23
3.2. Ispitanici .....	23
3.3. Opis istraživanja.....	23
3.4. Statistički postupci .....	24
3.5. Etičnost istraživanja .....	24
4. REZULTATI.....	25
5. RASPRAVA .....	33
6. ZAKLJUČCI.....	38
7. LITERATURA.....	40
8. SAŽETAK .....	49
9. SUMMARY .....	51
10. ŽIVOTOPIS .....	53

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Sandi Pavelin na dobroj i kvalitetnoj suradnji prilikom izrade diplomskog rada.*

*Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Meri Matijaci na stručnim savjetima i velikoj podršci bez koje izrada rada ne bi bila moguća.*

*Hvala tajnici Miji na stalnoj dostupnosti prilikom dobavljanja potrebne dokumentacije te doc. dr. sc. Pavlinac Dodig na pomoći pri statističkoj obradi podataka.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su, neizmjernom podrškom, bili oslonac svih mojih uspona i padova.*

*Najviše hvala mom „student-mentoru“ Marku Grahovcu, dr. med. na brojnim savjetima koji su učinili ovo putovanje lakšim. Hvala ti što si sve moje suze pretvorio u osmijeh.*

*I za kraj, posebno hvala mom didu Petru kojem posvećujem svoj rad.*

## **1. UVOD**

## 1.1 Definicija i etiologija

Multipla skleroza (MS) kronična je demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS) degenerativne, upalne i autoimune etiologije (1). Jedna je od najčešćih netraumatskih, onesposobljavajućih bolesti mlađih odraslih (2). Obično se dijagnosticira između 20. i 50. godine, ovisno o dostupnosti dijagnostičkih testova u pojedinim zemljama. Na svjetskoj razini, bolest se najčešće dijagnosticira u 32. godini života (3).

U etiologiji MS isprepleću se interakcije na razini gena i nekih okolišnih čimbenika. Ženski spol, mlađa odrasla dob, niske razine vitamina D, pušenje, pretilost u dječjoj dobi te infekcija Epstein-Barr virusom (EBV) glavni su rizični čimbenici za razvoj bolesti (4). Osim EBV-a, i drugi infektivni uzroci mogu biti okidač za pojavu bolesti, a to su: Humani herpes virusa tip 6, virus varicella zoster, virus Johna Cunninghama, citomegalovirus i humani endogeni retrovirusi (5). Povijesno se MS nije smatrala nasljednom bolesti, ali, prema meta-analitičkom istraživanju iz 2018. godine, u nekih je ljudi MS povezana s nasljeđem jer svaka osma oboljela osoba ima pozitivnu obiteljsku anamnezu (6). Ženski spol jedan je od važnih rizičnih čimbenika za razvoj MS-e. Smatra se da je razlog tome prosječno niža razina testosterona u žena, a koji u muškaraca djeluje protektivno na razvoj autoimunih bolesti općenito (7). U žena, osim spolnih hormona, važnu ulogu imaju i spolni kromosomi neovisni o hormonima, zbog čega žene češće razviju bolest, dok muškarci, ako razviju bolest, u pravilu razviju i težu kliničku sliku (8). U korelaciju se dovodio i odnos žena i pušenja jer je povijesno postojala puno manja razlika oboljelih među spolovima. Smatra se da je taj nesrazmjer između oboljelih žena i muškaraca uzrokovan iznimnim povećanjem broja žena među pušačima (4), iako ni konzumiranje duhanskih proizvoda, ne objašnjava sadašnju toliko veliku spolnu razliku što nas upućuje na činjenicu da i drugi okolišni čimbenici imaju značajnu ulogu (9).

Brojne studije proučavaju vitamin D i njegov utjecaj na imunološki sustav. Smatra se da su poremećaji u metabolizmu ovog vitamina dio patofiziološkog puta brojnih bolesti pa tako i MS-e, ali istraživanja na humanim modelima još su u tijeku (10). Epidemiološke su studije potvrdile da je prevalencija oboljelih od MS-e veća na višim, a niža na nižim geografskim širinama koje su mnogo više izložene suncu, a samim time i vitaminu D (11,12). Iako i danas postoje velike razlike oboljelih s obzirom na geografsku širinu, one su manje nego kroz povijest zbog izbjegavanja sunca posebice u toplijim krajevima (13,14). 2004. godine napravljena je velika studija u kojoj je sudjelovalo 187 000 žena kojima se analizirala povezanost između rizika pojavnosti MS-e i unosa vitamina D. Žene koje su uzimale više doze vitamina D imale su nižu učestalost pojavnosti MS-e od onih koje su uzimale nižu dozu (15,16). Prema nedavnim

studijama dokazano je da je vitamin D3 siguran u dozi od 10 400 internacionalnih jedinica (IU od engl. *international unit*) (17), a potencijalno čak može utjecati na remijelinizaciju posebnim patogenetskim putevima koji su za sada dokazani samo na animalnim modelima (10).

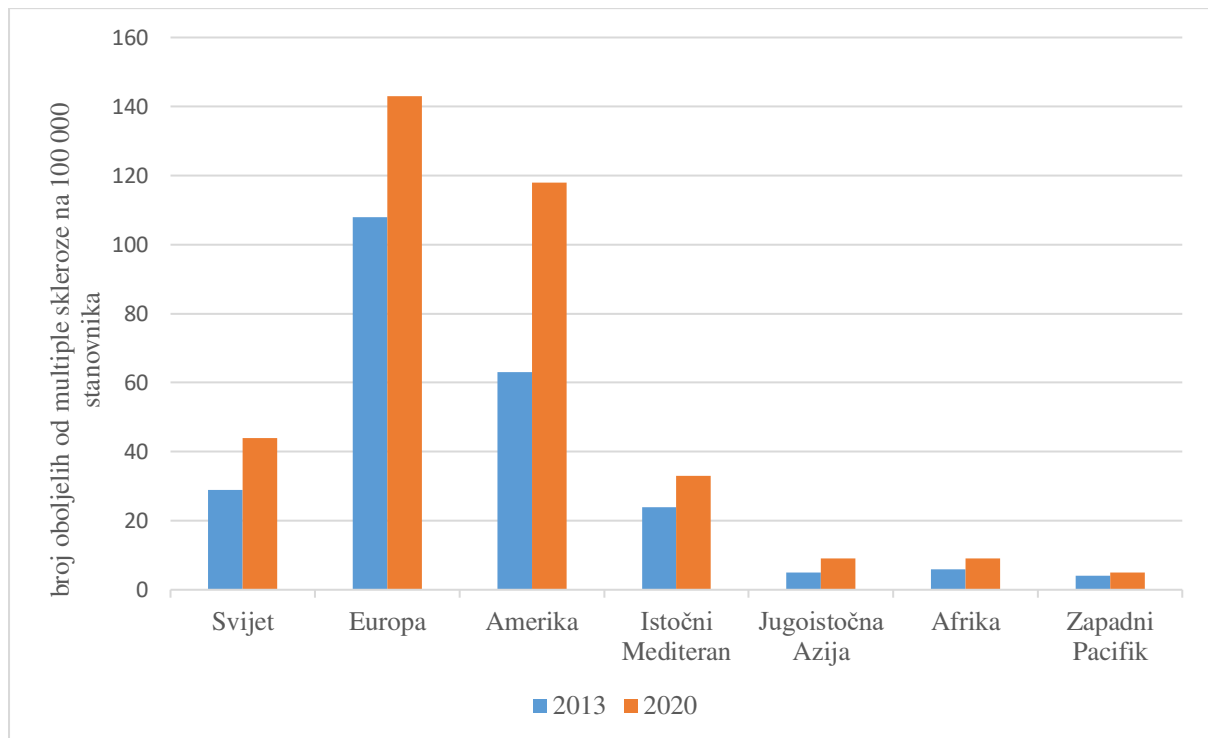
Osobe koje su preboljele infektivnu mononukleozu u adolescenciji imaju dva puta veću šansu za razvoj MS-e u odnosu na one koji nikada nisu došli u doticaj s virusom. Potonji nemaju protutijela na EBV u serumu što se pokazalo kao protektivni čimbenik. Pozitivna protutijela bez prisutne simptomatske infekcije također povećavaju rizik od oboljenja (13,18,19). Postojale su dvije teorije patogenetske povezanosti MS-e i EBV-a: teorija križne reaktivnosti antigena SŽS-a i EBV-a te teorija o atipično promjenjenim B limfocitnim stanicama (4). Prema najnovijim saznanjima iz 2022. godine, dokazana je križna reaktivnost tj. molekularna mimikrija između EBNA1 (engl. *Epstein-Barr nuclear antigen 1*) i GlialCAM (engl. *glial cell adhesion molecule*) proteina koji se nalazi na glijalnim stanicama SŽS-a. Animalni modeli pokazuju da imunizacija pogoršava, a uklanjanje ovih protutijela poboljšava ishod u pacijenata sa MS-om (20).

Napretkom genetskih istraživanja otkriveno je čak preko 50 alela zaslužnih za potencijalnu pojavu MS-e. Posebno su rizični humani leukocitni antigeni (HLA) koji se nalaze na 6. kromosomu (21). Alel HLA-DRB1\*1501 bio je predmet velikog broja istraživanja za mnogobrojne bolesti. U gotovo svim studijama koje su analizirale ovaj alel, istraživači su otkrili da je njegova učestalost znatno veća u slučajevima pacijenata s MS-om nego u zdravih ispitanika što ga čini glavnim genetskim čimbenikom rizika za populacije sjevernoeuropskog podrijetla (22). Alel HLA-DQA1\*0102 također je pojačano zastupljen u oboljelih nego u kontrolnoj skupini, ali nije svugdje razlika u oboljelih od MS-e bila povezana s ovim alelom. U Kini i Sardiniji prevalencija ovog alela bila je čak nešto viša u kontrolnim skupinama nego u oboljelih. Utvrđeno je i da je alel HLA-DQB1\*0602 češći u slučajevima nego u kontrolama u europskoj populaciji (bijelci općenito) s izuzetkom Sardinije (7). Rizični aleli pripadaju HLA klasi 2, a zaštitni HLA klasi 1 među kojima su: HLA-A\*02:01, HLA-B\*44:02 i HLA-B\*38:01 (23).



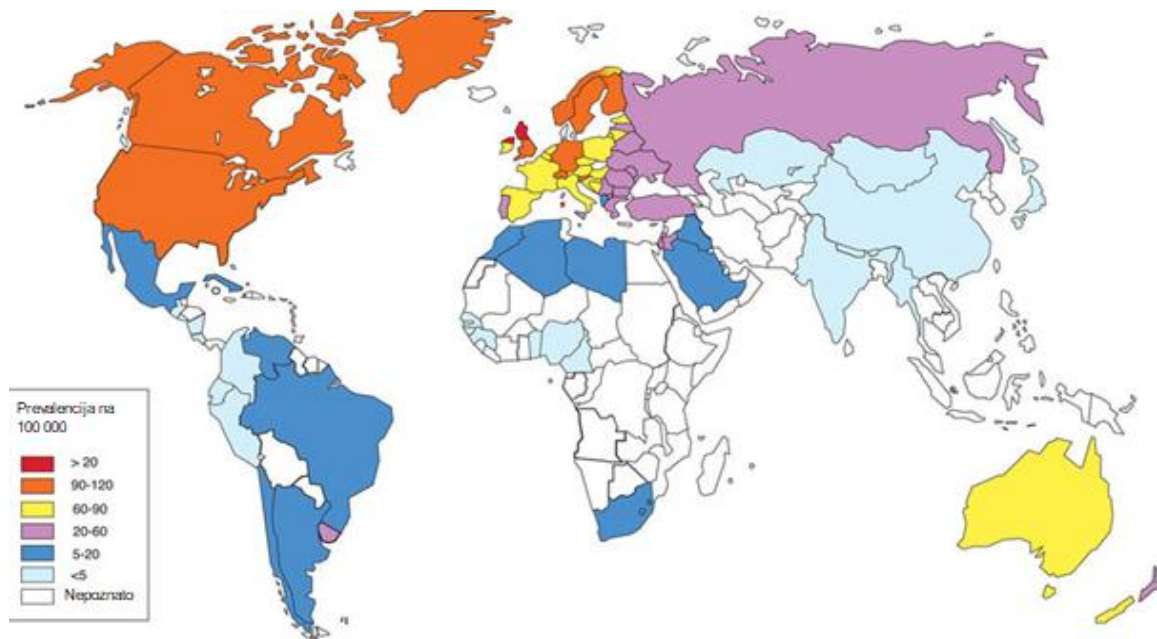
## 1.2. Epidemiologija

Prema podacima iz 2020. godine, u svijetu od MS-e boluje oko 2,8 milijuna ljudi. To je značajni porast u odnosu na podatke iz 2013. godine kada je MS-u imalo oko 2,3 milijuna ljudi (Slika 1). Smatra se da skok u incidenciji i prevalenciji nastaje zbog najmanje 30 000 novooboljele djece u 2020. godini i zbog napredovanja dijagnostičkih pretraga koje omogućuju raniju detekciju bolesti i pravovremeno djelovanje (3).



**Slika 1.** Grafički prikaz prevalencije oboljelih od multiple skleroze na 100 000 stanovnika. Uključena je 81 zemlja koja je sudjelovala u epidemiološkom istraživanju u 2013. i 2020. godini. Limitirajući čimbenik je isključenje svih onih zemalja na kojima je provedeno istraživanje u 2020., a nije u 2013. godini (3)

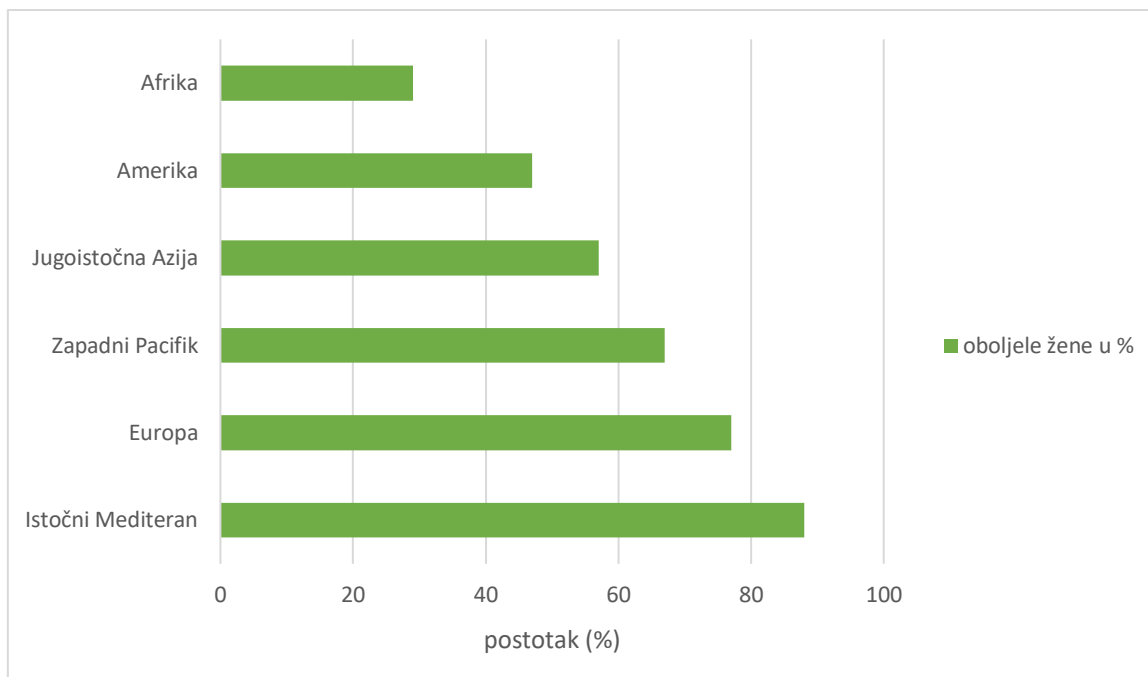
Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, prevalencija za 2020. godinu (Slika 2) razlikuje se u pojedinim regijama. Prevalencija u Europi najviša je i iznosi 133 oboljela na 100 000 stanovnika, dok je na Zapadnom Pacifiku i Africi najniža i iznosi 5 oboljelih na 100 000 stanovnika. San Marino (337 na 100 000) i Njemačka (303 na 100 000) imaju najveću prevalenciju u svijetu, a slijedi ih SAD (288 na 100 000). Ovi podatci imaju ograničeni značaj zbog toga što u osiromašenim zemljama ne postoje dovoljno razvijene dijagnostičke metode pa se smatra da je stvarna brojka još i viša. Globalna prevalencija iznosi 36 oboljelih na 100 000 stanovnika (3).



**Slika 2.** Prikaz broja oboljelih od multiple skleroze na 100 000 stanovnika u 2020. godini. Preuzeto sa: [https://www.researchgate.net/figure/Geographical-distribution-of-multiple-sclerosis\\_fig2\\_40773902](https://www.researchgate.net/figure/Geographical-distribution-of-multiple-sclerosis_fig2_40773902)

Ljudi koji žive u zemljama bliže ekvatoru imaju manji rizik od razvoja MS-e, dok su oni koji žive u zemljama bliže sjevernom i južnom polu pod većim rizikom. Smatra se da su ljudi, koji žive u višim geografskim širinama, izloženiji nižim razinama sunčeve svjetlosti, a time i nižim razinama vitamina D koji je jedan od glavnih rizičnih čimbenika za razvoj bolesti (3).

Žene u pravilu dvostruko češće oboljevaju od MS-e u odnosu na muškarce iako spolna razlika uvelike ovisi o pojedinoj regiji svijeta (Slika 3). Najvišu razliku oboljelih žena i muškaraca bilježe Egipat, Iran, Palestina i Sudan gdje omjer oboljelih žena i muškaraca iznosi 3:1, a prema novijim podacima čak i 4:1 (3).



**Slika 3.** Grafički prikaz oboljelih žena u postotcima u pojedinim regijama svijeta (3)

### 1.3. Patogeneza

Klasičan patološki znak u patogenezi MS-e su upalne lezije koje vremenom postaju demijelinizirajući plakovi (24). Posljedično upali, osim što nastaju oštećenja mijelina, oštećuju se i oligodendrociti. U početnoj fazi aksoni su očuvani, ali napredovanjem bolesti dolazi do ireverzibilnog oštećenja aksona (25). U relapsno-remitirajućem obliku MS-e prisutne su aktivne lezije sa središnjom limfocitnom infiltracijom, dok su u primarno-progresivnom obliku MS-e češće prisutne neaktivne lezije s aktivnim rubovima koji sadržavaju mikrogliju i makrofage (26).

U patogenezi MS-e inicijalnu i ključnu ulogu imaju promijenjeni CD4+ T-limfociti iako su patološki promijenjene i ostale stanice urođene i stečene imunosti (27,28). CD4+ T-limfociti na svojoj površini sadržavaju ljepljive molekule koje im omogućavaju da se vežu na krvno-moždanu barijeru (KMB), a nakon vezanja ti aktivirani limfociti luče enzim matriksne metaloproteinaze (MMP) koji omogućava prijelaz stanica kroz KMB-u u SŽS gdje nailaze na antigen MBP (engl. *myelin basic protein*) na mikrogliji. Na taj način dolazi do reaktivacije patoloških T-limfocita koji luče proupalne citokine čime se dodatno povećava propusnost KMB-e i potiče stvaranje upalnih lezija (29). Za sada nije poznato koji faktor patološki mijenja CD4+ T-limfocite i potiče ih na ovu kaskadnu reakciju (28).

U početku se smatralo da je podgrupa Th1 CD4+ T-limfocita, koji stvaraju interferon gama, ključna za imunopatogenezu MS-e, a danas se još veća važnost pridaje podgrupi Th17 stanica koje luče IL-17 (28,30). Prema najnovijim saznanjima, u SŽS-u se događa paradoksalna reakcija. Th1 stanice u kralježničkoj moždini djeluju proupalno, dok u mozgu djeluju protuupalno što je dokazano na animalnim modelima s eksperimentalnim autoimunim encefalomijelitisom (EAE). Demijelinizacijski plakovi stvarali su se u mozgu pri omjeru Th17 i Th1 stanica većim od 1, ali u kralježničkoj moždini i pri omjeru Th17 i Th1 stanica manjim od 1. Razlog ovakvog ponašanja Th1 i Th17 stanica još uvijek ostaje nepoznat (29).

Veliku važnost u patogenezi MS-e imaju i CD8+ T-limfociti koji su glavni patohistološki nalaz demijelinizacijskih promjena (28). Dije se na efektorne i regulatorne T-stanice. Efektorne su stanice zaslužne za upalnu reakciju u SŽS-u jer luče citokine i kemokine koji ju potiču. S druge strane, regulatorne stanice djeluju protuupalno direktno oštećujući patološki promijenjene CD4+ T-limfocite pa zbog toga, osim što smanjuju upalu, potiču i remisiju (31). CD8+ T-limfociti su najzaslužnije stanice za stvaranje demijelinizacijskih lezija u mozgu putem Fas ligand (FasL) mehanizma jer su tu najvećim dijelom T-stanice ovisne o mijelinu, za razliku od kralježničke moždine gdje dominiraju T-stanice neovisne o mijelinu (32).

Danas se velika važnost u patogenezi MS-e pridaje i B-limfocitima koji, ako su klonalno prošireni i vođeni antigenom, luče kemokine preko NF- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) puta te citokine limfotoksin, tumor nekrotizirajući faktor, interleukin 6 i faktor stimulacije granulocita-makrofaga pa na taj način potiču upalu. S druge strane, memorijske B-stanice imaju ulogu antigen prezentirajućih stanica čime potiču i aktivaciju i proliferaciju patološki promijenjenih T i mijeloidnih stanica. B-limfociti također i direktno oštećuju mijelin proizvodnjom protutijela koja ga uništavaju, ali i stvaranjem i održavanjem struktura sličnim folikulima u intermeningealnim prostorima što primarno utječe na pojavu subpialnih lezija i progresiju bolesti (33,34).

Prirodne stanice ubojice (NK od engl. *Natural killer*) su stanice urođene imunosti koje imaju dvije ključne uloge: izravna citotoksičnost i izlučivanje citokina. Kod ljudi se fenotipski razlikuju ekspresijom antigena CD16 i CD56. U perifernoj krvi 90% NK stanica čine zrele CD56<sup>dim</sup>CD16+ NK stanice, a samo 10 % nezrele CD56<sup>bright</sup>CD16- NK stanice. U patogenezi MS-e ove stanice imaju kontroverznu ulogu (35) jer istraživanja na animalnim modelima daju oprečne rezultate (36). Naime, u istraživanjima na animalnim modelima s EAE-om, NK stanice uzrokovale su pogoršanje (37,38), a na istim modelima u drugim istraživanjima poboljšanje bolesti (39,40). Točna uloga NK stanica u MS-i za sada ostaje nedovoljno istražena na humanim

modelima, iako se smatra da NK stanice imaju važnost u imunopatogenezi nastanka MS-e još uvijek nepoznatim mehanizmom (41). Dokazano je da upalne lezije, ovisno o tipu bolesti, imaju različito prisutnu limfocitnu infiltraciju. Plakovi u primarno-progresivnom obliku imaju veći broj B-limfocita za razliku od plakova u relapsno-remitirajućem obliku MS-e koji imaju više T-limfocita (4,42). Zbog navedenog je važno dobro razumijeti patogenezu MS-e kako bi se dala primjerena terapija s obzirom na tip bolesti i stanice na koje lijek djeluje (30).

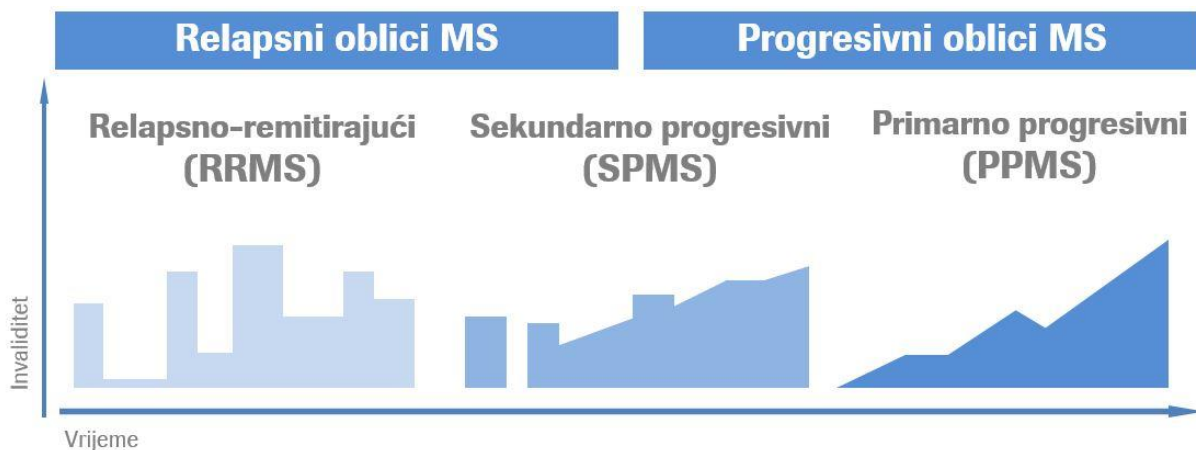
## **1.4. Klinička slika**

### **1.4.1. Klinički oblici**

Relapsno-remitirajuća multipla skleroza (RRMS) dijagnosticira se u 80-85% pacijenata oboljelih od MS-e. To je ujedno i najčešći oblik koji obilježavaju relapsi i remisije tj. pojava simptoma i znakova bolesti nakon kojih slijedi potpuno ili djelomično poboljšanje (43). Glavna obilježja relapsa čine novi ili reaktivacija starih simptoma i znakova pri čemu je nužno prethodno isključiti infekciju (44). Obično traju od 4 do 6 tjedana iako to značajno varira: može trajati svega nekoliko dana pa sve do više mjeseci (45). Vremenom relapsi postaju češći, a posljedično se tegobe mogu gomilati zbog djelomičnih remisija (43).

10% oboljelih ima primarno-progresivnu multiplu sklerozu (PPMS). Približno jednako pogađa oba spola i javlja se nešto kasnije u usporedbi sa RRMS-om koji puno češće zahvaća žene. Tegobe i neurološka oštećenja gomilaju se progresivno, a najčešće je zahvaćen hod bez prethodnog relapsa. U podmaklim fazama ponekad mogu nastati relapsi bolesti i aktivne lezije na magnetskim snimkama što je klinički bitno jer aktivna forma PPMS-e bolje djeluje na terapiju (43,45).

Sekundarno-progresivna multipla skleroza (SPMS) iznimno je rijetko prva dijagnoza demijelinizacijske bolesti u oboljelog i to samo u slučaju neadekvatno dijagnosticiranih relapsa u prošlosti (45). Razvija se iz RRMS-e, obično nakon 15 do 20 godina. Bolesnicima se inteziviraju relapsi, a remisije su sve češće nepotpune. Simptomi i znakovi se progresivno pogoršavaju, a vremenom nerijetko relapsi počinju izostajati (43,45). Glavna razlika SPMS-e i PPMS-e je početak razvoja progresije simptoma i znakova koji se u sekundarno-progresivnom obliku nikada ne događa na početku bolesti (45). Detaljniji prikaz razlike kliničkih oblika MS-e prikazan je na Slici 4.



**Slika 4.** Grafički prikaz razlike relapsno-remitirajuće, sekundarno-progresivne i primarno-progresivne multiple skleroze s obzirom na pojavnost kliničkih simptoma i invaliditeta kroz vrijeme. Preuzeto sa: [https://www.roche.ba/bs\\_BA/terapijska-podruja1/neurologija/multipla-skleroza/-ta-je-multipla-skleroza--ms--.html](https://www.roche.ba/bs_BA/terapijska-podruja1/neurologija/multipla-skleroza/-ta-je-multipla-skleroza--ms--.html)

#### 1.4.2. Simptomatologija

U 85% oboljelih klinička slika započinje kliničkim izoliranim sindromom (CIS). CIS je prvi relaps bolesti bez znakova encefalopatije. Češće se prezentira monofokalno nego polifokalno. Tipične prezentacije CIS-a su:

1. optički neuritis;
2. inkompletni transverzalni mijelitis;
3. simptomi i znakovi neurološkoga oštećenja moždanoga debla i maloga mozga (28).

Podvrsta optičkog neuritisa u MS-i je tipični ili retrobulbarni neuritis. Nerijetko je prvi simptom bolesti, a oboljeli imaju dobru prognozu (46). Nastaje zbog demijelinizacije optičkoga živca obično jednostrano. Karakterizira ga djelomični ili potpuni gubitak vida, diskromatopsija i periorbitalna bol pri pomicanju očne jabučice (28,47). Papila je najčešće normalnoga izgleda bez znakova edema (47).

Transverzalni mijelitis upala je bijele i sive tvari kralježničke moždine. U oboljelih od MS-e često se javlja parcijalni ili inkompletni transverzalni mijelitis koji ne obuhvaća cijeli transverzalni presjek već samo njegov dio. Glavni simptomi su bol, motorička slabost udova, inkontinencija mokraćnog mjehura, poremećaj rada crijeva, erektilna disfunkcija i osjetne senzacije poput disestezija i parestezija (28,48).

Postoje brojni simptomi i znakovi oštećenja na razini moždanoga debla i maloga mozga. Demijelinizacijske promjene na ovim razinama najčešće uzrokuju ataksiju, nestabilnost hoda, poremećaj ravnoteže, dvoslike i vrtoglavicu (28).

Osim navedenih kliničkih simptoma, u MS-i se javljaju i paroksizmalni simptomi. Pojavljuju se zbog efačičkih transmisija živčanih impulsa. U ove simptome i znakove ubrajaju se: miokimije, trigeminalne neuralgije, hemifacijalni spazmi i pozitivan Lhermittov znak (49,50).

## **1.5. Proširena skala stanja invaliditeta**

Proširena skala stanja invaliditeta (engl. *Expanded Disability Status Scale-EDSS*) je ljestvica koja se koristi u oboljelih od MS-e koja, osim što kvantificira invaliditet, prati i promjenu stupnja inavliditeta tijekom vremena. Standardizirana je prema Johnu Kurtzkeu 1983. godine koji ju je proširio s obzirom na prethodnu DSS (engl. *Disability Status Scale*) ljestvicu (51). Neurolog ocjenjuje EDSS stupanj invaliditeta obavljajući neurološki pregled za 8 funkcionalnih sustava (FS) nakon čega procjenjuje mogućnost pokretljivosti oboljelog. U FS-e ubrajaju se: piramidalni, cerebelarni, FS-i moždanoga debla, senzorni, FS-i crijeva i mokraćnog mjehura, vizualni, cerebralni i svi ostali koji imaju poremećen neurološki nalaz (52). Raspon EDSS ljestvice kreće se od 0 do 10 pri čemu 0 označava uredan neurološki status, dok 10 označava smrt zbog MS-e. Minimalni stupanj porasta na EDSS ljestvici iznosi 0,5 pod uvjetom da je inicijalni EDSS barem 1 (52,53). Vrijednosti EDSS ljestvice do 6 ocjenjuju se neurološkim pregledom; vrijednost od 1,0 do 4,5 mjeri oštećenja prilikom neurološkog pregleda s potpunom mogućnošću hoda, a vrijednosti od 5,0 do 9,5 označavaju stupanj otežanoga hoda (Slika 5) (51,54).

# Proširena skala stanja invaliditeta (EDSS)



**Slika 5.** Prikaz stupnja oštećenja samostalnog hoda u pacijenata s multiplom sklerozom s obzirom na vrijednosti standardizirane Kurtckeove proširene skale stanja invaliditeta. Preuzeto sa: [https://www.roche.ba/bs\\_BA/terapijska-podruja1/neurologija/multipla-skleroza/-ta-je-multipla-skleroza--ms--.html](https://www.roche.ba/bs_BA/terapijska-podruja1/neurologija/multipla-skleroza/-ta-je-multipla-skleroza--ms--.html)

## 1.6. Dijagnoza

Danas se za dijagnozu MS-e koriste revidirani McDonaldovi kriteriji iz 2017. godine (55-60). Temelje se na kliničko-radiološkim znakovima diseminacije bolesti u prostoru i vremenu u SŽS-u (61,62). Za razliku od McDonaldovih kriterija iz 2010. godine, prema novim kriterijima, moguće je dijagnozu MS-e postaviti na temelju CIS-a (58). U tom se slučaju MS definitivno dijagnosticira ako su, uz prisustvo CIS-a, prisutni i znakovi diseminacije u vremenu i prostoru na magnetskim snimkama. MS se može dijagnosticirati i ako, uz pojavu CIS-a, pacijent ima pozitivne oligoklonske trake u likvoru te znakove diseminacije u prostoru ili klinički ili putem magnetske rezonance (MR) (28,55). Detaljan prikaz revidiranih McDonaldovih kriterija iz 2017. godine prikazan je u Tablici 1.



**Tablica 1.** Revidirani McDonaldovi kriteriji iz 2017. godine za dijagnozu multiple skleroze

Broj relapsa	Broj lezija na MR <sup>a</sup> -u	Dodatni podatci nužni za potvrdu dijagnoze
≥2	≥2	Nije potrebno
≥2	1	DIS <sup>b</sup>
1	≥2	DIT <sup>c</sup> ili Pozitivne oligoklonske trake
1	1	DIS <sup>b</sup> i DIT <sup>c</sup> ili DIS <sup>b</sup> i pozitivne oligoklonske trake

<sup>a</sup> magnetska rezonanca

<sup>b</sup> diseminacija u prostoru od engl. *disseminated in space*: novonastali relaps na drugačijoj anatomskoj lokalizaciji od prethodnih relapsa ili minimalno jedna lezija na MR-u u barem dva od četiri karakterističnih područja: jukstakortikalni, infratentorijalni, periventrikularni i spinalni

<sup>c</sup> diseminacija u vremenu od engl. *disseminated in time*: novonastali relaps ili nastanak novih lezija na naknadnim magnetkim snimkama ili jedna magnetska snimka s barem jednom lezijom koja se boji i barem jednom lezijom koja se ne boji kontrastom

Modificirano prema: Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, i sur. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17:162–73.

Diseminacija bolesti u prostoru predstavlja oštećenje u barem dva centralna sustava, a može biti vidljivo ili MR-om ili kliničko oštećenje (28). Potonje znači da bolesnik ima istovremeno barem dva simptoma koja potječu iz različitih dijelova SŽS-a, dok se magnetsko oštećenje vidi kao minimalno dvije demijelinizacijske promjene na MR-i također na različitim mjestima SŽS-a (63).

Diseminacija bolesti u vremenu kriterij je koji je zadovoljen ako bolesnik ima barem dva oštećenja u SŽS-u nastala u različitim vremenskim intervalima. Uočava se pojavom novog kliničkog simptoma tj. relapsa bolesti ili na magnetskoj snimci pojavom novih lezija s obzirom na prethodnu snimku. Kriterij diseminacije u vremenu može biti ispunjen i ako je napravljena

samo jedna magnetska snimka, a da se prilikom davanja kontrasta uočila barem jedna aktivna i barem jedna neaktivna lezija. MR temeljni je uređaj za dijagnozu MS-e jer se, od svih radioloških aparata, na MR-i najbolje raspoznaju demijelinizacijske promjene. Tipična magnetna snimka u oboljelog prikazuje multifokalne hiperintenzivne lezije bijele tvari u jukstakortikalnom, periventrikularnom, spinalnom ili infratentorijalnom dijelu SŽS-a u T2 i FLAIR (engl. *Fluid-attenuated inversion recovery*) sekvencama. T1 sekvenca prikazuje hipointenzivne lezije (crne rupe) koje su znak kroničnog ireverzibilnog oštećenja. U sklopu dijagnoze MS-e, prilikom sumnje na demijelinizacijska oštećenja, koristi se kontrast gadolinij kako bi se razlikovale stare, neaktivne lezije koje se ne boje kontrastom od novih, aktivnih lezija koje se boje kontrastom (28).

Oligoklonske su trake imunoglobulini koji se nalaze u SŽS-u u cerebrospinalnom likvoru u oboljelih od MS-e. U zdravih se ljudi tamo ne nalaze, a njihovo prisustvo označava upalu. Izoliraju se iz cerebrospinalnog likvora (engl. *cerebrospinal fluid-CSF*) lumbalnom punkcijom, a znatno rjeđe punkcijom cisterne, ventrikula ili drenažom (64). Od 2017. godine, zbog revidiranja kriterija, ponovno postaju vrlo važne za dijagnozu, međutim, ako su ostali klinički i paraklinički testovi uredni, a samo su oligoklonske trake pozitivne, dijagnoza MS-e ne može se postaviti jer same nisu dovoljno specifične (28).

Za dijagnozu PPMS-e također se koriste revidirani McDonaldovi kriteriji iz 2017. godine. Obavezno je prisustvo progresije simptoma bez prisutnih relapsa tijekom jedne godine. Uz ovaj obavezni kriteriji, za dijagnozu su potrebna još barem dva od sljedeća tri kriterija:

1. diseminacija bolesti u prostoru;
2. dvije ili više demijelinizacijske lezije u T2 sekvenci u kralježničkoj moždini;
3. pozitivne oligoklonske trake (28,65).

Za dijagnozu MS-e ne postoji određeni patognomonični znak ili simptom pa se prilikom svake revizije kriterija ostavlja prostor za postavljanje dijagnoze bolesti kada nije prisutno nikakvo bolje objašnjenje za razvoj simptoma. Prije same dijagnoze MS-e, kod ovog dijagnostičkog kriterija, potrebno je isključiti ostale diferencijalne dijagnoze i varijante MS-e (50).

## 1.7. Liječenje

Za sada još nisu pronađeni lijekovi koji dovode do potpunog izlječenja od MS-e (50). Trenutna strategija liječenja oboljelih od MS-e zasniva se na liječenju akutnih napadaja, sprječavanju novih napadaja i simptomatskom liječenju (66).

### 1.7.1. Akutno liječenje

Akutno liječenje temelji se na liječenju relapsa kod RRMS-e. Cilj ovog liječenja je ubrzati oporavak neurološkog deficita nastao zbog trenutne upalne demijelinizacije, ublažiti ozbiljnost relapsa i eliminirati potencijalno perzistentna neurološka oštećenja (66).

Standardno se za liječenje relapsa daju pulsne doze kortikosteroida tj. visoke doze metilprednizolona od 0,5 do 1 g/dan intravenski obično 3 do 5 dana s kumulativnom dozom od 2,5 g (28,50,67). Niske doze smatraju se sigurnima i učinkovitim, ali se visoke doze u kratkom intervalu preferiraju za liječenje egzacerbacija.

U trudnica se za liječenje akutnog napadaja MS-e daju intravenski imunoglobulini jer su sigurniji od kortikosteroida za majku i dijete. Općenito je pojava relapsa u trudnoći i dojenju jako rijetka i smatra se da trudnoća djeluje protektivno na egzacerbacije MS-e (67).

Plazmafereza je rezervirana za one bolesnike koji ne reagiraju na kortikosteroidnu terapiju, a razvijaju vrlo teške relapse (28,67). Nijedan od navedenih lijekova nema utjecaja na odgađanje i sprječavanje idućeg relapsa jer ne modificiraju tijek bolesti pa njihova dugoročna primjena u slučaju izostanka relapsa nije opravdana (28).

### 1.7.2. Kronično liječenje

S obzirom da je MS vrlo čest uzrok invaliditeta posebice u mlađoj odrasloj populaciji, sve se veća važnost usmjerava na dovoljno ranu dijagnozu kako bi se novim lijekovima koji utječu na tijek bolesti (engl. *Disease Modifying Therapy*-DMT) moglo pravodobno djelovati sprječavajući dugotrajna onesposobljavajuća oštećenja (4). Ti lijekovi odgađaju ili čak ponekad onemogućavaju nastanak novih egzacerbacija klinički ili na MR-i. Novijim saznanjima u vezi imunopatogenetskog puta nastanka MS-e, broj učinkovitih i sigurnih lijekova za liječenje MS-e u stalnom je porastu, a trenutna su istraživanja usmjerena na pronalaženje onih lijekova koji bi mogli poticati organizam na remijelinizaciju i neuroprotekciju (68). DMT za MS-u se dijele

u dvije osnovne skupine: prvu i drugu liniju. Prvu liniju čine lijekovi srednje učinkovitosti, ali visokog sigurnosnog profila koji djeluju imunomodulacijski, a u njih se ubrajaju interferon beta, glatiramer-acetat, teriflunomid i dimetil-fumarat. Drugu skupinu čine lijekovi koji djeluju imunosupresivno te zbog toga imaju veći rizik od razvoja težih i češćih nuspojava, ali su zato iznimno visoke učinkovitosti, a toj skupini pripadaju: natalizumab, alemtuzumab, fingolimod, kladribin, daklizumab, siponimod i okrelizumab (4,28). Postoje dva načina liječenja s obzirom na uzimanje DMT-ova: indukcijsko i eskalacijsko uzimanje. Indukcijsko uzimanje lijeka je uzimanje druge linije lijekova koji imaju više nuspojava, ali će se na taj način već u ranoj fazi spriječiti nastanak invaliditeta. Pobornici eskalacijskog pristupa, s druge strane, smatraju da se treba u početku uzimati lijek iz prve linije koji je za pacijenta sigurniji, ali manje efikasan pa u slučaju pogoršanja treba prijeći na lijek iz druge linije. Pogoršanje bolesti prati se MR-om nastajanjem novih lezija i/ili novonastalim kliničkim simptomima (69).

### **1.7.3. Simptomatsko liječenje**

Simptomatsko liječenje odnosi se na nefarmaceutske i farmaceutske terapijske metode koje liječe simptome nastale zbog oštećenja SŽS-a. Simptomatsko liječenje najčešće nije specifično za MS-u; uključuje liječenje disfunkcije mokraćnog mjehura i neuropatske boli. Kognitivna oštećenja zahtijevaju individualiziran pristup liječenju i uklanjanje potencijalnih čimbenika koji ga potiču. Postoji i simptomatska terapija posebno indicirana za pacijente oboljele od MS-a: nabiximols i 4-aminopiridin. Nabiximols pomaže smanjivanju spasticiteta, a 4-aminopiridin poboljšava mogućnost hoda. Često oboljeli imaju poremećaje sna čija prevalencija raste proporcionalno trajanju MS-e. Takvi pacijenti često popratno imaju tjeskobu, depresiju i umor (4,70).

### **1.8. Okrelizumab**

Okrelizumab je rekombinantno humanizirano intravensko anti-CD20 monoklonsko protutijelo koje je odobreno kao lijek prvog izbora za sve pacijente s PPMS-om i za pacijente s RRMS-om uz uvjet od barem jednog relapsa u posljednje dvije godine ili sa prikazom barem jedne aktivne lezije na MR-i (71,72). Djeluje imunosupresijski vežući se na površinski antigen CD20 na CD20+ limfocitima B uzrokujući njihovu depleciju (73). Selektivnu depleciju CD20+ limfocita B potiče putem: apoptoze, stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima i

komplementu te stanične fagocitoze ovisne o protutijelima. S druge strane, deplecijski ne djeluje na već prisutnu humoralnu imunost i štedi kapacitet za rekonstituciju limfocita B (72). Osim CD20+ limfocita B, okrelizumab utječe i na depleciju CD19+ limfocita B posebice unutar dva tjedna od primanja lijeka (74), međutim, nema utjecaj na limfocite T (75,76). Medijan oporavka B-limfocita nakon deplecije je 18 mjeseci (73).

U oboljelih, prije uključivanja okrelizumaba, treba napraviti probir na hepatitis B virus (HBV). Kontraindiciran je u bolesnika s aktivnom formom HBV-a jer može dovesti do reaktivacije HBV-a, a posljedično tome i do razvoja fulminantnog hepatitisa, zatajivanja jetre i smrti zbog čega je nužan poseban oprez u onih bolesnika koji imaju pozitivan serološki nalaz i u onih koji su nositelji virusa (72,77).

Premedikacijom se smanjuje učestalost i težina reakcije na infuziju. Daje se antihistaminik i metilprednizolon u dozi od 100 mg intravenski pola sata prije infuzije okrelizumaba. Poželjna je i primjena antipiretika.

Početna doza okrelizumaba je 600 mg. Prima se u dvije podijeljene infuzije: jedna infuzija sadržava 300 mg lijeka u 250 mL fiziološke otopine s razmakom od dva tjedna. Primjena traje 150 minuta. Svaka iduća doza daje se s minimalnim odmakom od pet mjeseci (najčešće šest) u jednoj infuziji od 600 mg lijeka u 500 mL fiziološke otopine i traje približno 120 ili 210 minuta ovisno o brzini primjene. Lijek se razrjeđuje u fiziološkoj otopini do koncentracije 1,2 mg/mL. Bolesnike je potrebno nadzirati prilikom svake infuzije lijeka sve do barem jednog sata nakon završetka primjene. Moguće nuspojave nakon primjene okrelizumaba su:

1. reakcije na infuziju;
2. infekcije;
3. laboratorijske abnormalnosti.

Reakcije na infuziju često su povezane s otpuštanjem kemijskih posrednika tj. citokina. Najčešće se javljaju tijekom prve infuzije lijeka unutar 24 sata od intravenske primjene. Simptomi i znakovi uključuju: crvenilo, svrbež, dispneju, navale crvenila, umor, glavobolju, mučninu, povraćanje, tahikardija, urtikarija, nadražaj grla, omaglice, orofaringealnu bol, anafilaksiju i hipotenziju. Zbog rizika od hipotenzije, ne preporuča se uzimanje antihipertenzivnog lijeka u hipertoničara 12 sati prije primjene okrelizumaba. Zbrinjavaju se samo ozbiljniji simptomi i znakovi. Ako se jave teži plućni znakovi poput astmatskog napadaja, bronhospazma i anafilaksije, infuzija se prekida i liječe se novonastale nuspojave. Simptomi

reakcije na infuziju i preosjetljivosti na lijek često su preklapajući i klinički nerazpoznatljivi. U slučaju akutne alergijske reakcije preosjetljivosti tipa 1 u kojima sudjeluju imunoglobulini E (IgE), daljnje liječenje okrelizumabom je kontraindicirano. Za razliku od reakcija na infuziju, reakcije akutne IgE preosjetljivosti vrlo rijetko se javljaju prilikom prve infuzije lijeka. Infekcije se mogu javiti na bilo kojem dijelu tijela iako je najčešće sjelo infekcija respiratorni trakt. Ozbiljne infekcije se javljaju vrlo rijetko, ali je zabilježena povećana stopa ozbiljnih infekcija u pacijenata s RRMS-om između 2. i 3. godine primanja lijeka (72). Značajno je povećana stopa ozbiljnijih infekcija u onih bolesnika koji su, zajedno s okrelizumabom, uzimali i druge imunomodulacijske ili imunosupresijske lijekove, zbog čega je njihovo kombiniranje kontraindicirano (78).

Bolesnici liječeni okrelizumabom izloženi su minimalnom riziku za razvoj progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML). Terapija se obustavlja odmah pri prvim simptomima ili znakovima PML-e. Oni uključuju: progresivnu jednostranu slabost, nespretnost prilikom pokretanja udova, abnormalnosti vida, promjene u načinu razmišljanja, pamćenju i orijentaciji koja dovodi do konfuzije i promjene osobnosti.

Herpes infekcije češće se javljaju kao nuspojava nakon primanja okrelizumaba nego u kontrolnim skupinama koje su koristile placebo ili interferon beta. Herpes infekcije uključuju: herpes simplex, herpes zoster, oralni i genitalni herpes. Uglavnom su blage ili umjereno teške. Nema zabilježenih podataka o razvoju diseminiranog oblika herpes infekcije (79). Neutropenija je hematološki poremećaj koji obilježava apsolutni broj neutrofilnih granulocita manji od  $1,5 \times 10^9$  stanica/L. Teškom neutropenijom smatra se vrijednost neutrofila manja od  $0,5 \times 10^9$  stanica/L. Ovo je važan hematološki nalaz jer je visoki čimbenik rizika za razvoj bakterijskih infekcija (80).

Blaga i umjerena neutropenija može se javiti nakon infuzije okrelizumaba. Obično se javlja samo jednom, prolazna je i nije potrebno nikakvo dodatno liječenje. Teška neutropenija iznimno je rijetka i liječi se faktorom stimulacije kolonije granulocita (72).

Neutropenija s odgođenim početkom može se javiti nekoliko mjeseci nakon primjene lijeka. Češće se javlja od neutropenije odmah nakon primjene okrelizumaba. Prema najnovijim istraživanjima, smatra se da su promjenjeni čimbenici rasta zaslužni za razvoj granulocita pa posljedično dolazi do velikog smanjenja neutrofila. Ova nuspojava je nepredvidiva, a može se, rutinskom pretragom krvi, na vrijeme prepoznati i dijelom ublažiti. Pacijentima, koji su primili okrelizumab unatrag jedne godine, preporučeno je hitno javljanje liječniku u slučaju razvoja groznice ili infektivne bolesti (81).

Limfopenija predstavlja ukupni broj limfocita u krvi niži od 1000 stanica/ $\mu$ L u odraslih. Posljedice uključuju oportunističke infekcije i povećan rizik od razvoja autoimunih i malignih bolesti (82). Pad ukupnog broja limfocita s predominacijom pada CD8+ T-limfocita može se javiti u bolesnika liječenih okrelizumabom. Takvi bolesnici razvijaju ozbiljnije virusne infekcije, međutim, broj bolesnika s ovom nuspojavom bio je iznimno malen da bi se donijeli posebni zaključci i potrebna su daljna prospektivna istraživanja (72,83).

Hipogamaglobulinemija je hematološki poremećaj pada broja gama globulina. Klinička slika može biti ili potpuno asimptomatska ili se može prezentirati različitim infekcijama ovisno o vrsti gama globulina koji su u padu i njihovoj apsolutnoj vrijednosti (84). Pacijenti prilikom uzimanja okrelizumaba najčešće vremenom razvijaju hipogamaglobulinemiju. U kontinuiranom su padu imunoglobulini M (IgM), dok se imunoglobulini G (IgG) značajno snižavaju najčešće tek nakon primjene petog ciklusa okrelizumaba i povezani su s razvojem ozbiljnijih infekcija (85).

Lijek je kontraindicirano uzimati u slučaju:

1. IgE preosjetljivosti na djelatnu ili pomoćnu tvar lijeka;
2. teške aktivne infekcije;
3. teškog imunokompromitiranog bolesnika;
4. poznatih aktivnih zloćudnih bolesti.

Ne preporuča se cijepljenjem živim i živim atenuiranim cjepivima tijekom i nakon uzimanja okrelizumaba sve dok ne dođe do oporavka B-limfocita. Preporuča se cijepljenje sezonskim cjepivom protiv gripe. Svi bolesnici koji su primili neko cjepivo, iduću dozu okrelizumaba mogu primiti s odmakom od najmanje šest tjedana od dana primitka cjepiva (72).

Okrelizumab je IgG1 antitijelo koje, kao ni ostala IgG1 antitijela, ne prelaze placentalnu barijeru u prvom trimestru trudnoće. Animalne studije pokazuju da lijek može uzrokovati depleciju limfocita B u novorođenčadi, toksičnost testisa, bubrega i koštane srži te perinatalnu smrt u dozi sličnoj ili većoj od one koja se klinički koristi (86). Primjena okrelizumaba u trudnoći nosi sa sobom potencijalni rizik od produljenog manjka B-limfocita, čime se potencijalno povećava rizik od korioamnionitisa i sistemskih infekcija majke, a posljedično može doći do abortusa, prijevremenog poroda ili mrtvorodenog djeteta. S obzirom da anti-CD20 antitijelo rituksimab prolazno smanjuje neonatalne B-stanice (87), preporuka je izbjegavati trudnoću 6 do 12 mjeseci nakon posljednje primjene anti-CD20 antitijela pa tako i okrelizumaba (72,86). Na animalnim modelima potvrđeno je izlučivanje okrelizumaba u

majčino mlijeko. Zbog potencijalnih štetnih učinaka lijeka na dojenčad, dojenje se ne preporuča (72). Najnovije studije provedene na humanim modelima naglašavaju vrlo nisku vjerojatnost štetnih učinaka monoklonskih protutijela dojenjem (88). Liječenje okrelizumabom moglo bi biti sigurno za dojenčad, ali su potrebna dodatna istraživanja na većem broju žena (89).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE**

## **2.1. Primarni cilj istraživanja**

Utvrđiti postoji li razlika u imunofenotipizaciji T-limfocita, B-limfocita i NK stanica prije prve i prije druge doze okrelizumaba u bolesnika liječenih zbog multiple skleroze u Klinici za neurologiju KBC-a Split u razdoblju od 1. siječnja 2019. do 31. prosinca 2021.

## **2.2. Sekundarni ciljevi istraživanja**

1. Prikazati postoji li razlika u laboratorijskim nalazima prije prve infuzije i mjesec dana nakon druge infuzije prve doze okrelizumaba.
2. Usporediti promjenu u elektroforezi serumskih proteina prije prve i prije druge doze okrelizumaba.
3. Analizirati razdiobu po spolu i obliku MS-e oboljelih bolesnika na terapiji okrelizumabom.
4. Prikazati broj relapsa u pacijenata s RRMS-om u godini prije prvog primanja okrelizumaba.
5. Utvrđiti dob i prosječno trajanje bolesti od trenutka postavljanja dijagnoze MS-e do primjene prve doze okrelizumaba.

## **2.3. Hipoteze**

1. Okrelizumab se kod liječenja primjenjivao u većem postotku oboljelih žena u odnosu na muškarce.
2. Najveći broj oboljelih koji primaju okrelizumab nalazi se u dobnoj skupini od 40 do 60 godina.
3. Veći broj bolesnika na terapiji okrelizumabom ima dijagnosticiranu RRMS-u.
4. Prosječno trajanje bolesti od dijagnoze MS-e do prvog primanja okrelizumaba dulje je u bolesnika s RRMS-om.
5. Mjesec dana nakon primljene prve doze okrelizumab neće rezultirati pojavom neutropenije, limfopenije i poremećajem jetrenih enzima u krvnoj slici.
6. Hipoalbuminemija i hipoglobulinemija se ne javljaju nakon primjene prve doze okrelizumaba.
7. Okrelizumab ne uzrokuje značajni pad T-limfocita nakon primjenjene prve doze.
8. Okrelizumab uzrokuje značajan pad B-limfocita nakon primjenjene prve doze.
9. Okrelizumab ne utječe na NK stanice nakon primjenjene prve doze.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

### **3.1. Organizacija istraživanja**

Provedeno je retrospektivno istraživanje na bolesnicima s dijagnozom MS-e koji su liječeni okrelizumabom u razdoblju od 1. siječnja 2019. do 31. prosinca 2021. godine u Klinici za neurologiju KBC-a Split. Podatci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije u razdoblju od 1. lipnja 2022. do 1. srpnja 2022. godine. Korišteni su laboratorijski nalazi te povijesti bolesti navedenih pacijenata u elektronskom i pisanom obliku.

### **3.2. Ispitanici**

Ispitanici su svi bolesnici u Klinici za neurologiju KBC-a Split koji su oboljeli od MS-e, a liječeni su okrelizumabom. Kriteriji uključenja su: pripadnost bolesnika skupini od 18 i više godina i prvo primanje okrelizumaba od 1. siječnja 2019. do 31. prosinca 2021. godine. Kriterij isključenja je odustajanje bolesnika od daljnjeg liječenja okrelizumabom, nakon što su primili prvu polovicu prve doze, zbog zdravstvenog stanja neovisnog o MS-i i primjeni okrelizumaba.

### **3.3. Opis istraživanja**

Podatci su prikupljeni u Klinici za neurologiju KBC-a Split iz medicinske pismohrane i računalnog programa Bolničkog informatičkog sustava (BIS). U istraživanju su analizirani demografski i klinički parametri liječenih bolesnika: spol, dob (godine bolesnika do prve primjene okrelizumaba), dobne skupine, prosječno trajanje bolesti od godine postavljanja dijagnoze MS-e do godine prve primjene okrelizumaba, oblik bolesti (RRMS i PPMS) i broj relapsa u RRMS-i po godini uzimajući u obzir godinu prije primjene prve doze okrelizumaba. Uspoređene su vrijednosti laboratorijskih parametara do dva dana prije prve infuzije i mjesec dana nakon druge infuzije prve doze okrelizumaba. Također su uspoređeni nalazi elektroforeze serumskih proteina i imunofenotipizacije limfocita periferne krvi prije prve i prije druge doze okrelizumaba.

### **3.4. Statistički postupci**

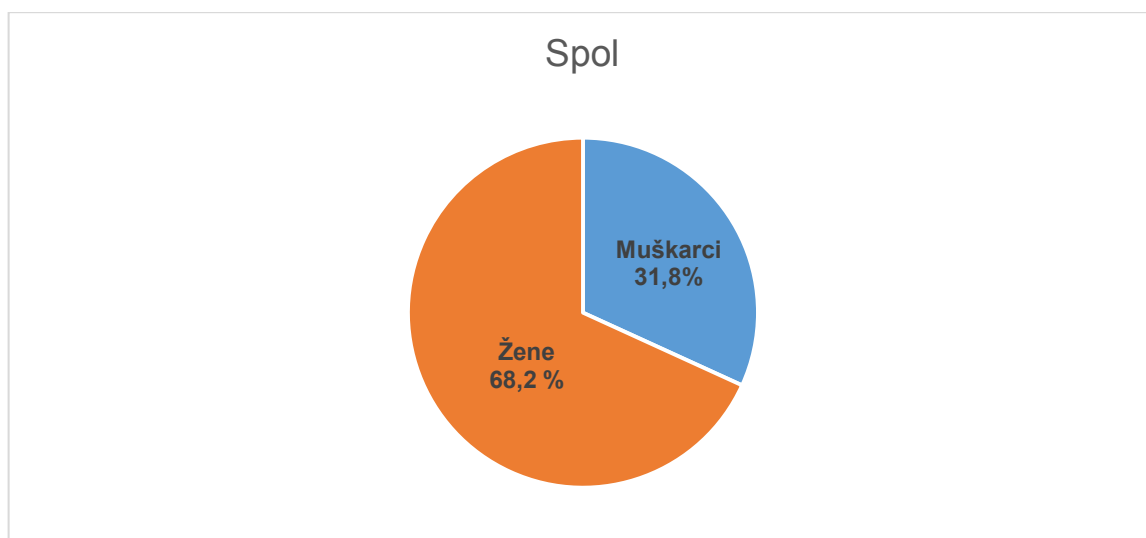
Za analizu podataka korišten je računalni program Statistical Package for the Social Science za računalno sučelje Windows 10 (IBM SPSS software, verzija 28). Nominalne varijable izražene su brojkom odnosno postotkom. Numeričke varijable prikazane su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija te kao medijan i interkvartilni raspon (IQR), a potomje su uspoređene Mann-Whitney U testom primjenjujući metode usporedne statistike. Granica statističke značajnosti rezultata postavljena je na  $P < 0,05$ . Grafovi su izrađeni korištenjem računalnog programa Microsoft Office Excel 2013.

### **3.5. Etičnost istraživanja**

Sukladno Kodeksu liječničke etike i deontologije (NN55/08, 139/15), Helsinškoj deklaraciji (1964.-2013.), Zakonu o zaštiti prava bolesnika (NN 169/04, 37/08) i Zakonu o zaštiti osobnih podataka (NN 103/03-106/12), istraživanje je u potpunosti usklađeno s pravilima i odredbama te se štite osobni podatci i prava svih ispitanika koji su sudjelovali u ovom istraživanju. Etičkog povjerenstva KBC-a Split odobrilo je ovo istraživanje. Klasa: 500-03/22-01/108, Ur.broj: 2181-147/01/06/M.S.-22-02.

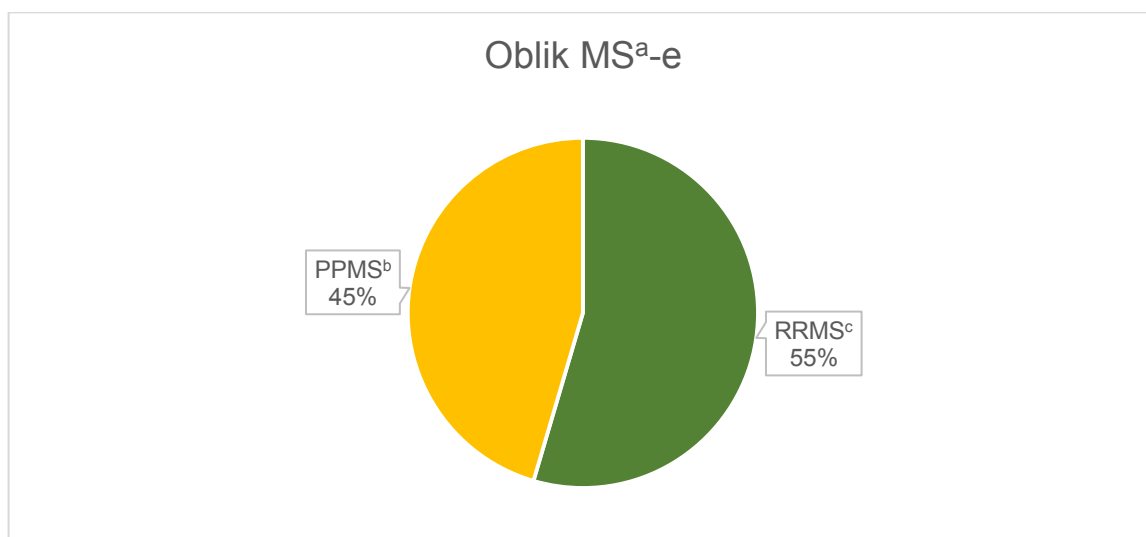
## **4. REZULTATI**

U razdoblju od 1. siječnja 2019. do 31. prosinca 2021. godine u Klinici za neurologiju u KBC-u Split 22 oboljelih od MS-e liječilo se okrelizumabom. Na Slici 6. prikazana je razdioba po spolu bolesnika oboljelih od MS-e koji su primili okrelizumab. Ukupno je bilo 15 žena (68,2%) i 7 muškaraca (31,8%).



**Slika 6.** Grafički prikaz razdiobe bolesnika liječenih okrelizumabom po spolu

Od 22 bolesnika s MS-om koji su primili prvu dozu okrelizumaba, 12 ih je imalo dijagnozu RRMS-e (54,55%), a 10 dijagnozu PPMS-e (45,45%) (Slika 7).



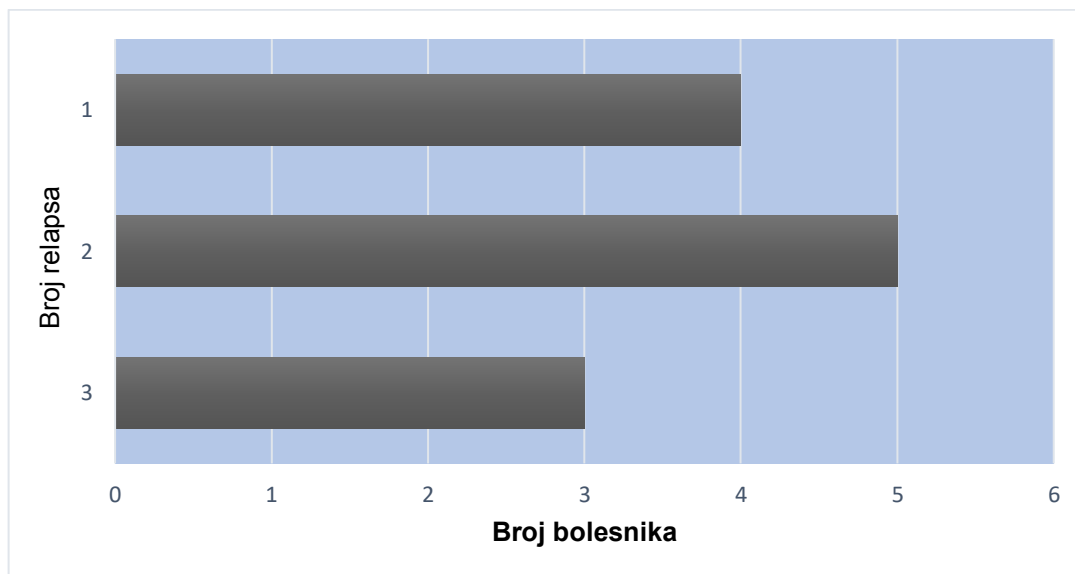
**Slika 7.** Grafički prikaz podjele bolesnika liječenih okrelizumabom s obzirom na oblik multiple skleroze

<sup>a</sup> multipla skleroza

<sup>b</sup> relapsno-remitirajuća multipla skleroza

<sup>c</sup> primarno-progresivna multipla skleroza

Od 12 bolesnika koji su imali RRMS-u, 4 bolesnika imali su relaps jednom, 5 bolesnika dvaput, a 3 bolesnika tri i više puta unutar 12 mjeseci do prve primjene okrelizumaba (Slika 8).



**Slika 8.** Grafički prikaz broja bolesnika oboljelih od relapsno-remitirajuće multiple skleroze s obzirom na broj relapsa u posljednjih 12 mjeseci do prve primjene okrelizumaba

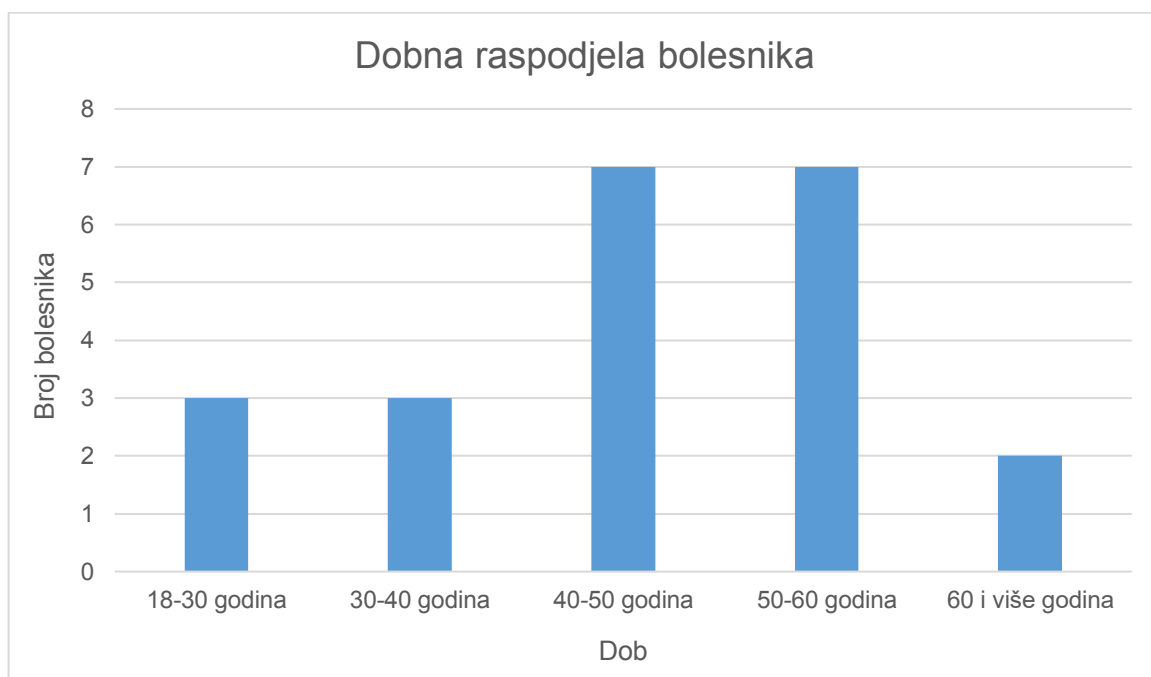
Medijan dobi ispitanika (N=22) u trenutku prve primjene okrelizumaba iznosio je 46,50 godina u rasponu od 38. do 53. godine. Minimalna dob bolesnika bila je 21, a maksimalna 67 godina. Prosječno trajanje bolesti od dijagnoze RRMS-e do prve primjene okrelizumaba bilo je  $9 \pm 3,46$  godina, a  $4,25 \pm 4,10$  godina od dijagnoze PPMS-e do prve primjene okrelizumaba (Tablica 2).

**Tablica 2.** Prikaz dobi bolesnika na početku primjene okrelizumaba i prosječnog trajanja bolesti od dijagnoze multiple skleroze do prve primjene okrelizumaba

	N=22
<b>Dob pacijenata na početku primjene okrelizumaba (godine)</b>	46,50 IQR (38, 53) min-max (21-67)
<b>Duljina trajanja relapsno-remitirajuće multiple skleroze do prve primjene okrelizumaba (godine)</b>	N=9 $9 \pm 3,46$
<b>Duljina trajanja primarno-progresivne multiple skleroze do prve primjene okrelizumaba (godine)</b>	N=8 $4,25 \pm 4,1$



Na Slici 9. prikazana je dobna raspodjela bolesnika na terapiji okrelizumabom. Bolesnici su svrstani u 5 dobnih kategorija. U kategoriji od 18 do 30 i u kategoriji od 30 do 40 godina bio je jednak broj bolesnika: 3 bolesnika tj. 13,64% u svakoj kategoriji, a u kategoriji od 60 i više godina samo 2 bolesnika (9,09%). U kategorijama od 40 do 50 i od 50 do 60 godina također je prisutan jednak broj oboljelih: 7 bolesnika (31,82%) po svakoj kategoriji. Vidljivo je da je najviše ispitanika pripadalo dobnoj skupini od 40 do 60 godina (63,64%).



**Slika 9.** Prikaz raspodjele bolesnika liječenih okrelizumbom po dobnim skupinama

Laboratorijski su nalazi analizirani ispitanicima do maksimalno 2 dana prije prve infuzije prve doze i mjesec dana nakon druge infuzije prve doze okrelizumaba (Tablica 3.) Vidljivo je da nema statistički značajne razlike u laboratorijskim parametrima uspoređujući nalaze do dva dana prije i mjesec dana poslije primjene prve doze lijeka ( $P>0,05$ ).

**Tablica 3.** Prikaz laboratorijskih parametara prije primjene prve infuzije prve doze i mjesec dana nakon primjene druge infuzije prve doze okrelizumaba

Varijable	Prije primjene prve infuzije okrelizumaba	Mjesec dana nakon druge infuzije okrelizumaba	<i>P</i> *
<b>Leukociti</b> ( $\times 10^9/L$ )	(N=21) 6,00 (4,90-7,00)	(N=20) 5,75 (5,25-7,20)	0,938
<b>Eritrociti</b> ( $\times 10^{12}/L$ )	(N=21) 4,80 (4,31-4,93)	(N=20) 4,78 (4,42-4,91)	0,927
<b>Hemoglobin</b> (g/L)	(N=21) 139,00 (128,00-149,00)	(N=20) 138,00 (130,75-148,25)	0,927
<b>Trombociti</b> ( $\times 10^9/L$ )	(N=21) 233,00 (221,00-284,00)	(N=20) 251,50 (215,75-279,50)	0,764
<b>Neutrofili</b> ( $\times 10^9/L$ )	(N=21) 3,70 (2,68-4,47)	(N=20) 3,40 (3,20-4,98)	0,676
<b>Limfociti</b> ( $\times 10^9/L$ )	(N=21) 1,59 (1,24-2,10)	(N=20) 1,36 (1,18-1,71)	0,100
<b>Monociti</b> ( $\times 10^9/L$ )	(N=21) 0,41 (0,33-0,53)	(N=20) 0,46 (0,40-0,57)	0,347
<b>Eozinofili</b> ( $\times 10^9/L$ )	(N=21) 0,14 (0,10-0,22)	(N=20) 0,13 (0,09-0,20)	0,657
<b>Bazofili</b> ( $\times 10^9/L$ )	(N=21) 0,04 (0,03-0,05)	(N=20) 0,04 (0,03-0,05)	0,594
<b>AST<sup>a</sup></b> (U/L)	(N=19) 19,00 (18,00-21,50)	(N=20) 20,00 (16,75-23,00)	0,592
<b>ALT<sup>b</sup></b> (U/L)	(N=19) 20,00 (17,50-28,00)	(N=20) 19,50 (16,00-24,25)	0,663
<b>GGT<sup>c</sup></b> (U/L)	(N=20) 15,00 (12,00-22,00)	(N=20) 15,00 (12,75-21,00)	0,881
<b>ALP<sup>d</sup></b> (U/L)	(N=7) 61,00 (49,00-74,00)	(N=8) 59,50 (51,00-73,50)	0,862
<b>LDH<sup>e</sup></b> (U/L)	(N=13) 158,00 (142,00-168,00)	(N=11) 178,00 (149,50-181,50)	0,401

Podatci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon

\* Mann-Whitney U test

<sup>a</sup> aspartat aminotransferaza

<sup>b</sup> alanin aminotransferaza

<sup>c</sup> gama-glutamil transferaza

<sup>d</sup> alkalna fosfataza

<sup>e</sup> laktat dehidrogenaza

U Tablici 4. prikazane su vrijednosti nalaza elektroforeze serumskih proteina prije prve i prije druge primjene okrelizumaba. Usporedbom navedenih vrijednosti, nije došlo do statistički značajne razlike u količini albumina i globulina kao ni u albuminsko-globulinskom omjeru ( $P>0,05$ ).

**Tablica 4.** Prikaz vrijednosti nalaza elektroforeze serumskih proteina prije prve i prije druge doze okrelizumaba.

<b>Elektroforeza</b>	<b>Prije primjene prve doze okrelizumaba (N=16)</b>	<b>Prije primjene druge doze okrelizumaba (N=15)</b>	<b>P*</b>
<b>Albumin (g/L)</b>	43,70 (41,14-44,30)	42,14 (41,20-43,15)	0,257
<b>Alfa-1-globulini (g/L)</b>	2,68 (2,50-3,00)	2,80 (2,69-2,98)	0,621
<b>Alfa-2-globulini (g/L)</b>	6,51 (6,19-7,34)	6,60 (6,30-6,94)	0,782
<b>Beta globulini (g/L)</b>	7,20 (6,90-8,13)	7,42 (7,02-7,89)	0,737
<b>Gama-globulini (g/L)</b>	9,78 (8,64-10,88)	9,59 (8,55-10,48)	0,874
<b>Albumin/globulini</b>	1,63 (1,53-1,71)	1,62 (1,50-1,71)	0,722

Podatci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon

\* Mann-Whitney U test

Nalazi imunofenotipizacije T-limfocita, B-limfocita i NK-stanica analizirani su na 17 bolesnika prije prve doze i 19 bolesnika prije druge doze okrelizumaba (Tablica 5). Medijan i IQR T-limfocita (CD3+), T-pomagačkih limfocita (CD3+CD4+) i T supresorskih/citotoksičnih limfocita (CD3+CD8+) limfocita prije primjene prve doze okrelizumaba iznosili su 1275,00 (1005,00-1483,00), 744,00 (678,00-891,00) i 343,00 (302,00-508,00) stanica/ $\mu$ L, a prije primjene druge doze 1097,00 (962,00-1323,50), 675,00 (543,00-810,00) i 328,00 (262,00-486,50) stanica/ $\mu$ L. Nije pronađena statistički značajna razlika u padu vrijednosti T, T-pomagačkih i T-supresorskih/citotoksičnih limfocita ( $P>0,05$ ). Nije došlo do promjene u omjeru CD4+/CD8+ T limfocita ( $P=0,861$ ). B limfociti (CD19+) prije prve primjene lijeka iznosili su 175,00 (137,00-214,00) stanica/ $\mu$ L, a prije druge primjene 4,00 (1,00-27,00) stanica/ $\mu$ L. Pronađen je drastični pad u vrijednostima CD19+ B-limfocita ( $P<0,001$ ). Razina NK stanica (CD3-CD16+56+) prije primjene lijeka bila je 237,00 (190,00-338,00) stanica/ $\mu$ L, a prije primjene druge doze 157,00 (135,50-246,50) stanica/ $\mu$ L. Također je primjećen statistički značajna razlika u broju NK stanica (CD3-CD16+56+) nakon prve primjene okrelizumaba ( $P=0,018$ ).

**Tablica 5.** Prikaz nalaza imunofenotipizacije prije prve i prije druge doze okrelizumaba

Imunofenotipizacija limfocita	Biljeg	Prije prve doze okrelizumaba (N=17)	Prije druge doze okrelizumaba (N=19)	P*
T (stanica/ $\mu$ L)	CD3+	1275,00 (1005,00-1483,00)	1097,00 (962,00-1323,50)	0,274
T-pomagački (stanica/ $\mu$ L)	CD3+CD4+	744,00 (678,00-891,00)	675,00 (543,00-810,00)	0,136
T-supresorski/citotoksični (stanica/ $\mu$ L)	CD3+CD8+	343,00 (302,00-508,00)	328,00 (262,00-486,50)	0,623
Omjer CD4+/CD8+	CD4+/CD8+	2,00 (1,60-2,30)	2,00 (1,80-2,60)	0,861
B (stanica/ $\mu$ L)	CD19+	175,00 (137,00-214,00)	4,00 (1,00-27,00)	<b>&lt;0,001</b>
NK <sup>a</sup> (stanica/ $\mu$ L)	CD3- CD16+56+	237,00 (190,00-338,00)	157,00 (135,50-246,50)	<b>0,018</b>

Podatci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon

\* Mann-Whitney U test

<sup>a</sup> prirodne stanice ubojice od engl. *Natural killer*

## **5. RASPRAVA**

Lijek okrelizumab monoklonsko je protutijelo koje je pokazalo visoku učinkovitost u oboljelih od aktivne RRMS-e i PPMS-e. Prvo odobrenje lijeka za liječenje odraslih bolesnika od potonjih bolesti dogodilo se u ožujku 2017. godine u Americi, a nedugo zatim i u Europi (90). S obzirom da je okrelizumab danas postao lijekom prvog izbora za navedene oblike MS-e, primarni cilj ovog istraživanja je prikazivanje razlika u imunofenotipizaciji limfocita prije prve i prije druge doze okrelizumaba u trogodišnjem razdoblju (2019.-2021.) u KBC-u Split.

U ovaj istraživački retrospektivni rad uključeno je 22 ispitanika. 15 ispitanika (68,2%) bilo je ženskog, a 7 (31,8%) muškog spola. Sempere i suradnici proveli su istraživanje o utjecaju okrelizumaba na bolesnike oboljele od MS-e. U svoj rad uključili su 70 ispitanika od čega 42 žene i 28 muškaraca, što bi, prikazujući relativnim odnosom, bilo 60% žena, a 40% muškaraca (91). Brill i suradnici u svoje su istraživanje uključili 33 ispitanika liječenih okrelizumabom gdje je također većinski udio bio žena (67,3%) (92). Naši podatci odgovaraju navedenim istraživanjima što se može pripisati većoj incidenciji žena oboljelih od MS-e, a posljedično tome i većoj incidenciji žena koje primaju okrelizumab.

Prosječna duljina trajanja bolesti od dijagnoze MS-e do prve primjene okrelizumaba u NEDA studiji iznosila je  $4,1 \pm 5,1$  godinu za oboljele od RRMS-e (93), a u ORATORIO studiji  $2,9 \pm 3,2$  godine za oboljele od PPMS-e (94). Naše istraživanje također pokazuje da je bio potreban veći vremenski period za primjenu okrelizumaba u bolesnika kojima je dijagnosticirana RRMS s obzirom na bolesnike kojima je dijagnosticirana PPMS. S druge strane, u našem istraživanju, srednje vrijednosti su veće. Prosječno trajanje za oboljele od RRMS-e bilo je  $9 \pm 3,46$  godina, a za oboljele od PPMS  $4,25 \pm 4,10$  godina. Moguće je da je razlog kasnijoj primjeni okrelizumaba to što su bolesnici duži vremenski period primali lijekove iz prve ili druge terapijske linije i njima održavali remisiju i minimalnu progresiju simptoma, a prebačeni su na okrelizumab ponovnom aktivacijom MS-e.

Cellerino i suradnici u svome istraživanju o okrelizumabu imaju 153 ispitanika prosječne dobi  $41,9 \pm 11,4$  godina (95), dok Gingele i suradnici učinak okrelizumaba analiziraju na 21 ispitaniku s medijanom dobi od 43 godine u rasponu od 22 do 65 godina (96). Usporedno s našim istraživanjem na 22 pacijenta, uočavaju se vrlo slični rezultati: prosječna dob iznosila je  $44,59 \pm 12,443$  godine, a medijan 46,5 godina u rasponu od 37,5 do 53,25 godina. Uzimajući u obzir godinu dijagnoze MS-e i vremenski period od dijagnoze do primjene okrelizumaba, sva tri istraživanja u skladu su s najnovijim epidemiološkim podacima iz 2022. godine prema kojima se MS dijagnosticira između 20. i 50. godine života, a primjena prve doze okrelizumaba nekoliko godina kasnije (3).

Našim ispitanicima izvađeni su laboratorijski nalazi unazad maksimalno dva dana prije prve infuzije prve doze okrelizumaba, dok je kontrolna laboratorijska analiza napravljena mjesec dana nakon druge infuzije. Leukociti i neutrofilni granulociti pokazali su minimalni pad bez statistički značajnih rezultata od čega su tri bolesnika razvili blagi oblik neutropenije (do  $1,0 \times 10^9$  stanica/L). Marodann i suradnici u svome su radu prikazali slučaj bolesnika oboljelog od MS-e koji je zbog pojave odgođene neutropenije nakon primjene rituksimaba prebačen na okrelizumab. Mjesec dana kasnije, bolesnik je razvio leukopeniju ( $2,4 \times 10^9$  stanica/L) i tešku neutropeniju ( $0,240 \times 10^9$  stanica/L). Smatraju da je neutropenija nakon primjene anti-CD20 protutijela relativno rijetka i najčešće blagog oblika što se podudara s našim podacima. Kako su slabo poznati mehanizmi i predisponirajući rizični čimbenici koji dovode do neutropenije nakon primjene okrelizumaba, potrebna su dodatna detaljna istraživanja (97).

Demir i suradnici prikazali su rezultate jetrenih enzima kod 51 ispitanika koje su prikupili prije prve infuzije prve doze okrelizumaba i mjesec dana poslije druge infuzija lijeka. Uspoređujući vrijednosti jetrenih enzima, u njihovom je istraživanju došlo do minimalnih razlika u AST ( $23,8 \pm 22,9$  i  $22,2 \pm 7,2$  U/L), ALT ( $24,6 \pm 17,5$  i  $22,8 \pm 10,2$  U/L) i GGT ( $28,2 \pm 31,1$  i  $21,3 \pm 13,8$  U/L) enzimima bez statističke značajnosti čime su pretpostavili da okrelizumab nema hepatotoksični učinak nakon primjene prve doze (98). Isto istraživanje provedeno je na našim ispitanicima. Također smo dobili rezultate bez statističke značajnosti i minimalne razlike u AST (19,00 (18,00-21,50) i 20,00 (16,75-23,00) U/L), ALT (20,00 (17,50-28,00) i 19,50 (16,00-24,25) U/L) i GGT (15,00 (12,00-22,00) i 15,00 (12,75-21,00) U/L) enzimima.

Osim što su Demir i suradnici uspoređivali jetrene enzime, uspoređivali su u istom vremenskom periodu i ukupan broj limfocita u perifernoj krvi. Prema njihovim rezultatima, prosječan broj ukupnog broja limfocita prije prve infuzije iznosio je  $1761,5 \pm 759,1$  stanica/ $\mu$ L, dok je mjesec dana nakon druge infuzije prve doze okrelizumaba iznosio  $1567,7 \pm 392,0$  stanica/ $\mu$ L. Dobili su statički značajan pad ukupnog broja limfocita što su povezali s djelovanjem okrelizumaba barem još mjesec dana nakon njegove primjene (98). Naši rezultati ne preklapaju se u potpunosti s navedenim istraživanjem. U naših ispitanika također se događa pad limfocita u perifernoj krvi ( $1,59$  (1,24-2,10) i  $1,36$  (1,18-1,71)  $\times 10^9$  stanica/L), ali bez statističke značajnosti. Moguće je da nismo uspjeli dobiti statistički značajne rezultate u našem istraživanju zbog manjeg uzorka ispitanika (N=22) u usporedbi s brojem ispitanika u radu Demira i suradnika (N=51).

Imunofenotipizaciju podgrupa limfocita iz periferne krvi analizirali smo kod naših ispitanika prije primjene prve doze i prije primjene druge doze okrelizumaba. Usporedbom ove



dvije grupe, uočili smo pad CD3+ T-limfocita, pomagačkih CD4+ T-limfocita i supresorskih CD8+ T-limfocita. Pad nije bio statistički značajan u niti jednoj od navedenih skupina. Naši rezultati podudarali su se sa studijom Cellerina i suradnika u kojoj je uočen pad navedenih T-limfocita, ali također bez statističkih značajnih rezultata prije i nakon prve primjene okrelizumaba. Navedeni rezultati sugeriraju da okrelizumab ima ograničen učinak na depleciju T-limfocita (95). Međutim, Gingele i suradnici u svojem su istraživanju prikazali da je vrijednost CD20+ T-limfocita iznosila  $224.9 \pm 24.6$  stanica/ $\mu$ L prije primjene okrelizumaba te su zabilježili značajni pad u vrijednosti od  $0.57 \pm 0.18$  stanica/ $\mu$ L nakon primjene prve doze okrelizumaba (96). Kako CD20+ T-limfociti čine 18,4% ukupnog broja CD20+ stanica, navedeni rezultati sugeriraju da okrelizumab nije isključivo specifičan za B-limfocite te da CD20+ T-limfociti potencijalno imaju ulogu u imunopatogenezi i smanjenu aktivnosti MS-e (96,99). Nismo bili u mogućnosti provesti imunofenotipizaciju CD20+ T-limfocita, ali rezultati prethodnog istraživanja mogli bi objasniti pad broja T-limfocita i u našem radu. Moguće je da oboljeli od MS-e imaju nešto veći broj CD20+ T-limfocita u usporedbi sa zdravom populacijom, ali potrebno je provesti daljnje studije.

U pretragama se, kao i u većini ostalih istraživanja, radi jednostavnosti kontroliraju CD19+ B-limfociti jer prisustvo lijeka može ometati analizu CD20+ B-limfocita (72), a CD19+ biljeg prisutan je u svim stanicama B loze u ljudi (100). Provedenom imunofenotipizacijom limfocita prije prve i prije druge doze okrelizumaba uočili smo očekivani drastičan pad CD19+ B stanica. Medijan CD19+ B-limfocita prije primjene okrelizumaba u naših bolesnika iznosio je 175,00 u rasponu 137,00 do 214,00 stanica/ $\mu$ L, a prije primjene druge doze 4,00 u rasponu od 1,00 do 27,00 stanica/ $\mu$ L. U velikom istraživanju na 218 ispitanika oboljelih od MS-e Abbadesse i suradnika, potvrđen je statistički značajan pad CD19+ B-limfocita (101). Fernández-Velasco i suradnici također su uspoređivali djelovanje okrelizumaba na CD19+ B stanice iako samo na ispitanicima s PPMS-om. CD19+ B stanice izrazili su kao medijan stanica/ $\mu$ L koji je prije primjene okrelizumaba bio 232 u rasponu 148-354, a nakon šest mjeseci prije druge doze 9,1 u rasponu od 1.9 do 41 (102). Naši rezultati odgovaraju podacima iz navedenih istraživanja i potvrđuju primarno djelovanje okrelizumaba na B staničnu lozu.

Medijan CD3-CD16+CD56+ NK stanica naših ispitanika prije primjene prve doze okrelizumaba iznosio je 237,00 u rasponu od 190,00 do 338,00 stanica/ $\mu$ L, a na imunofenotipizaciji napravljenoj prije druge doze okrelizumaba 157,00 u rasponu od 135,50 do 246,50 stanica/ $\mu$ L. Fernández-Velasco i suradnici također su uočili pad CD56+ NK stanica uspoređujući imunofenotipizaciju prije i nakon prve doze okrelizumaba (medijan stanica/ $\mu$ L 92 u rasponu od 53 do 175 i 90 u rasponu od 58 do 158), ali njihovi rezultati bili su bez statističke

značajnosti (102). Abbadessa i suradnici prikazali su minimalni pad NK stanica (prosječan broj stanica/ $\mu$ L  $269.95 \pm 202.29$  i  $264.09 \pm 174.94$ ) bez statističke značajnosti (83). Naši rezultati oprečni su navedenim istraživanjima jer su pokazali veliki utjecaj okrelizumaba na NK stanice. Glavna je razlika našeg, u odnosu na ostala istraživanja, manji uzorak ispitanika. Osim toga, većina naših ispitanika prije primjene okrelizumaba koristila je druge DMT-ove. Perini i suradnici analizirali su NK-stanice prije i nakon primjene interferona beta i ustanovili su da lijek djeluje na depleciju CD3-CD16+ i CD3-CD57+ NK stanica (103), dok su Al-Falahi i suradnici, na animalnim modelima s EAE-om, pokazali da glatiramer-acetat ima puno jaču učinkovitost ubijanja vlastitih NK stanica protiv dendritičnih stanica (36). Potencijalno okrelizumab na neki način nepoznatim mehanizmom djeluje kumulativno sa zaostacima prethodno primljenih lijekova i reaktivira njihovo djelovanje na depleciju NK stanica. CD3-CD16+CD56+ biomarker je za citotoksične NK stanice koje djeluju na uništenje stanica zaraženih virusima, pogođenih karcinomom ili zaslužnih za odbacivanje tkiva nakon transplatacije. Niska razina CD3-CD16+CD56+ NK stanica oboljele čini iznimno osjetljivima na razvoj herpetičkih infekcija (104), a u našoj studiji jedan bolesnik nakon primjene okrelizumaba razvio je infekciju herpes virusom. Opisana je i mogućnost pojave malignih bolesti nakon primjene okrelizumaba koja je veća u odnosu na placebo i u odnosu na skupinu koja je primila interferon beta (105) te bi se mogla objasniti, osim smanjenim imunološkim odgovorom zbog deplecije B stanične loze, i smanjenim imunološkim odgovorom zbog deplecije CD3-CD16+CD56+ NK stanica. S obzirom da je okrelizumab novi lijek djelomično nedovoljno istraženog imunopatogenetskog mehanizma, moguće je i da sam, neovisno o drugim imunomodulatornim i imunosupresivnim lijekovima, djeluje i na CD3-CD16+CD56+ NK stanice i dovodi do povećanog rizika od razvoja reinfekcija i malignih bolesti. Analiza nuspojava nakon primjene okrelizumaba van je dometa ovog istraživanja i potrebne su daljnje studije kako bi se u potpunosti potvrdio imunopatogenetski mehanizam djelovanja ovoga lijeka.

Potrebno je navesti neka ograničenja našeg istraživanja. Naša studija je retrospektivna i rađena je na relativno malenom uzorku od 22 ispitanika. Za analizu pojedinih parametara nedostajala nam je određena medicinska dokumentacija. Također smo zanemarili zbirne učinke djelovanja okrelizumaba i prethodno primljenih DMT-ova.

## **6. ZAKLJUČCI**

Provedenim istraživanjem prikazali smo sljedeće rezultate:

1. Okrelizumab se primjenjuje na većem postotku oboljelih žena (68,2%) u odnosu na muškarce (31,8%).
2. Medijan dobi ispitanika pri prvoj primjeni okrelizumaba iznosi 46,50 godina u rasponu od 38. do 53. godine.
3. Najviše oboljelih na terapiji okrelizumabom nalazi se u dobnoj skupini od 40 do 60 godina.
4. Više oboljelih koji primaju okrelizumab ima RRMS-u nego PPMS-u.
5. Prosječno trajanje duljine bolesti od dijagnoze RRMS-e do prve primjene okrelizumaba ( $9 \pm 3,46$  godina) dulje je od prosječnog trajanja bolesti od dijagnoze PPMS-e do prve primjene okrelizumaba ( $4,25 \pm 4,10$  godina).
6. Nema razlike u elektroforezi proteina prije prve i prije druge primjene okrelizumaba.
7. Nema razlike u kontrolnom laboratorijskom nalazu mjesec dana nakon primjene druge infuzije prve doze u odnosu na laboratorijski nalaz prije prve infuzije prve doze lijeka.
8. Okrelizumab nije utjecao na razvoj limfopenije i neutropenije mjesec dana nakon primjene druge infuzije prve doze.
9. Okrelizumab nije pokazao hepatotoksični učinak mjesec dana nakon primjene druge infuzije prve doze.
10. Usporedbom imunofenotipizacije prije prve i prije druge doze okrelizumaba, nastupio je pad CD3+, CD4+ i CD8+ T-limfocita bez statistički značajne razlike.
11. Okrelizumab nakon prve primjene značajno utječe na depleciju CD19+ limfocita B (4,00 u rasponu od 1,00 do 27,00 stanica/ $\mu$ L).
12. Medijan CD3-CD16+CD56+ NK stanica nakon prve primjene okrelizumaba značajno je snižen i iznosi 157,00 u rasponu od 135,50 do 246,50 stanica/ $\mu$ L.

## **7. LITERATURA**

1. Yamout BI, Alroughani R. Multiple sclerosis. *Semin Neurol.* 2018;38:212–25.
2. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult Scler J.* 2017;23:1123–36.
3. The Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of MS – 3rd Edition, part 2: clinical management of multiple sclerosis around the world [Internet]. UK: The Multiple Sclerosis International Federation; 2021 [citirano 23. svibnja 2022.]. Dostupno na: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2021/05/Atlas-3rd-Edition-clinical-management-report-EN-5-5-21.pdf>
4. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol.* 2019;26:27–40.
5. Tarlinton RE, Martynova E, Rizvanov AA, Khaiboullina S, Verma S. Role of viruses in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Viruses.* 2020;12:e643.
6. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2018;20:43–7.
7. Russi AE, Ebel ME, Yang Y, Brown MA. Male-specific IL-33 expression regulates sex-dimorphic EAE susceptibility. *Proc Natl Acad Sci.* 2018;115:e1520–9.
8. Voskuhl RR, Sawalha AH, Itoh Y. Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2018;24:22–31.
9. Palacios N, Alonso A, Brønnum-Hansen H, Ascherio A. Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Ann Epidemiol.* 2011;21:536–42.
10. Haindl MT, Hochmeister S. Vitamin D in multiple sclerosis-lessons from animal studies. *Front Neurol.* 2021;12:757795.
11. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis?. *Brain J Neurol.* 2010;133:1869–88.
12. Orton SM, Wald L, Confavreux C, Vukusic S, Krohn JP, Ramagopalan SV i sur. Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France. *Neurology.* 2011;76:425–31.
13. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. *Ann Neurol.* 2007;61:504–13.
14. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;9:599–612.

15. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006;296:2832–8.
16. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and multiple sclerosis: a comprehensive review. *Neurol Ther*. 2018;7:59–85.
17. Løken-Amsrud KI, Holmøy T, Bakke SJ, Beiske AG, Bjerve KS, Bjørnarå BT i sur. Vitamin D and disease activity in multiple sclerosis before and during interferon- $\beta$  treatment. *Neurology*. 2012;79:267–73.
18. Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G i sur. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2013;19:162–6.
19. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PloS One*. 2010;5:e12496.
20. Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, Moon JS, Jude KM, Fernandez D i sur. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*. 2022;603:321–7.
21. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L i sur. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476:214–9.
22. Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: A HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2007;165:1097–109.
23. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M i sur. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2015;47:1107–13.
24. Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *J Autoimmun*. 2014;48–49:134–42.
25. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;338:278–85.
26. Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL i sur. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50:646–57.
27. Medix [Internet]. Zagreb: C. T. - Poslovne informacije d.o.o.; 2018. Multipla skleroza: uloga pojedinih subpopulacija limfocita u imunopatogenezi bolesti i terapijske mogućnosti. [citirano 26 svibnja 2022.]. Dostupno na: <https://www.medix.hr/multipla-skleroza-uloga-pojedinih-subpopulacija-limfocita-u-imunopatogenezi-bolesti-i-terapijske-mogucnosti>
28. Brinar V i sur. Multipla skleroza. *Neurologija za medicinare*. Drugo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 324–338.

29. Lazibat I, Rubinić Majdak M, Županić S. Multiple sclerosis: new aspects of Immunopathogenesis. *Acta Clin Croat.* 2018;57:352-361.
30. Brinar V. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Acta Neuropsychiatr.* 2009;21:15–7.
31. Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011;585:3758–63.
32. Wagner CA, Roqué PJ, Mileur TR, Liggitt D, Goverman JM. Myelin-specific CD8+ T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity. *J Clin Invest.* 2020;130:203–13.
33. Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4:557–67.
34. Perdaens O, van Pesch V. Molecular mechanisms of immunosenescence and inflammaging: relevance to the immunopathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Front Neurol.* 2022;12:811518.
35. Chanvillard C, Jacolik RF, Infante-Duarte C, Nayak RC. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol.* 2013;4:63.
36. Al-Falahi Y, Sand KL, Knudsen E, Damaj BB, Rolin J, Maghazachi AA. Splenic natural killer cell activity in two models of experimental neurodegenerative diseases. *J Cell Mol Med.* 2009;13:2693–703.
37. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med.* 1997;186:1677–87.
38. Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP i sur. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2006;20:896–905.
39. Pagenstecher A, Lassmann S, Carson MJ, Kincaid CL, Stalder AK, Campbell IL. Astrocyte-targeted expression of IL-12 induces active cellular immune responses in the central nervous system and modulates experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000;164:4481–92.
40. Shi FD, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren HG. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000;165:3099–104.
41. Al-Ani M, Elemam NM, Hundt JE, Maghazachi AA. Drugs for multiple sclerosis activate natural killer cells: do they protect against COVID-19 infection?. *Infect Drug Resist.* 2020;13:3243–54.



42. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M i sur. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain J Neurol.* 2009;132:1175–89.
43. Multipla skleroza [Internet]. Hrvatska: Biogen-107952; 2022. Oblici multiple skleroze. [citirano 31. svibnja 2022.]. Dostupno na: [https://www.multipla-skleroza.hr/content/intl/europe/croatia/ms/patients/multipla-skleroza/hr\\_HR/home/obolesti/sto-je-multipla-skleroza/oblici-multiple-skleroze.html?accKey=2](https://www.multipla-skleroza.hr/content/intl/europe/croatia/ms/patients/multipla-skleroza/hr_HR/home/obolesti/sto-je-multipla-skleroza/oblici-multiple-skleroze.html?accKey=2)
44. Dubey D, Pittock SJ, Krecke KN, Morris PP, Sechi E, Zalewski NL i sur. Clinical, radiologic, and prognostic features of myelitis associated with myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody. *JAMA Neurol.* 2019;76:301–9.
45. Niino M, Miyazaki Y. Relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain Nerve Shinkei Kenkyu No Shinpo.* 2021;73:442–9.
46. Abel A, McClelland C, Lee MS. Critical review: typical and atypical optic neuritis. *Surv Ophthalmol.* 2019;64:770–9.
47. Kale N. Optic neuritis as an early sign of multiple sclerosis. *Eye Brain.* 2016;8:195–202.
48. National Institute of Neurological Disorders and Stroke [Internet]. Transverse Myelitis Fact Sheet [citirano 31. svibnja 2022.]. Dostupno na: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/patient-caregiver-education/fact-sheets/transverse-myelitis-fact-sheet>
49. Repovic P. Management of multiple sclerosis relapses. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2019;25:655.
50. Vukorepa D. Liječenje multiple skleroze imunomodulacijskim lijekovima tijekom 2019. godine u Klinici za neurologiju KBC-a Split i Medicinskog fakulteta u Splitu [Internet]. Sveučilište u Splitu. Medicinski fakultet. *Neurologija*; 2020 [citirano 31. svibnja 2022.]. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:514406>
51. MS Trust [Internet]. Letchworth Garden City: Spirella builing; Expanded Disability Status Scale (EDSS) [citirano 1. srpnja 2022.]. Dostupno na: <https://mstrust.org.uk/a-z/expanded-disability-status-scale-edss>
52. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33:1444–52.
53. Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the expanded disability status scale (EDSS) and the multiple sclerosis functional composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2014;14:58.

54. van Munster CEP, Uitdehaag BMJ. Outcome measures in clinical trials for multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2017;31:217–36.
55. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G i sur. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17:162–73.
56. Solomon AJ, Naismith RT, Cross AH. Misdiagnosis of multiple sclerosis: impact of the 2017 McDonald criteria on clinical practice. *Neurology*. 2019;92:26–33.
57. McNicholas N, Hutchinson M, McGuigan C, Chataway J. 2017 McDonald diagnostic criteria: a review of the evidence. *Mult Scler Relat Disord*. 2018;24:48–54.
58. Csépany T. Diagnosis of multiple sclerosis: A review of the 2017 revisions of the McDonald criteria. *Ideggyogyaszati Szle*. 2018;71:321–9.
59. Carroll WM. 2017 McDonald MS diagnostic criteria: Evidence-based revisions. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2018;24:92–5.
60. Lee DH, Peschke M, Utz KS, Linker RA. Diagnostic value of the 2017 McDonald criteria in patients with a first demyelinating event suggestive of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2019;26:540–5.
61. Travers BS, Tsang BKT, Barton JL. Multiple sclerosis: Diagnosis, disease-modifying therapy and prognosis. *Aust J Gen Pract*. 2022;51:199–206.
62. Medix [Internet]. Zagreb: C. T. - Poslovne informacije d.o.o.; 2020. Dijagnoza i diferencijalna dijagnoza multiple skleroze. [citirano 12. srpnja 2022.]. Dostupno na: <https://www.medix.hr/dijagnoza-i-diferencijalna-dijagnoza-multiple-skleroze>
63. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet Lond Engl*. 2017;389:1336–46.
64. MedlinePlus Medical Encyclopedia [Internet]. CSF oligoclonal banding [citirano 12. srpnja 2022.]. Dostupno na: <https://medlineplus.gov/ency/article/003631.htm>
65. Diagnosing primary progressive MS [Internet]. National Multiple Sclerosis Society. [citirano 12. lipnja 2022.]. Dostupno na: <https://www.nationalmssociety.org/What-is-MS/Types-of-MS/Primary-progressive-MS/Diagnosing-Primary-Progressive-MS>
66. Frohman EM, Shah A, Eggenberger E, Metz L, Zivadinov R, Stüve O. Corticosteroids for multiple sclerosis: I. Application for treating exacerbations. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 2007;4:618–26.
67. Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care*. 2016;22:s159-170.

68. Gholamzad M, Ebtekar M, Ardestani MS, Azimi M, Mahmodi Z, Mousavi MJ i sur. A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. 2019;68:25–38.
69. Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med*. 2016;16:s53–9.
70. Vitkova M, Gdovinova Z, Rosenberger J, Szilasiova J, Nagyová I, Mikula P i sur. Factors associated with poor sleep quality in patients with multiple sclerosis differ by disease duration. *Disabil Health J*. 2014;7:466–71.
71. Genentech [Internet]. Multiple sclerosis [citirano 14. lipnja 2022.]. Dostupno na: <https://www.gene.com/patients/disease-education/multiple-sclerosis>
72. EMA. European Medicines Agency [Internet]. European Medicines Agency. Ocrevus, INN-ocrelizumab [citirano 14. lipnja 2022.]. Dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ocrevus-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ocrevus-epar-product-information_hr.pdf)
73. Lamb YN. Ocrelizumab: a review in multiple sclerosis. *Drugs*. 2022;82:323–34.
74. Gibiansky E, Petry C, Mercier F, Günther A, Herman A, Kappos L i sur. Ocrelizumab in relapsing and primary progressive multiple sclerosis: pharmacokinetic and pharmacodynamic analyses of OPERA I, OPERA II and ORATORIO. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87:2511–20.
75. Cross A, Bennett J, Büdingen HC von, Carruthers R, Edwards K, Fallis R i sur. Ocrelizumab treatment reduced levels of neurofilament light chain and numbers of B cells in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing multiple sclerosis in the OBOE study. *Neurology*. 2019;92:S56.008.
76. Bar-Or A, Bennett J, Budingen HV, Carruthers R, Edwards K, Fallis R i sur. B Cells, T Cells and inflammatory CSF biomarkers in primary progressive MS and relapsing MS in the OBOE (ocrelizumab biomarker outcome evaluation) trial. *Neurology*. 2020;94:1635.
77. Ocrevus (injekcija okrelizumaba): uporaba, doziranje, nuspojave, interakcije, upozorenje - Ocrevus [Internet]. [citirano 16. lipnja 2022.]. Dostupno na: <https://hr.orthopaedie-innsbruck.at/ocrevus-5571>
78. Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL. Ocrelizumab and other CD20+ B-cell-depleting therapies in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017;14:835–41.
79. Ali ZK, Baker DE. Formulary drug review: ocrelizumab. *Hosp Pharm*. 2017;52:599–606.
80. Dale DC. How I diagnose and treat neutropenia. *Curr Opin Hematol*. 2016;23:1–4.

81. Baird-Gunning J, Yun J, Stevenson W, Ng K. Severe delayed-onset neutropenia induced by ocrelizumab. *The Neurohospitalist*. 2021;11:59–61.
82. HeMED [Internet]. Limfocitopenija [citirano 19. lipnja 2022.]. Dostupno na: <https://www.hemed.hr/Default.aspx?sid=14360>
83. Abbadessa G, Maida E, Miele G, Lavorgna L, Marfia GA, Valentino P i sur. Lymphopenia in multiple sclerosis patients treated with ocrelizumab is associated with an effect on CD8 T cells. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;60:103740.
84. Hypogammaglobulinemia: Practice Essentials, Background, Pathophysiology. [citirano 19. lipnja 2022.]. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/136471-overview>
85. Habek M, Piskač D, Gabelić T, Barun B, Adamec I, Krbot Skorić M. Hypogammaglobulinemia, infections and COVID-19 in people with multiple sclerosis treated with ocrelizumab. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;62:103798.
86. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:985646.
87. Chakravarty EF, Murray ER, Kelman A, Farmer P. Pregnancy outcomes after maternal exposure to rituximab. *Blood*. 2011;117:1499–506.
88. Datta P, Baker T, Hale TW. Balancing the use of medications while maintaining breastfeeding. *Clin Perinatol*. 2019;46:367–82.
89. Ciplea AI, Langer-Gould A, de Vries A, Schaap T, Thiel S, Ringelstein M i sur. Monoclonal antibody treatment during pregnancy and/or lactation in women with MS or neuromyelitis optica spectrum disorder. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2020;7:e723.
90. Mulero P, Midaglia L, Montalban X. Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11:1756286418773025.
91. Sempere AP, Berenguer-Ruiz L, Borrego-Soriano I, Burgos-San Jose A, Concepcion-Aramendia L, Volar L i sur. Ocrelizumab in multiple sclerosis: a real-world study from Spain. *Front Neurol*. 2020;11:592304.
92. Brill L, Rechtman A, Zveik O, Haham N, Oiknine-Djian E, Wolf DG i sur. Humoral and T-cell response to SARS-CoV-2 vaccination in patients with multiple sclerosis treated with ocrelizumab. *JAMA Neurol*. 2021;78:1510–4.
93. Havrdová E, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, Hartung HP, Kappos L, et al. No evidence of disease activity (NEDA) analysis by epochs in patients with relapsing multiple sclerosis

treated with ocrelizumab vs interferon beta-1a. *Mult Scler J - Exp Transl Clin.* 2018;4:2055217318760642.

94. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B i sur. Ocrelizumab versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376:221–34.

95. Cellerino M, Boffa G, Lapucci C, Tazza F, Sbragia E, Mancuso E i sur. Predictors of ocrelizumab effectiveness in patients with multiple sclerosis. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* 2021;18:2579–88.

96. Gingele S, Jacobus TL, Konen FF, Hümmert MW, Sühs KW, Schwenkenbecher P i sur. Ocrelizumab depletes CD20+ T cells in multiple sclerosis patients. *Cells.* 2018;8:12.

97. Marrodan M, Laviano J, Oneto S, Reino FM, Delorme R, Fornillo F i sur. Rituximab- and ocrelizumab-induced early- and late-onset neutropenia in a multiple sclerosis patient. *Neurol Sci.* 2021;42:3893–5.

98. Demir S, Atmaca MM, Togrol RE. The first cure experience of a clinic: approach to the patient to start ocrelizumab. *Arch Neuropsychiatry.* 2019;58:52–6.

99. Quendt C, Ochs J, Häusser-Kinzel S, Häusler D, Weber MS. Proinflammatory CD20+ T cells are differentially affected by multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neurol.* 2021;90:834–9.

100. Rich RR i sur. *Clinical immunology: principles and practice.* 5. izdanje. Amsterdam: Elsevier; 2018.

101. Abbadessa G, Miele G, Cavalla P, Valentino P, Marfia GA, Signoriello E i sur. CD19 cell count at baseline predicts B cell repopulation at 6 and 12 months in multiple sclerosis patients treated with ocrelizumab. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18:8163.

102. Fernández-Velasco JI, Kuhle J, Monreal E, Meca-Lallana V, Meca-Lallana J, Izquierdo G i sur. Effect of ocrelizumab in blood leukocytes of patients with primary progressive MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation.* 2021;8:e940.

103. Perini P, Wadhwa M, Buttarello M, Meager A, Facchinetti A, Thorpe R i sur. Effect of IFNbeta and anti-IFNbeta antibodies on NK cells in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2000;105:91–5.

104. LOINC [Internet]. CD3-CD16+CD56+ (Natural killer) cells/100 cells in Blood [citirano 2. srpnja 2022.]. Dostupno na: <https://loinc.org/loinc/8112-5/>

105. Mancinelli CR, Rossi ND, Capra R. Ocrelizumab for the treatment of multiple sclerosis: safety, efficacy, and pharmacology. *Ther Clin Risk Manag.* 2021;17:765–76.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Prikazivanje i usporedba imunofenotipizacije T-limfocita, B-limfocita i NK stanica prije primjene prve i prije primjene druge doze okrelizumaba u bolesnika oboljelih od MS-e u KBC-u Split od 1. siječnja 2019. do 31. prosinca 2021. godine.

**Ispitanici i postupci:** Uključeno je 22 pacijenata oboljelih od MS-e starijih od 18 godina koji su se liječili okrelizumabom u Klinici za neurologiju KBC-a Split u navedenom trogodišnjem razdoblju. Analizirani su podaci o spolu, dobi, tipu MS-e i prosječnom trajanju bolesti od dijagnoze MS-e do prvog primanja okrelizumaba. Uspoređeni su laboratorijski nalazi prikupljeni do 2 dana prije prve infuzije prve doze i mjesec dana nakon primjene druge infuzije prve doze okrelizumaba te imunofenotipizacije stanica i elektroforeze proteina prije prve i prije druge doze okrelizumaba. Statistička značajnost postavljena je na  $P < 0,05$ .

**Rezultati:** Od ukupno 22 ispitanika, 15 je ženskog (68,2%), a 7 muškog spola (31,8%). Medijan dobi iznosio je 46,5 u rasponu od 37,5 do 53,25 godina. Prosječno trajanje bolesti od dijagnoze MS-e do prve primjene okrelizumaba kod bolesnika s RRMS-om bilo je  $9 \pm 3,46$  godina, a kod bolesnika s PPMS-om  $4,25 \pm 4,10$  godina. Nije bilo statistički značajnih razlika u rezultatima u kontrolnim laboratorijskim parametrima za limfocite, neutrofilne granulocite i jetrene enzime mjesec dana nakon primjene druge infuzije prve doze okrelizumaba ( $P > 0,05$ ). Nije došlo do značajnog pada serumskih albumina i globulina prije druge doze okrelizumaba ( $P > 0,05$ ). Rezultati CD3+, CD3+CD4+ i CD3+CD8+ T-limfocita prije primjene prve doze okrelizumaba iznosili su 1275,00 (1005,00-1483,00), 744,00 (678,00-891,00) i 343,00 (302,00-508,00) stanica/ $\mu$ L. Prije primjene druge doze okrelizumaba vrijednosti su pale na 1097,00 (962,00-1323,50), 675,00 (543,00-810,00) i 328,00 (262,00-486,50) stanica/ $\mu$ L bez statističke značajnosti ( $P > 0,05$ ). Medijan CD19+ B-limfocita i CD3-CD16+CD56+ NK stanica prije primjene prve doze okrelizumaba bio je 175,00 (137,00-214,00) i 237,00 (190,00-338,00) stanica/ $\mu$ L, a prije primjene druge doze okrelizumaba 4,00 (1,00-27,00) i 157,00 (135,50-246,50) stanica/ $\mu$ L. Značajna deplecija dogodila se i kod B-limfocita ( $P < 0,001$ ) i kod NK stanica ( $P = 0,018$ ).

**Zaključak:** Okrelizumab nije utjecao na promjenu laboratorijskih vrijednosti mjesec dana nakon primjene druge infuzije prve doze i na elektroforezu proteina prije druge doze. Primjena prve doze okrelizumaba uzrokovala je minimalni pad T-limfocita, ali značajni pad B- limfocita i NK stanica.

## **9. SUMMARY**



**Diploma thesis title:** To show and compare the immunophenotyping of T-lymphocytes, B-lymphocytes and NK cells before the administration of the first and before the administration of the second dose of ocrelizumab in patients with MS in the KBC Split from January 1, 2019 to December 31, 2021.

**Subjects and methods:** 22 MS patients older than 18 years who were treated with ocrelizumab at the KBC Split Neurology Clinic in the specified three-year period were included. Data on gender, age, type of MS and the average duration of the disease from the diagnosis of MS to the first administration of ocrelizumab were analyzed. Laboratory findings collected up to 2 days before the first infusion of the first dose and one month after the administration of the second infusion of the first dose of ocrelizumab and cell immunophenotyping and protein electrophoresis before the first and before the second dose of ocrelizumab were compared. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

**Results:** Out of a total of 22 respondents, 15 are female (68.2%), and 7 are male (31.8%). The median age was 46.5, ranging from 37.5 to 53.25 years. The average duration of the disease from the diagnosis of MS to the first administration of ocrelizumab in patients with RRMS was  $9 \pm 3.46$  years, and in patients with PPMS  $4.25 \pm 4.10$  years. There were no statistically significant differences in the results of the control laboratory parameters for lymphocytes, neutrophil granulocytes and liver enzymes one month after administration of the second infusion of the first dose of ocrelizumab ( $P > 0.05$ ). There was no significant decrease in serum albumin and globulin before the second dose of ocrelizumab ( $P > 0.05$ ). The results of CD3+, CD3+CD4+ and CD3+CD8+ T-lymphocytes before administration of the first dose of ocrelizumab were 1275.00 (1005.00-1483.00), 744.00 (678.00-891.00) and 343.00 (302.00-508.00) cell/ $\mu$ L. Before administration of the second dose of ocrelizumab, the values decreased to 1097.00 (962.00-1323.50), 675.00 (543.00-810.00) and 328.00 (262.00-486.50) cells/ $\mu$ L without statistical significance ( $P > 0.05$ ). Median CD19+ B-lymphocytes and CD3-CD16+CD56+ NK cells before administration of the first dose of ocrelizumab were 175.00 (137.00-214.00) and 237.00 (190.00-338.00) cells/ $\mu$ L, and before administration of the second dose of ocrelizumab 4.00 (1.00-27.00) and 157.00 (135.50-246.50) cells/ $\mu$ L. Significant depletion occurred in both B-lymphocytes ( $P < 0.001$ ) and NK cells ( $P = 0.018$ ).

**Conclusion:** Ocrelizumab did not affect the change in laboratory values one month after administration of the second infusion of the first dose and on protein electrophoresis before the second dose. Administration of the first dose of ocrelizumab caused a minimal decrease in T-lymphocytes, but a significant decrease in B-lymphocytes and NK cells.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNİ PODACI**

**Ime i prezime:** Marija Radmilo

**Datum rođenja:** 1. travnja 1998. godine

**Mjesto rođenja:** Split, Republika Hrvatska

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa stanovanja:** Braće Radića 37, Mravince

## **OBRAZOVANJE**

2004.-2012. Osnovna škola kraljice Jelene, Solin

2012.-2016. IV. Gimnazija Marko Marulić Split

2016.-2022. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program medicina

## **OSOBNİ ZNANJA I VJEŠTINE**

Demonstratorica na Katedri za kliničke vještine (2021.-2022.)

Rad na cijepljenju protiv COVID-19 u Spaladium areni (2021.)

Aktivno služenje engleskim i talijanskim jezikom

Vozačka dozvola B kategorije