

# Razlike u regulacijskim T limfocitima i monocitima osoba s primarno progresivnom multiplom sklerozom liječenih ocrelizumabom te onih koji ne pristaju na liječenje

---

**Ipavec, Nina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2025**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:695623>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-06**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**NINA IPAVEC, dr. med.**

**RAZLIKE U REGULACIJSKIM T LIMFOCITIMA I MONOCITIMA  
OSOBA S PRIMARNO PROGRESIVNOM MULTIPLOM  
SKLEROZOM LIJEČENIH OCRELIZUMABOM TE  
ONIH KOJI NE PRISTAJU NA LIJEČENJE**

**DOKTORSKI RAD**

**Mentorica: izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić**

**Split, 2025.**

## **Zahvala**

*Hvala u prvom redu mojoj prekrasnoj mentorici, sad već i prijateljici, Nikolini što me je vodila kroz ovo iskustvo uvijek s osmijehom na licu, čak i trenucima kada je bilo teško.*

*Hvala kolegici Lei Kusturi što me je upoznala s mentoricom i bila sa mnom tijekom pisanja doktorata i općenito u svim životnim situacijama.*

*Hvala i prof. Aniti Markotić i dr.sc. Maji Rogić Vidaković na pomoći i konstruktivnim savjetima.*

*Hvala i svim suradnicima koji su omogućili objavljivanje rada na kojem se temelji ovaj doktorat.*

*Hvala Juliji Pušić i Ines Matutinović na brzom i efikasnom rješavanju situacija za koje sam mislila da su nerješive.*

*Na koncu hvala i mojoj obitelji. Pogotovo mome sinu Maximu radi kojeg sam se i odlučila na ovu pustolovinu.*

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1. Multipla skleroza .....                                      | 2  |
| 1.1. Epidemiologija .....                                       | 2  |
| 1.2. Etiologija .....   | 2  |
| 1.3. Klinički oblici.....                                       | 4  |
| 1.3.1. RIS .....  | 4  |
| 1.3.2. CIS.....   | 4  |
| 1.3.3. RRMS .....   | 5  |
| 1.3.4. SPMS .....   | 5  |
| 1.3.5. PPMS .....   | 6  |
| 1.4. Dijagnoza PPMS .....                                       | 6  |
| 1.5. Liječenje-ocrelizumab .....                                | 7  |
| 1.6. Imunopatologija .....                                      | 9  |
| 1.7. Treg.....  | 12 |
| 1.7.1. CD25.....  | 13 |
| 1.7.2. FOXP3 .....  | 14 |
| 1.7.3. CTLA-4 .....   | 15 |
| 1.7.4. Supresijsko djelovanje Treg-a .....                      | 16 |
| 1.8. Monociti .....   | 17 |
| 1.8.1. Klasični, intermedijarni i neklasični monociti u MS..... | 19 |
| 1.8.2. CD192 (CCR2) .....                                       | 20 |
| 1.8.3. CD40.....  | 21 |
| 1.9. Neurofilamenti .....                                       | 21 |
| 2. CILJEVI I HIPOTEZE .....                                     | 24 |
| A. 2.1. Ciljevi istraživanja na Treg stanicama.....             | 25 |
| A. 2.2. Hipoteze istraživanja na Treg stanicama .....           | 25 |
| B. 2.1. Ciljevi istraživanja na subpopulacijama monocita .....  | 25 |
| B. 2.2. Hipoteze istraživanja na subpopulacijama monocita.....  | 25 |
| C. 2.1. Ciljevi istraživanja na neurofilamentima.....           | 25 |
| C. 2.2. Hipoteze istraživanja na neurofilamentima .....         | 25 |

|  |    |
|--|----|
| 3. MATERIJALI I METODE   | 26 |
| 3.1. Ispitanici  | 27 |
| 3.1.1 Kliničke procjene mjere bolesti                                    | 28 |
| 3.2. Uzorci krvi   | 29 |
| 3.3. Protočna citometrija  | 30 |
| 3.3.1. Analiza podataka protočne citometrije                             | 30 |
| 3.4. Određivanje neurofilamenata   | 30 |
| 3.4.1. Analiza podataka za neurofilamente                                | 31 |
| 3.5. Dijagram tijeka istraživanja  | 32 |
| 3.6. Statistički postupci  | 33 |
| 4. REZULTATI   | 34 |
| 4.1. Rezultati ispitivanja na limfocitnim stanicama                      | 35 |
| 4.2. Rezultati ispitivanja na monocitnim stanicama                       | 39 |
| 4.3. Rezultati ispitivanja koncentracije sNfL                            | 44 |
| 5. RASPRAVA  | 46 |
| 5.1. Treg stanice PPMS ispitanika i zdravih kontrola                     | 47 |
| 5.2. Razlika monocitnih subpopulacija PPMS ispitanika i zdravih kontrola | 50 |
| 5.3. Neurofilamenti PPMS ispitanika                                      | 52 |
| 6. ZAKLJUČCI   | 55 |
| 7. LITERATURA  | 57 |
| 8. SAŽETAK   | 82 |
| 9. SUMMARY   | 84 |
| 10. ŽIVOTOPIS  | 86 |

## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

AMP- adenzin-monofosfat (engl. *adenosine monophosphate*)

APC- antigen prezentirajuća stanica (engl. *antigen presenting cell*)

ATP- adenzin-trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

Bcl-2- protein kodiran genom „B-cell lymphoma/leukemia-2“, ključni regulator apoptoze, otkriven pri istraživanju non-Hodgkinova limfoma B-stanica (engl. *Bcell Leukemia 2*)

BMI- indeks tjelesne mase (engl. *body mass indeks*)

Camp- ciklički adenzin-monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*)

CCL- kemokinski ligand (engl. *chemokine (C-C motif) ligand*)

CCN3- (engl. *cellular communication network factor 3*)

CCR- kemokinski receptor (engl. *C-C chemokine receptor*)

CD- klaster diferencijacije (engl. *cluster of differentiation*)

CIS- klinički izolirani sindrom (engl. *clinically isolated syndrome*)

CMP zajednička mijeloidna progenitorska stanica (engl. *common myeloid progenitor*)

CSF cerebrospinalna tekućina (engl. *cerebrospinal fluid*)

CTLA-4- citotoksični Tlimfocitni antigen 4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*)

CXCL13- kemokinski C-X-C ligand 13 (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 13*)

DC- dendritičke stanice (engl. *dendritic cells*)

DMT- terapija koja mijenja tijek bolesti (engl. *disease modifying therapy*)

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

EAE- eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (engl. *experimental autoimmune encephalomyelitis*)

EBNA1- antigen jezgre Epstein-Barr virusa 1 (engl. *Epstein–Barr nuclear antigen 1*)

EBV- Epstein-Barr virus

FOXP3- sekvenca viljuške P3 (engl. *forhead box protein 3*)

GITR -(engl. *Glucocorticoid-Induced TNFR-Related*)

GMP- granulocitno-monocitni progenitor (engl. *granulocyte-monocyte progenitor*)

HLA -ljudski leukocitni antigen (engl. *human leukocyte antigen*)

HZJZ- Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IDO- indoleamin-2,3-dioksigenaze

IgG- imunoglobulin G

IgM- imunoglobulin M

IL-2R $\alpha$ - Alpha receptor za interleukin 2

IL-7R $\alpha$ - podjedinica alfa receptora interleukina-7

IFN $\gamma$ - interferon gama

IPEX- X vezana imunodisregulacijska poliendokrinopatija i neuropatija (engl. *immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*)

iTreg- in vitro Treg

JAK- Janus kinaza

mAb- monoklonsko protutijelo (engl. *monoclonal antibody*)

MHC- glavni kompleks tkivne hispokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

MRI- magnetska rezonanca (engl. *magnetic resonance imaging*)

MS- multipla skleroza

*NEFH*- gen za teški lanac neurofilamenta

*NEFL*- gen za laki lanac neurofilamenta

NfH- teški lanac neurofilamenta (engl. *neurofilament heavy*)

NfL- laki lanac neurofilamenta (engl. *neurofilament light*)



NfM- srednji lanac neurofilamenta (engl. *neurofilament medium*)

OCB- oligoklonalna vrpca (engl. *oligoclonal band*)

OPERA- kliničko ispitivanje ocrelizumaba u usporedbi s interferonom  $\beta$ -1a

OX40- receptor čimbenika rasta tumorske nekroze 4 (CD134) (engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 (OX40) (CD134)*)

PPMS- primarno progresivna multipla skleroza

pTreg- periferno inducirani Treg (engl. *peripherally induced Treg*)

RIS- radiološki izolirani sindrom (engl. *radiologically isolated syndrome*)

ROS- reaktivni kisikovi oblici (engl. *reactive oxygen species*)

RRMS- relaps remitentna multipla skleroza

S100- grupa regulatornih proteina kojih ima najviše u stanicama SŽS te u stanicama melanoma

SLE- sistemski lupus eritematosus

SPMS- sekundarno progresivna multipla skleroza

STAT- signalni pretvarač i aktivator transkripcije (engl. *signal transducer and activator of transcription*)

SŽS- središnji živčani sustav

Tc17- CD8 T stanice koje proizvode IL-17

Tconv- T konvencionalne stanice (engl. *T conventional cells*)

TCR- T stanični receptor (engl. *T cell receptor*)

TGF- $\beta$ - transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* )

Th- T pomoćničke stanice (engl. *T helper*)

TLR- receptor sličan Toll-u (engl. *Toll-like receptor*)

TNF $\alpha$ - čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* )

TNFR- receptor čimbenika tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor receptor*)

Treg- Regulacijski T limfociti

TregP- prekursor Treg stanica

tTreg- Treg porijeklom iz timusa (engl. *thymus-derived Treg*)

UVB- utraljubičasto zračenje B (engl. *ultraviolet (UV)B*)

VCAM-1- vaskularna adhezijska stanična molekula 1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*)

VEP- vizualni evocirani potencijali

VLA-4- (engl. *very late antigen-4*)

Y392- tirozin 392

Y510- tirozin 510

## **1. UVOD**

## 1. Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je demijelinizacijska bolest koja dovodi do progresivne neurodegeneracije (1), ujedno je i najčešća netraumatska bolest koja dovodi do invaliditeta (2). Iako se smatra da MS nastaje radi genetskih i okolišnih čimbenika, pravi uzrok još nije otkriven. U zadnje vrijeme se uočava porast incidencije i prevalencije u razvijenim i nerazvijenim zemljama (3), razlog ovog porasta je nejasan. Patogeneza MS je iznimno kompleksna i nedovoljno istražena, a glavni uzrok MS je upala koja dovodi do neurodegeneracije.

### 1.1. Epidemiologija

Kod MS se uočava veliki okolišni utjecaj: incidencija i prevalencija rastu kod populacija koje su udaljenije od ekvatora (4). U subsaharskim predjelima Afrike i istočne Azije prevalencija multiple skleroze se procjenjuje na 2.1 do 2.2 /100 000, dok je u Sjevernoj Americi 140/100 000, a u Europi 108/100 000 (5). U Hrvatskoj je prevalencija 2018. godine iznosila 143.8/100 000 što je svrstava među zemlje s iznimno jakom prevalencijom (većom od 100/100 000 stanovnika) (6). Prema zadnjem istraživanju HZJZ iz 2020. godine u okviru EU-projekta *Morbidity statistics* u Hrvatskoj su oboljele 7024 osobe (7).

Multipla skleroza se najčešće javlja između 20-40 godine života (8). Kao i kod drugih autoimunih i neurodegenerativnih bolesti, MS se češće javlja kod žena (9-11). Iako žene oboljevaju češće, muškarci u prosjeku oboljevaju kasnije od žena, skloniji su težim oblicima i bržoj progresiji bolesti te češće razvijaju progresivni oblik MS (12,13). Smatra se da su ove razlike povezane sa spolnim kromosomima i endogenim spolnim hormonima koje utječu na imunološki sustav i samim time na težinu bolesti. Estrogeni i prolaktin pospješuju humoralnu imunost, dok testosteron i progesteron djeluju kao prirodni imunosupresori (14).

### 1.2. Etiologija

Iako se zna da je MS rezultat kompleksne interakcije genetskih i okolišnih faktora, etiologija je još uvijek samo djelomično razjašnjena. Sunčeva svjetlost (UVB), Epstein - Barr virus pušenje i vitamin D u kombinaciji s genetskim čimbenicima igraju veliku ulogu u nastanku MS-a (15). Glavni genetski čimbenik povezan s rizikom za MS je HLA-DRB1\*15 i/ili drugi lokusi u

snažnom genetskom vezanju s ovim alelom. Heterozigoti za HLA-DRB1\*15:01 imaju omjer rizika za MS veći od 3, dok je taj omjer kod homozigota veći od 6, no mehanizam ovog utjecaja još uvijek ostaje nepoznat (16). Pretpostavlja se da je uloga HLA-DRB1\*15:01 u prezentaciji antigena, međutim to ne objašnjava zaštitne učinke alela klase 1 (npr. HLA-A\*02:01) (17). Nadalje, brojne studije su otkrile preko 150 pojedinačnih polimorfizama nukleotida koji su povezani s MS (18). Uočena je snažna genetska komponenta i kod istraživanja blizanaca gdje su monozigotni blizanci imali 25% veći rizik za MS dok su dizigotni imali 5.4% veći rizik od bolesti (19).

Epstein-Barr virus (EBV) je virus koji transformira B stanice, no unatoč tome uspostavlja benignu, doživotnu latentnu infekciju u memorijskim B stanicama u mirovanju kod  $\geq 90\%$  ljudske populacije diljem svijeta (20). Simptomatska infekcija, infektivna mononukleoza, udvostručava šanse za obolijevanjem od MS (21). Infekcija tijekom adolescencije ili kasnije povećava rizik za obolijevanje, što nije slučaj s preboljenjem infekcije u djetinjstvu (22). Levin i suradnici su dokazali da su pojedinci koji su bili EBNA1 negativni imali serološku konverziju prije početka MS (23). Najraširenija teorija kako EBV pridonosi razvoju MS-a je „molekularna mimikrija“ pri kojoj dijelovi virusa potiču autoimuni odgovor koji reagira s komponentama središnjeg živčanog sustava (SŽS) ili čak izravni imunološki napad na virus koji kolateralno oštećuje SŽS.

Imunološke posljedice cigaretnog dima imaju dva odvojena učinka: uspostavu upalnog okruženja i stimulaciju autoreaktivnih limfocita (24). Osim što pušenje povećava rizik za oko 1,5 puta (25), postoji i povezanost s efektom doze, gdje su kumulativne doze pušenja povezane s većim rizikom.

Pošto je UVB zračenje potrebno za konverziju vitamina D, teško je razlučiti efekt vitamina D od UV zračenja i obrnuto. Povećano izlaganje UVB zračenju povezano je s manjim rizikom za MS (26). Tome u prilog ide i već spomenuta manja prevalencija i incidencija zemalja bliže ekvatoru zbog veće izloženosti UVB zračenju. Munger i suradnici su dokazali smanjeni rizik od MS-a kod povećane razine vitamina D, pogotovo kod osoba mlađih od 20 godina (27). Smatra se da aktivna forma vitamina D djeluje na limfocitnu aktivaciju i proliferaciju, diferencijaciju T-pomoćnih stanica, produkciju specifičnih antitijela i regulaciju imunog odgovora. Adolescentna pretilost također pogoduje nastanku MS (28), a povećan BMI većem stupnju invaliditeta u MS (29) te smanjenim odgovorom na terapiju IFN- $\beta$  (30). Smatra se da pretilost povećava rizik za MS

na tri načina: kroničnom upalom (povećane količine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), endokrinom promjenom (poremećena sekrecija adipokina) i promjenama u crijevnom mikrobiomu (31).

### **1.3. Klinički oblici**

U kliničke oblike MS-a spadaju dva primarna oblika; relapsno-remitirajuća (RRMS) i primarno progresivna (PPMS) te sekundarno progresivna (SPMS) multipla skleroza koja nastaje iz RRMS progresijom bolesti. Oko 85% slučajeva MS se prezentira kao RRMS dok se ostalih 10-15% prezentira kao PPMS. Postoje još i dvije forme koje prethode MS, a to su radiološki izolirani sindrom (RIS) i klinički izolirani sindrom (CIS).

#### **1.3.1. RIS**

Iako se službeno ne smatra kao oblik MS, radiološki izolirani sindrom (RIS) se može okarakterizirati kao pretklinički stadij MS. RIS se identificira se slučajnim otkrićem T2 hiperintenzivnih žarišta u bijeloj tvari SŽŠ na magnetskoj rezonanci (MRI), koja pokazuju morfološke i prostorne karakteristike tipične za MS, ali bez kliničke simptomatologije povezane s upalnom demijelinizacijom (32). Lebrun i suradnici su u velikoj multinacionalnoj studiji dokazali da se u periodu od 5 godina oko 1/3 RIS-a konvertira u MS, dok ih se više od polovice konvertira u MS u periodu od 10 godina, s tim da ih se oko 12% konvertira u PPMS (33). Povećan rizik za konverziju u MS imaju muškarci i osobe mlađe životne dobi (34). Prisutnost infratentorijskih i/ili lezija u leđnoj moždini na početku i/ili lezija koje pojačavaju gadolinij (Gd<sup>+</sup>) bilo na početku ili tijekom praćenja na MRI, upućuju na subkliničku MS i snažno su povezane s povećanim rizikom od progresije bolesti (35).

Prisutnost oligoklonskih vrpca (OCB) u cerebrospinalnom likvoru (CSF), kognitivni poremećaji, visoko opterećenje T2 hiperintenzivnim lezijama, dokazi o diseminaciji u vremenu na magnetskoj rezonanci (MRI) te demijelinizacija vidnog živca otkrivena vidnim evociranim potencijalima, također upućuju na subkliničku MS (35).

#### **1.3.2. CIS**

Pojam CIS (klinički izolirani sindrom) opisuje prvi klinički događaj koji upućuje na demijelinizacijsku bolest SŽS, ali još ne ispunjava kriterije diseminacije u vremenu za dijagnozu MS. Simptomi se obično manifestiraju monofokalno, razvijaju se akutno ili subakutno tijekom nekoliko dana do tjedana te tipično zahvaćaju vidni živac (optički neuritis), leđnu moždinu

(transverzalni mijelitis), moždano deblo ili mali mozak, iako se mogu prezentirati i multifokalno. Epizoda obično traje najmanje 24 sata i javlja se u odsutnosti povišene temperature ili infekcije (35).

Većina pacijenata s CIS-om (50%–70%) ima asimptomatske T2 abnormalnosti bijele tvari na početnom MRI-u mozga, što odgovara s demijelinizacijskim lezijama. Prediktivna uloga ovog nalaza u pogledu konverzije u MS potvrđena je u brojnim dugoročnim studijama, koje su pokazale do 80% stopu konverzije tijekom razdoblja praćenja do 20 godina. Rizik od konverzije u MS također je povezan s brojem lezija (36), nalazom oligoklonalnih IgG vrpca u likvoru (37) te evociranim potencijalima (38).

### **1.3.3. RRMS**

Najčešći fenotip multiple skleroze, koji se nalazi kod otprilike 85% pacijenata, je relapsno-remitentna multipla skleroza (RRMS). Ona je karakterizirana naizmjeničnim razdobljima neurološke disfunkcije-relapsima i razdobljima relativne kliničke stabilnosti bez novih neuroloških simptoma-remisijama. Tijekom relapsa mogu biti prisutni različiti neurološki simptomi, poput slabosti, smanjenja vidne oštine, dvoslike, promijenjenog osjeta, poremećaja ravnoteže, ataksija i smetnje mokrenja. Svi ovi simptomi traju najmanje 24 sata u odsutnosti infekcije ili metaboličkih poremećaja (39). Relapsi rezultiraju zaostalim deficitima u gotovo polovici epizoda, što dovodi do postupnog nakupljanja oštećenja (40).

### **1.3.4. SPMS**

SPMS se razvija tijekom vremena iz RRMS. Prosječno vrijeme prelaska iz RRMS u SPMS je 19 godina (41). Veći rizik za brže razvijanje SSPM imaju muški spol, kasnija životna dob početka prvih simptoma te učestaliji relapsi u prve dvije godine dijagnoze (42). Prijelaz iz RRMS u SPMS obično se dijagnosticira retrospektivno, gdje se uočava postupno pogoršanje nakon početne relapsno-remitentne faze. Ova progresija obilježena je kontinuiranim neurološkim propadanjem koje se događa neovisno o akutnim relapsima. Pojam "progresija bolesti" u SPMS-u odnosi se na kontinuirano pogoršanje neurološkog stanja koje traje kroz dulje vremensko razdoblje, traje najmanje šest do dvanaest mjeseci (43).

### **1.3.5. PPMS**

Oko 10-15% MS pacijenata boluje od primarno progresivne multiple skleroze. PPMS je karakterizirana kontinuiranim propadanjem neuroloških funkcija od samog početka bolesti, bez faza remisije, s eventualnim fazama stabilnosti bolesti (44). PPMS je uvelike slična SPMS i od nje se razlikuje samo time što joj ne prethodi faza s relapsima (39). PPMS se ne javlja predominantno kod žena kao što je to slučaj kod RRMS. Karakterizira je i kasniji početak bolesti, s vrhuncem u petom i šestom desetljeću života, što se preklapa s dijagnozom SPMS. PPMS se javlja jednako u muškaraca i žena 1:1, a početak bolesti se događa kasnije, najčešće iza 40 godine života (45).

Progresivna forma bolesti može biti aktivna ili neaktivna (klinički relapsi ili MRI dokazi o novim, povećanim ili pojačanim lezijama, dokaz upalne aktivnosti) te s kliničkom progresijom ili bez nje (pogoršanje neurološke onesposobljenosti) (46). Određivanje progresije može se temeljiti na pogoršanju koje prijavljuju pacijenti, promjenama na neurološkom pregledu ili pogoršanju na testovima neuroloških funkcija (47).

### **1.4. Dijagnoza PPMS**

Dijagnoza progresivne multiple skleroze obično se postavlja retrospektivno nakon određenog vremenskog tijeka bolesti, kako kod inicijalne prezentacije u PPMS, tako i kod reklasifikacije pacijenta s RRMS u SPMS (48,49). Važno je i isključiti bolesti koje mogu oponašati PPMS uključuju kompresivnu mijelopatiju, neurosarkoidozu, infekcije središnjeg živčanog sustava, sustavne upalne poremećaje (SLE, Sjorgenov sindrom, antifosfolipidni sindrom), bolesti prednjeg roga kralježnične moždine, subakutnu kombiniranu degeneraciju, adrenomijeloneuropatiju i mitohondrijske bolesti i drugo (50).

Za postavljanje dijagnoze MS se koriste revidirani McDonaldovi kriteriji iz 2017. godine. Oni se temelje na diseminaciji u vremenu i diseminaciji u prostoru, praćeni nalazom MRI, kliničkim nalazom, pretragom CSF na oligoklonalne vrpce te isključivanjem drugih dijagnoza.



**Tablica 1.** McDonaldovi kriteriji iz 2017. god. za PPMS

|  |
|--|
| • 1 godina progresije oštećenja (utvrđena retrospektivno ili prospektivno) neovisno o kliničkom relapsu  |
| <b>Plus još dva od sljedećih kriterija:</b>  |
| • jedna ili više T2-hiperintenzivnih lezija* karakterističnih za multiplu sklerozu u jednom ili više sljedećih regija mozga: periventrikularno, kortikalno ili jukstakortikalno, ili infratentorijalno |
| • dva ili više T2- hiperintenzivnih lezija* u kralježničkoj moždini  |
| • prisutnost specifičnih oligoklonalnih vrpca u cerebrospinalnom likvoru   |
| <i>* Za razliku od kriterija iz 2010., nije potrebno razlikovati simptomatske i asimptomatske MRI lezije</i>   |

### **1.5. Liječenje-ocrelizumab**

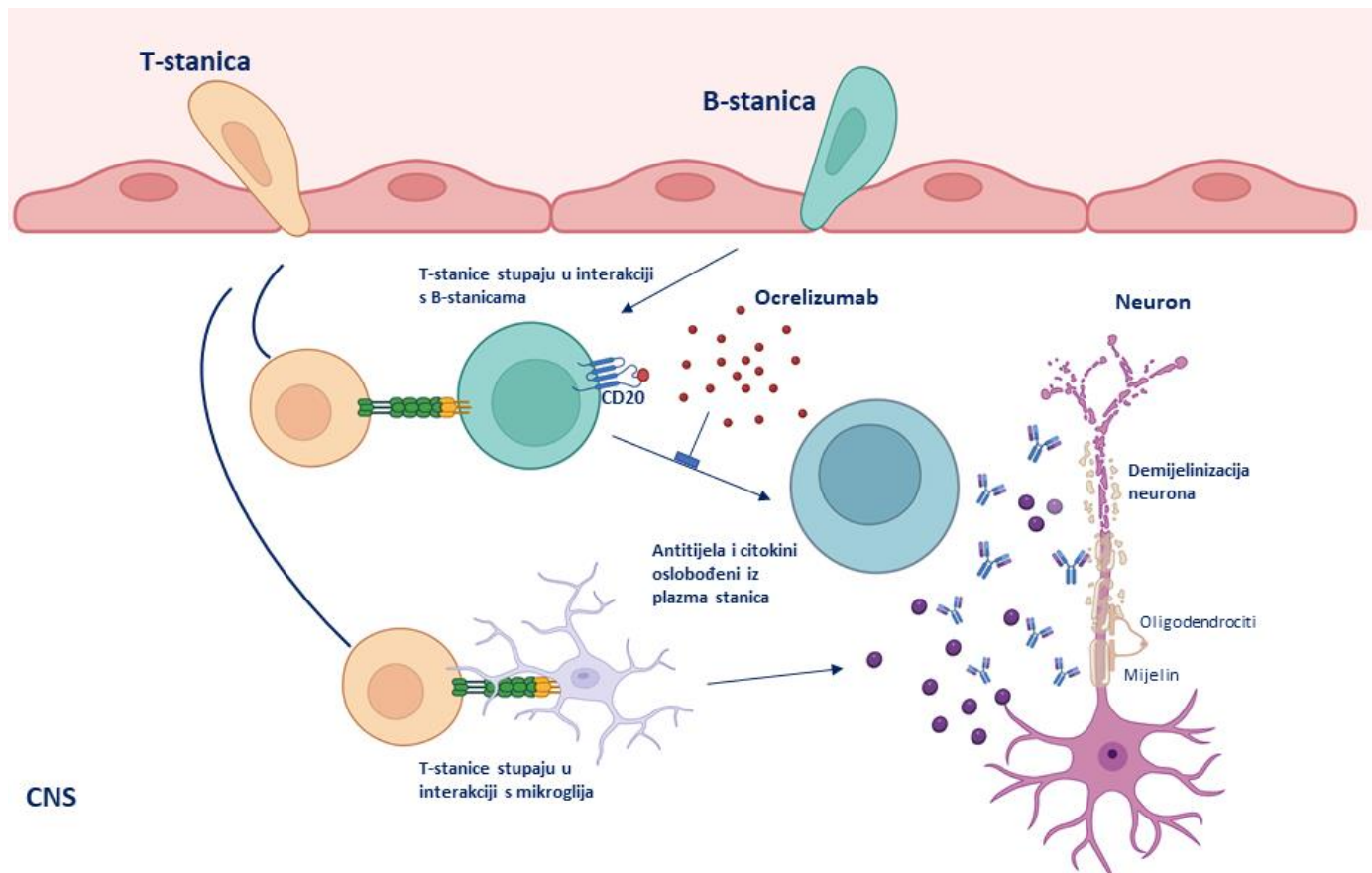
Ocrelizumab je rekombinantno humanizirano anti-CD20 IgG1 monoklonsko protutijelo koje se koristi za liječenje odraslih bolesnika s RRMS i odraslih bolesnika s PPMS. Za razliku od rituksimaba, koji je kimerično monoklonsko antitijelo (mAb), ocrelizumab je humanizirano mAb pa je stoga manje imunogeničan od rituksimaba, što dovodi do manjeg formiranja neutralizirajućih autoprotutijela i potencijalno veće učinkovitosti (51,52).

CD20 je transmembranski protein koji funkcionira kao kalcijev kanal, čija je uloga B stanična aktivacija i proliferacija (53). CD20 se nalazi na većini ljudskih B stanica (Slika 1), ali ne i na matičnim stanicama, pro-B stanicama ili diferenciranim plazma stanicama (54). Mala podskupina T stanica također eksprimira CD20 (55). Stoga ocrelizumab selektivno uklanja B stanice koje ekspimiraju CD20, međutim ne utječe na rekonstrukciju B stanica i postojeću humoralnu imunost, te prirodnu/urođenu imunost i ukupni broj T stanica (56,57). Deplecija B stanica inducirana ocrelizumabom provodi se više putem citotoksičnosti ovisne o antitijelima nego citotoksičnosti ovisne o komplementu u usporedbi s rituksimabom (58).

Zbog značajnog preklapanja u ekspresiji CD20 i CD19 od pre-B stanica do memorijskih B limfocita, broj CD19 stanica koristi se za procjenu deplecije i repopulacije B stanica (59). Primjena

ocrelizumaba dovodi do brze i gotovo potpune deplecije perifernih CD19 (99%) stanica unutar 2 tjedna. Deplecija se održava tijekom vremena od 24 tjedna (60).

Američka agencija za hranu i lijekove FDA (engl. *Food and Drug administration*) je odobrila ocrelizumab za liječenje RRMS i PPMS u ožujku 2017. godine, a Europska agencija za lijekove u siječnju 2018. godine. Ocrelizumab smanjuje progresiju kliničkog oštećenja za oko 25% i poboljšava kliničke i MRI pokazatelje upale i degeneracije kod RRMS i PPMS pacijenata (61).



**Slika 1.** Djelovanje ocrelizumaba, anti-CD20 protutijela, u MS.

Noviji koncept nastanka multiple skleroze navodi da su relapsi i remisije, karakteristični za RRMS, uzrokovani upalnim procesom koji pokreću autoreaktivne efektorske T stanice, dok je progresija invaliditeta bez remisije, karakteristična za SPMS i PPMS, rezultat neurodegenerativnog procesa pokrenutog disfunkcijom urođenog imunološkog sustava i B stanica (62). Stoga je deplecija B stanica vrlo važna za suzbijanje upale kod MS. Naime, ove stanice su

"loše" jer mogu izlučivati citokine, selektivno prezentirati antigene T stanicama te zajedno s plazma stanicama proizvoditi antitijela (63). Štoviše, limfoidni folikuli u moždanim ovojnicama mogli bi biti povezani s kortikalnom demijelinizacijom i gubitkom aksona (64).

Preliminarna analiza krvi iz skupine sudionika u ispitivanju OPERA I (kliničko ispitivanje ocrelizumaba u usporedbi s interferonom  $\beta$ -1a) pokazala je da se mali broj B stanica i dalje može otkriti u perifernoj cirkulaciji nakon liječenja ocrelizumabom (65). CD20+ T stanice također su učinkovito depletirane uz B stanice što sugerira da klinička učinkovitost ocrelizumaba možda nije posredovana samo učincima na B stanice (66). Longitudinalna analiza CSF prije i nakon liječenja ocrelizumabom pokazuje smanjenje razine B stanica, T stanica i CXCL13 u CSF (67). Iako plazma stanice nisu izravno ciljane ocrelizumabom, podaci iz ključnih ispitivanja ocrelizumaba i njihovih produžetaka otkrivaju da, kao i kod rituksimaba, razine imunoglobulina mogu biti smanjene tijekom dugotrajnog liječenja (prosječno 5,5 godina) te bi mogle biti povezane s ozbiljnim infekcijama, osobito ako su razine IgG niske (68); što zahtijeva daljnje istraživanje.

Mehanizmi koji posreduju u kliničkim učincima ocrelizumaba kod PPMS su nepoznati, posebno s obzirom na to da su mnogi drugi terapijski pristupi podbacili u ovom obliku bolesti. Većina spekulacija fokusirana je na mogućnost da deplecija CD20+ B stanica i T stanica može ublažiti "tinjajuću" upalnu aktivnost kod PPMS-a. Međutim, neki istraživači sugeriraju da mehanizmi nisu samo protuupalni, već također uključuju smanjenje neurotoksičnih faktora koje proizvode B stanice (69).

Ocrelizumab je još uvijek jedina odobrena terapija koja mijenja tijek bolesti za primarno progresivnu MS.

## **1.6. Imunopatologija**

MS je rezultat kompliciranih i isprepletenih zbivanja u imunološkom sustavu. Iako se na početku smatralo da je MS autoimuna bolest posredovana T limfocitima, u zadnje vrijeme se uočava i veliki doprinos B stanica i mijeloidnih stanica samoj patogenezi bolesti.

Smatra se da je inicijalni korak u nastanku MS invazija autoreaktivnih CD4+ T stanica koje zaobilaze negativnu selekciju i klonalnu eliminaciju te kompromitiraju krvno moždanu barijeru da bi ušle u SŽS i započele privlačenje drugih inflamatornih stanica uključujući mikrogliju, makrofage i B stanice. Ova kaskada dovodi do proizvodnje protutijela i otpuštanja proupalnih citokina što na koncu dovodi do oštećenja mijelinske ovojnice (70-72).

U prilog teoriji da je MS uzrokovana T stanicama ide i činjenica da je povećan rizik povezan s genima koji su potrebni za diferencijaciju patoloških T staničnih podvrsta ili modulaciju njihovih efektorskih funkcija (mutacije u genima *IL-2RA* and *IL-7RA*) (73). Smatra se da su glavna meta autoreaktivnih T stanica antigeni mijelina kao što su bazični mijelinski protein, proteolipidni protein i mijelinski oligodendrocitni protein. Iako navedene antigene prepoznaju cirkulirajuće CD4<sup>+</sup> T stanice u osoba oboljelih od MS, isto se događa i kod zdravih osoba stoga se smatra da postoje razlike u broju i aviditetu ovih stanica između zdravih osoba i onih oboljelih od MS (74,75). Kod zdravih osoba regulatorni mehanizmi poput Treg stanica zadržavaju autoreaktivne T stanice pod kontrolom dok je kod oboljelih taj mehanizam poremećen (76). Prisustvo IgM OCB povezano je s aktivnom upalom u PPMS (77).

MS je posredovana Th1 stanicama dok Th2 stanice koje luče IL4 imaju modulatornu i protektivnu ulogu. Pomagački T limfociti Th1 uključeni su u upalne procese prilikom odgovora na unutarstanične patogene i odgođene reakcije preosjetljivosti. Važni su za borbu protiv unutarstaničnih patogena te luče IL-2, IFN- $\gamma$  i druge citokine kao što su TNF, limfotoksin i GM-CSF. IFN- $\gamma$  je snažan proupalni citokin koji ima brojne uloge uključujući povećanje ekspresije TLR receptora na stanicama urođene imunosti i gena za MHC-I i MHC-II koji su važni za predočavanje antigena, indukciju sekrecije kemokina, aktivaciju makrofaga i povećanu fagocitozu.

Pomagački T limfociti Th2 imaju ulogu kod obrane od unutarstaničnih parazita te kod alergijskih reakcija. Th2 stanice luče IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 i IL-10. IL-4 je važan za preživljenje limfocita, potiče diferencijaciju B stanica u plazma stanice i prekapčanje imunoglobulina IgG u IgE. Također potiče diferencijaciju i sazrijevanje DC (od engl. *Dendritic cells*) iz matičnih stanica. Receptor za IL-4 nalazi se na monocitima i makrofazima te vezanjem IL-4 za receptor dolazi do aktivacije makrofaga kod obrane protiv parazita. Th2 stanice se smatraju protuupalnima u kontekstu autoimunih bolesti zbog mogućnosti supresije Th1 odgovora pošto ga antagoniziraju. U lezijama SŽS-a u EAE (eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis) modelu nađen je povećan broj Th1 stanica te povećane koncentracije citokina koje luče – IFN- $\gamma$  (78, 79). Također je IFN- $\gamma$  nađen i u aktivnim lezijama ljudi oboljelih od MS (80). Th1 stanice ekspimiraju i  $\alpha_4\beta_1$  integrin VLA-4 koji im omogućuje prelazak u CNS putem interakcije s VCAM-1 (81). Blokiranje VLA-4 natalizumabom koji je anti-  $\alpha_4\beta_1$ -integrin protutijelo je iznimno učinkovita terapija kod početka MS što dokazuje ključnu ulogu Th1 stanica u RRMS (82).

Th 17 stanice također igraju važnu ulogu u nastanku MS-a. Th17 pomagački T limfociti javljaju se kao odgovor na izvanstanične bakterije i gljivice te luče velike količine IL-17 koji potiče sintezu upalnih kemokina i vezuje se za brojna upalna stanja i autoimune procese. RRMS pacijenti i pacijenti s aktivnom bolesti imaju više razine IL-17 u krvi i aktivnim lezijama, kojeg proizvode Th17 stanice (83,84). Th17 stanice MS pacijenata imaju iznimno patogeni fenotip, s visokom ekspresijom kostimulatornih molekula i visokom otpornošću na supresiju (85).

Treg stanice su regulatorne stanice i kao takve su glavni čuvari imune homeostaze. Deplecija Treg stanica u EAE modelu uzrokuje pogoršanje simptoma, dok adoptivni transfer uzrokuje poboljšanje simptoma (86). Treg stanice funkcijski su promijenjene u brojnim autoimunim bolestima uključujući i MS (87).

B stanice djeluju kao antigen prezentirajuće stanice T stanicama te proizvode proupalne (IL-6, IFN- $\gamma$  i TNF $\alpha$ ) i protuupalne citokine (IL-10, IL35, TGF $\beta$ ) te na taj način reguliraju imune procese (88). Izolirane B stanice neliječenih ljudi s MS-om imaju manju sekreciju IL10 i drugih protuupalnih citokina, a povećanu sekreciju proupalnih citokina koji induciraju diferencijaciju Th1 i Th17 stanica te inhibiraju Treg stanice (89). Iz ovih stanica nastaju zrele plazma stanice koje proizvode protutijela. B stanice sudjeluju u patogenezi putem brojnih mehanizama, uključujući učinke ovisne i neovisne o protutijelima. B stanice pridonose bolesti diferencijacijom u plazma stanice koje proizvode protutijela nakon kontakta s T stanicama i rezultirajuće aktivacije B stanica što potkrepljuje nalaz oligoklonalnih vrpci (OCB) u cerebrospinalnom likvoru bolesnika s MS-om. OCB nastaju kao rezultat povećane proizvodnje imunoglobulina IgG i IgM od strane B stanica koje su diferencirane u plazma stanice i predstavljaju dijagnostički znak kod MS-a (90).

Osim T i B limfocita mijeloidne stanice su isto važne u patogenezi MS, a uključuju monocite, makrofage i mikrogliju. Proinflamatorni monociti koji luče IL-6 i IL-12 su povećani kod neliječenih osoba s MS u odnosu na zdrave kontrole (91).

Koncept imunopatologije MS sugerira neravnotežu proupalnih Th1 i Th17 stanica te defektne Treg u perifernom sustavu. Ova neravnoteža uključuje izravnu (kontakt između stanica) ili neizravnu (pojačano izlučivanje proupalnih citokina) interakciju s antigen-prezentirajućim stanicama, uključujući makrofage, dendritičke stanice i B stanice, što dodatno jača koncept da različite vrste stanica djeluju zajednički tijekom imunopatologije MS-a. Karakteristično patološko obilježje MS su perivenularne upalne lezije koje uzrokuju demijelinizacijske plakove (92).

Upalni infiltrati sadrže T limfocite, pri čemu prevladavaju CD8+ T stanice; B stanice i plazma stanice su također prisutne, ali u znatno manjem broju (93). Upala uzrokuje oštećenje oligodendrocita i demijelinizaciju. U ranim fazama bolesti aksoni su uglavnom očuvani, no kako bolest napreduje, dolazi do nepovratnog oštećenja aksona (94).

Kod RRMS dominiraju klasične aktivne lezije s izraženom limfocitnom upalom. One se rjeđe javljaju kod progresivne bolesti, gdje lezije obično imaju neaktivnu jezgru okruženu tankim rubom aktivirane mikroglije i makrofaga (95). Iako postoji klinička razlika između RRMS i PPMS, patološke upalne promjene prisutne su kod obje vrste, i to u većoj mjeri kod relapsno-remitentne bolesti. Sastav upalnog infiltrata u relapsno-remitentnoj i progresivnoj MS je sličan, ali progresivna MS ima veći udio B stanica i plazma stanica (96).

Patološka obilježja MS su upala, demijelinizacija, remijelinizacija i neurodegeneracija koja se događa žarišno ili difuzno u mozgu i kralježničkoj moždini (97). Ove karakteristike su prisutne u svim oblicima MS, iako kod PPMS i SPMS dominira difuzna upala niskog intenziteta, sporo rastuće postojeće lezije i manje propusna krvno moždana barijera u usporedbi s RRMS (98).

### 1.7. Treg

Regulacijski T limfociti (Treg) definiraju se kao CD4+ stanice koje eksprimiraju interleukinski 2 receptor  $\alpha$  lanca (CD25) i transkripcijski faktor Forkhead box protein P3 (FOXP3). Treg eksprimiraju u velikoj količini i CTLA-4 (CD152) citotoksični T limfocitni antigen. Treg su specifična subpopulacija T limfocita koja je ključna za održavanje imunološke homeostaze, održavanja tolerancije na vlastite antigene i sprečavanje autoimunosti (99).

Stecheni imunitet evoluirao je kao moćan obrambeni mehanizam za eliminaciju stranih patogena i mutiranih stanica. Ovaj sustav počiva na širokoj raznolikost repertoara i sposobnosti razlikovanja "vlastitog" od "stranog" (100). T limfociti nastaju u timusu koji omogućava stvaranje raznovrsnih T staničnih receptora (TCR) usmjerenih na strane antigene koji imaju sposobnost eliminacije patogena. Pošto sustav nije u potpunosti savršen, tijekom procesa generiranja toliko raznovrsnog TCR repertoara također dolazi do razvoja autoreaktivnih T limfocita. Većina autoreaktivnih T limfocita eliminiraju se klonalnom delecijom u timusu. Autoreaktivni T limfociti koji izbjegnu klonalnu deleciju mogu izazvati autoimune bolesti, ako nisu kontrolirani regulacijskim mehanizmima. Iako su se razvili različiti mehanizmi za kontrolu autoimunih

odgovora, specijalizirana subpopulacija supresorskih CD4+ T stanica, Treg stanice, igraju posebno važnu ulogu u održavanju imunološke homeostaze. Ova relativno mala populacija, oko 5-10% perifernih CD4+ T stanica odgovorna je za održavanje imunološke homeostaze i ključna je za preživljavanje, normalno funkcioniranje imunološkog sustava (101). Treg stanice su iznimno raznolika populacija s obzirom na TCR repertoar i funkciju. Treg stanice reguliraju brojne fiziološke procese, uključujući majčinsko-fetalni konflikt, toleranciju germinativnih stanica, diferencijaciju matičnih stanica u koži, popravak mišića, homeostazu i funkciju adipocita i upalu mrežnice (102-107).

Treg su funkcijski promijenjeni u brojnim autoimunim bolestima kao što su dijabetes tip 1, psorijaza i psorijatični artritis, miastenija gravis, Guillian-Barre te MS (108). Dijele se na dvije subpopulacije: Treg porijeklom iz timusa (tTreg) i periferno inducirani Treg (pTreg). Prevladavajuća paradigma razvoja tTreg, stanica porijeklom iz timusa, uključuje proces u dva koraka. Prvi korak pokreće snažna TCR stimulacija u razvijajućim CD4 jednostruko-pozitivnim timocitima koja uzrokuje povećanje ekspresije IL-2 receptora visokog afiniteta, CD25, kao i članova TNFR superobitelji GITR, OX40 i TNFR2, čime se generiraju CD25+ FOXP3- prekursori Treg stanica (TregP). Drugi korak pokreće citokinski ovisna konverzija TregP u zrele Treg stanice putem povećanja ekspresije FOXP3. Te CD4+CD25+ FOXP3+ stanice su zrele Treg stanice koje emigriraju iz timusa i posreduju toleranciju (109,110).

pTreg stanice uglavnom nastaju iz naivnih CD4+ T stanica nakon što su stimulirane antigenima u perifernim limfoidnim organima. Nastanak pTreg stanica zahtijeva aktivaciju TCR te prisustvo citokina interleukin-2 (IL-2) i transformirajućeg faktora rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (111). In vitro Treg (iTreg) se mogu uzgojiti iz CD4+FoxP3- stanica oponašajući uvjete za nastajanje pTreg-a (112).

### 1.7.1. CD25

CD25, također poznat kao IL-2R $\alpha$  (interleukin-2 receptor alfa lanac), je visoko izražen na Treg stanicama. IL-2 receptor se sastoji od tri lanca:  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  (CD122), i  $\gamma$ c (CD132) gdje je CD25 ključan za formiranje visokog afiniteta IL-2 receptora što je ključno za učinkovitu signalizaciju (113). CD25 isključivo veže IL-2 i njegova je ekspresija ograničena na rane faze razvoja timocita i na aktivirane zrele T limfocite. Posebno visoke razine CD25 su izražene na CD4+CD25+FOXP3+ Treg stanicama omogućavajući Treg stanicama da odgovore na niske

koncentracije IL-2, što je ključno za održavanje ekspresije FOXP3 te funkciju, preživljavanje stanica i održavanje imunološke tolerancije (114,115).

Stimulacija ekspresije FOXP3 u Treg stanicama određena je IL-2 i događa se putem STAT5-ovisnog mehanizma. Vežanje IL-2 za receptor CD25 dovodi do regrutacije Janus kinaza (JAK) 1 i 3, koje su povežu s  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinicama i fosforiliraju tirozinske ostatke (Y) na njihovim citoplazmatskim repovima. Fosforilacija Y392 i Y510 omogućuje regrutaciju STAT5A i STAT5B, koje također fosforiliraju JAK na specifičnim tirozinskim ostacima. U ovom trenutku, fosforilirane STAT5 (pSTAT5) molekule mogu se dimerizirati i migrirati u jezgru Treg stanica kako bi se vezale za DNK i regulirale transkripciju različitih ciljnih gena uključujući FOXP3 (116).

Visoka ekspresija CD25 na Treg stanicama je povezana s epigenetskom regulacijom, uključujući metilaciju DNK i modifikacije histona. Promotorska regija gena za CD25 (*IL2RA*) u Treg stanicama je demetilirana, što omogućuje stabilnu i visoku ekspresiju CD25. Ova epigenetska regulacija je ključna za održavanje fenotipa i funkcije Treg stanica (117). Nedostatak CD25 vrlo je rijedak autosomno recesivni poremećaj čija se klinička slika uvelike preklapa s IPEX sindromom (od engl. *Immune dysregulation-polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked syndrome*), s povećanom osjetljivošću na virusne, bakterijske i gljivične infekcije. Ovaj poremećaj uzrokovan je mutacijama u *IL2Ra* genu koji kodira  $\alpha$  podjedinicu IL2 receptor kompleksa (118).

### 1.7.2. FOXP3

Forkhead box protein P3 (FOXP3) je član podobitelji transkripcijskih faktora koja sadrži forkhead/winged-helix box protein P, a koja uključuje četiri člana podobitelji: FOXP1, FOXP2, FOXP3 i FOXP4 (119). FOXP3 upravlja genetskim programom razvoja Treg stanica i ključan je za njihov razvoj, funkciju i stabilnost (120).

Kod tTreg stanica ekspresija FOXP3 zahtijeva interakciju TCR visokog aviditeta ili visokog afiniteta s autopeptidima/glavnim histokompatibilnim kompleksom klase II (MHC II) koje prezentiraju timusne APC (121). S druge strane, pTreg nastaju od CD4+FOXP3- T stanica koje su izložene faktorima poput TGF- $\beta$  i IL-2 u perifernim tkivima. Izloženost takvih stanica TGF- $\beta$  i IL-2 dovodi do transkripcije FOXP3 proteina (122).

Mutacije na *foxp3* genu uzrokuju IPEX (imunološka disregulacija, poliendokrinopatija, enteropatija, X-vezani sindrom) kod ljudi, rijetko stanje karakterizirano širokim spektrom autoimunih manifestacija i povezano s odsutnošću Treg stanica (123).

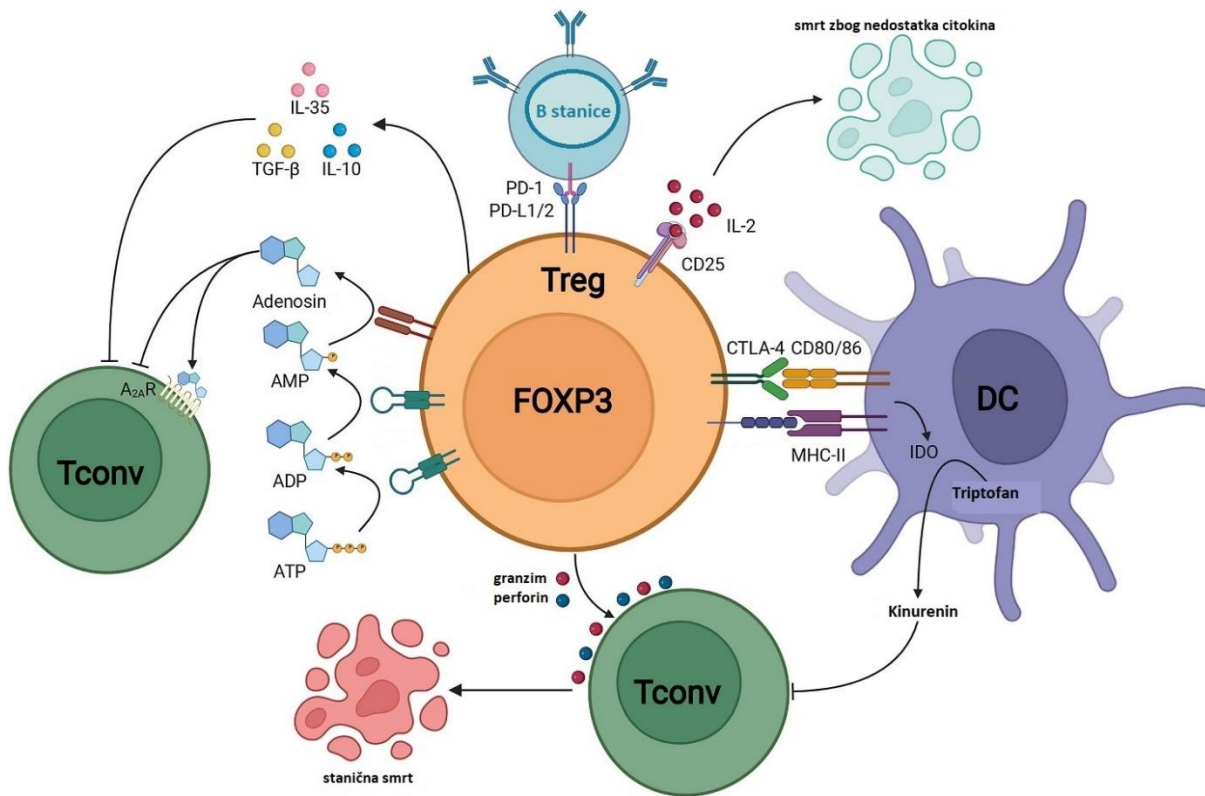


### 1.7.3. CTLA-4

CTLA-4, citotoksični T limfocitni antigen 4, je T stanični koreceptor, također poznat kao CD152. Član je superobitelji imunoglobulina koji je izražen na aktiviranim T stanicama i Treg stanicama te prenosi inhibitorni signal T stanicama. CTLA-4 i CD28 se natječu za molekulu B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86) na antigen prezentirajućim stanicama (APC) (124).

Aktivacija T stanica ovisi o vezanju TCR na specifični antigen prezentiran od strane glavnog histokompatibilnog kompleksa MHC na APC-a. Ovaj korak, prvi aktivacijski signal T stanica, nije dovoljan da uzrokuje aktivaciju T stanica. Za potpunu aktivaciju T stanica potreban je drugi signal nazvan kostimulacija. Drugi signal ostvaruje se preko CD28 receptora na T stanicama, koji se veže za svoj ligand CD80 ili CD86 na APC-ima (125). Aktivacija CD28 stimulira apsorpciju glukoze i napredovanje staničnog ciklusa u T stanicama povećanjem ekspresije anti-apoptotičkih proteina Bcl-X (Bcl-xL) i IL-2 kako bi se smanjila apoptoza i povećala proliferacija T stanica (126,127). Bez CD28 signalizacije, T stanice će ući u klonalnu anergiju i apoptozu (128). Primanjem prvog i drugog aktivacijskog signala, T stanice postaju potpuno aktivirane. Ako antigen patogena uzrokuje ekspanziju određenih T stanica, one će napadati kontaminirane stanice i tkiva na mjestu infekcije. Ako su proliferirane stanice rezultat autoantigena, one će se premjestiti u ciljano tkivo i organe, uzrokovati upalu i oštetiti vlastite stanice, tkiva i organe. CTLA-4 se eksprimira i pomiče na staničnu membranu nakon aktivacije T stanice, preuzima B7 od CD28 i suprimira aktivnost T stanica (129). Koordinacija CTLA-4 i CD28 održava ravnotežu T-staničnog imuniteta u tijelu, posebno nakon infekcije te početka i progresije autoimunih bolesti.

### 1.7.4. Supresijsko djelovanje Treg-a



**Slika 2.** Treg supresijski mehanizmi. Preuzeto i prevedeno od

[https://www.frontiersin.org/files/Articles/916411/fimmu-13-916411-HTML-r1/image\\_m/fimmu-13-916411-g001.jpg](https://www.frontiersin.org/files/Articles/916411/fimmu-13-916411-HTML-r1/image_m/fimmu-13-916411-g001.jpg)

Kratice: DC-dendritičke stanice; Tconv- T konvencionalnih stanica

Treg stanice izražavaju vrlo visoke razine CD25, što im omogućuje da "uhvate" IL-2, uklanjajući na taj način citokin koji je potreban T konvencionalnim stanicama (Tconv) za proliferaciju, te induciraju apoptozu (130).

Nakon što dođu u blizinu stanica koje trebaju regulirati, Treg stanice koriste različite molekule kako bi suprimirale aktivaciju Tconv stanica, pri čemu je najistaknutiji CTLA-4, koji se veže na ligande CD80 i CD86, čineći ih nedostupnima za vezanje na CD28 na Tconv stanicama (131). Također, CTLA-4 inducira povećanje ekspresije enzima za katabolizam triptofana indoleamin-2,3-dioksigenaze (IDO) u DC-ima, inducirajući njihov regulatorni fenotip (132). Ova modulacija sazrijevanja i funkcije APC stanica predstavlja glavni mehanizam koji Treg stanice koriste za suzbijanje imunoloških odgovora.

Drugi mehanizmi djelovanja uključuju oslobađanje supresivnih citokina, kao što su TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35 i citotoksičnih molekula, kao što su perforin, granzim i cAMP (133).

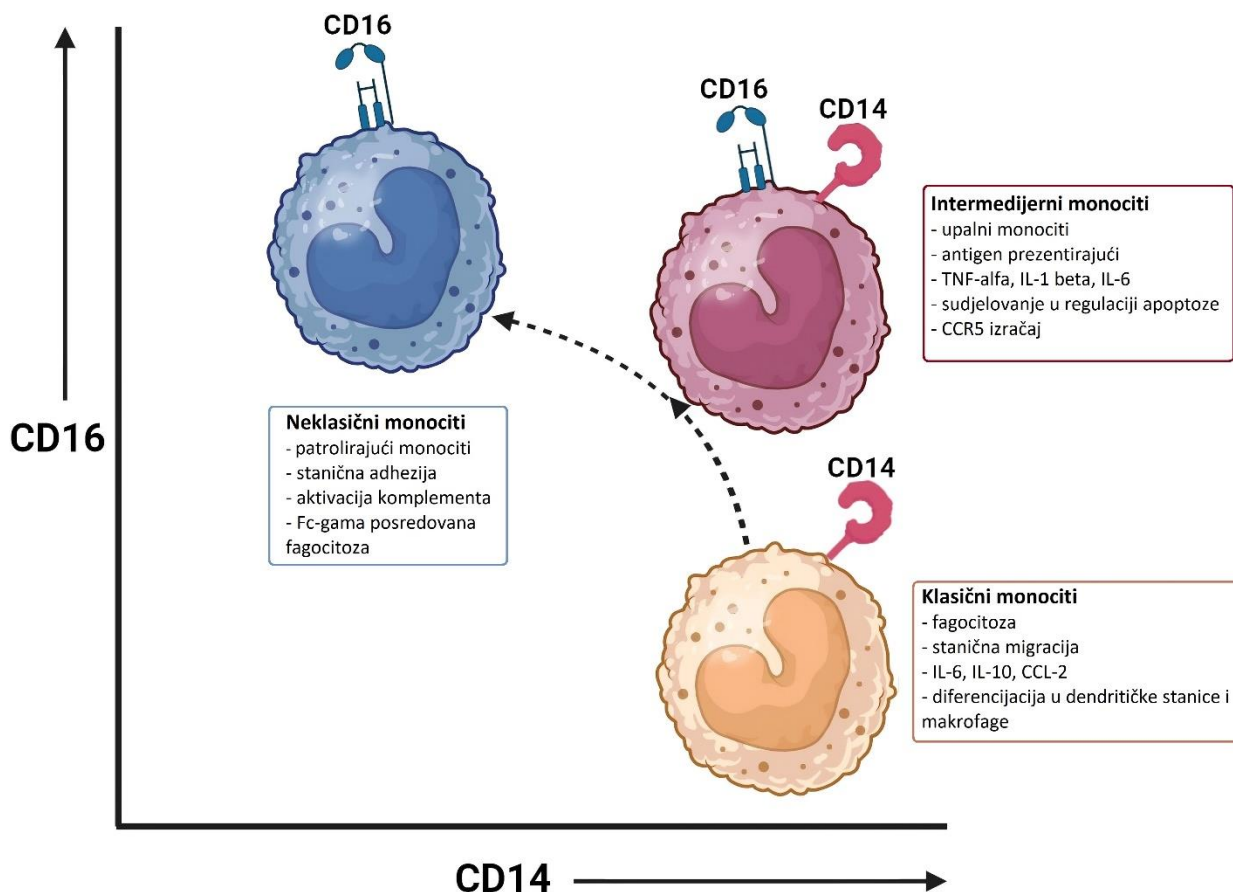
## 1.8. Monociti

Monociti su urođene imunološke stanice mijeloidne loze koje se proizvode tijekom cijelog života i imaju različite uloge, uključujući razvoj i homeostazu tkiva, obranu domaćina, inicijaciju i rješavanje upala te popravak tkiva. Oni se proizvode od hematopoetskih matičnih i progenitorskih stanica u koštanoj srži (monopoeza u mirnom stanju), a njihova proizvodnja je pojačana tijekom "hitne monopoeze", koja se javlja u raznim okolnostima, uključujući odgovor na infektivne i upalne podražaje, prisutnost tumora i tijekom kroničnog psihosocijalnog stresa (134,135).

Monociti nastaju od hematopoetskih matičnih stanica putem progenitorskih stanica s progresivno ograničenim potencijalom loze koje se na kraju opredjeljuju za proizvodnju monocita. Kod miševa i ljudi, monociti nastaju iz višelinjskih zajedničkih mijeloidnih progenitorskih stanica (CMP), koje također proizvode neutrofile, dendritičke stanice, eritrocite i megakariocite. Monociti nastaju putem dva neovisna puta kod miševa, a vjerojatno i kod ljudi: granulocitno-monocitni progenitori proizvode monocite i neutrofile, a mononitno-DC progenitori (MDP) daju monocite kao i konvencionalne i plazmocitoidne DC (136). Odrasla slezena također sadrži rezervoar monocita koji se mogu brzo regrutirati kao odgovor na ozljedu ili upalu (137).

Ljudski monociti sastoje se od fenotipski i funkcionalno različitih subpopulacija, čija se varijabilna količina opaža u krvi pacijenata s brojnim patološkim stanjima, poput infekcija, autoimunih bolesti, respiratornih i kardiovaskularnih bolesti te upalnih poremećaja. Tijekom homeostaze i pod patološkim uvjetima, svaka subpopulacija može igrati različitu ulogu. Njihova heterogenost povećava razumijevanje patogeneze upale, a povećani udio specifične populacije mogao bi poslužiti kao biomarker bolesti (138).

Monociti se dijele na tri subpopulacije s obzirom na ekspresiju CD14 (stanični koreceptor za lipopolisaharide) i CD16 (IgG receptor niskog afiniteta, Fc-Gamma Receptor III) biljega: klasični (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedijarni (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) i neklasični (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) monociti.



*Slika 3.* Podjela monocita s obzirom na izražaj CD14 i CD16 biljega.

Klasični monociti su prva subpopulacija koja se otpušta iz koštane srži u krv, što potvrđuje i činjenica da se u ljudskoj biopsiji koštane srži opažaju samo klasični monociti (139). Patel i suradnici su dokazali da klasični monociti imaju vrlo kratak vijek trajanja u cirkulaciji (u prosjeku 1 dan) nakon čega većina stanica napušta cirkulaciju ili umire, dok oko 1% prelazi u intermedijarne monocite. Intermedijarni monociti imaju duži vijek trajanja (u prosjeku 4 dana) i svi prelaze u neklasične monocite. Neklasni monociti imaju najduži vijek trajanja u krvi (u prosjeku 7 dana) prije nego što napuste cirkulaciju ili umru (140).

Tri subpopulacije monocita nisu samo fenotipski, već i funkcionalno različite jedna od druge. Klasični monociti imaju različite funkcije, poput popravka tkiva i imunološkog odgovora. Oni su odgovorni za fagocitozu, podržavaju zacjeljivanje rana i koagulaciju te pokazuju anti-apoptotičke funkcije i reakcije na podražaje. Izražavaju pro-upalne S-100 proteine, npr. S100A12 i S100A8/9, što im omogućuje održavanje upale. Intermedijarni monociti (2%–8% cirkulirajućih monocita) sudjeluju u prezentaciji antigena, proizvodnji reaktivnih kisikovih vrsta (ROS),

upalama, regulaciji gena, angiogenezi, signalizaciji putem Toll-like receptora, proliferaciji i stimulaciji T stanica. Neklasični monociti (2%–11% cirkulirajućih monocita) patroliraju i traže endotelnu ozljedu u homeostazi i vaskularnim upalama, uz sposobnost uklanjanja umirućih stanica tumorskih stanica i virusa iz cirkulacije (141).

### **1.8.1. Klasični, intermedijarni i neklasični monociti u MS**

Rani događaj u MS-u je oštećenje krvno-moždane barijere, što dovodi do infiltracije perifernih imunoloških stanica i stanja upale u CNS-u. Za razliku od dobro definirane uloge T stanica u patofiziologiji MS-a, mnogo manje se zna o doprinosu urođenog imuniteta (142).

Populacije monocita imaju različite funkcije u središnjem živčanom sustavu i perifernom imunološkom sustavu tijekom neuroinflamacije (143). Klasični monociti infiltriraju tkiva i proizvode upalne citokine; a zatim se diferenciraju u makrofage (144), također uklanjaju mikroorganizme i umiruće stanice iz tijela (145). Iako je poznato da klasični monociti igraju upalnu ulogu, nedavne studije su otkrile da klasični monociti imaju primarno fagocitnu ulogu, odnosno protektivnu ulogu. Više studija je otkrilo obilje klasičnih monocita u upaljenim područjima u kontekstu MS, naglašavajući njihove fagocitne i upalne funkcije (146).

Intermedijarni i neklasični monociti pokazuju značajno višu razinu ekspresije Toll-like receptora (TLR) 2, 4 i 5 u usporedbi s klasičnim monocitima, što ukazuje na njihovu primarno proupalnu funkciju kod sepse i lupusa. Također intermedijarni i neklasični monociti izražavaju visoke razine CD80, CD86 i HLA-DR, što je karakteristika stanica koje predočavaju antigene i potvrđuje njihovu proupalnu funkciju (147).

Neklasični monociti imaju proupalna svojstva, mogu infiltrirati u SŽS, prezentirati antigene, izazvati oštećenje tkiva i biti potencijalna meta za terapiju (148-151). Brojne studije na monocitima kod pacijenata oboljelih od MS-a daju uvid u promjene broja subpopulacija te različitu ekspresiju antigena na subpopulacijama monocita, s posebnim akcentom na promjene u neklasičnim monocitima (152,153).

Iako je uloga subpopulacija monocita kompleksa, nekada i kontradiktorna, sadašnja saznanja idu u prilog tome da se klasični monociti smatraju protuupalnima i protektivnima, dok se intermedijarni i neklasični smatraju proupalnim.

### 1.8.2. CD192 (CCR2)

CCR2 (C-C chemokinski receptor 2) je kemokinski receptor koji regulira mobilizaciju monocita iz koštane srži na mjesta upale. Sastoji se od sedam transmembranskih domena povezanih intracelularnim i ekstracelularnim petljama. Ekstracelularni N- terminalni kraj veže ligande i odgovoran je za specifičnost, intracelularni C-terminalni kraj odgovoran je za intracelularnu signalizaciju (154). U ljudi se nalazi u dvije forme CCR2A i CCR2B i izraženi su na monocitima, T stanicama i drugim stanicama (155). CCR2 se aktivira putem nekoliko vrsta kemokina uključujući CCL2 (poznat kao i MPC-1). Aktivacija CCR2 rezultira usmjerenom migracijom tipova stanica koje eksprimiraju ovaj receptor. CCL2 je najjači aktivator CCR2 signalizacije, što dovodi do transmigracije monocita (156,157). Višestruki ligandi za pojedine kemokinske receptore mogu omogućiti složene regulatorne funkcije i stupanj redundancije unutar kemokinskog sustava, kako bi se osigurali učinkoviti mehanizmi imunološke obrane.

Važnost CCR2 receptora u migraciji monocita dokazuje i činjenica da CCR2<sup>-/-</sup> miševi imaju povećan broj monocita u koštanoj srži i smanjen broj cirkulirajućih monocita što je u skladu s važnom ulogom CCR2 u izlasku monocita iz koštane srži u perifernu cirkulaciju (158). Miševi koji nemaju CCR2 otporni su na indukciju EAE, što je povezano s nedostatkom infiltracije monocita u CNS i smanjenom aktivacijom T stanica izazvanom antigenom (159,160). CCR2 je najviše izražen na klasičnim monocitima, njegova ekspresija je niža kod intermedijarnih, a najniža kod neklasičnih monocita (140).

U fiziološkim uvjetima, monociti nisu detektibilni u parenhimu mozga ili leđne moždine, već se samo uočavaju u moždanim ovojnicama (161). Funkcije monocita u mozgu su istraživane prvenstveno u patološkim uvjetima. Regrutacija krvnih monocita u SŽS nakon infekcije, ozljede ili upalnog odgovora često se događa u neurološkim poremećajima. Nakon ozljede ili tijekom specifičnih bolesti, mozak postaje visoko propustan za cirkulirajuće periferne stanice, uključujući monocite koji se mogu mobilizirati da bi prešli krvno moždanu barijeru, migrirali u mozak i naknadno pridonijeli neuroimunom odgovoru u suradnji s mikroglijom (162). Iako je točan mehanizam nepoznat, CCR2 je nužan za regrutaciju monocita, putem vezanja proteina CCL2, izraženog na površini monocita.

### 1.8.3. CD40

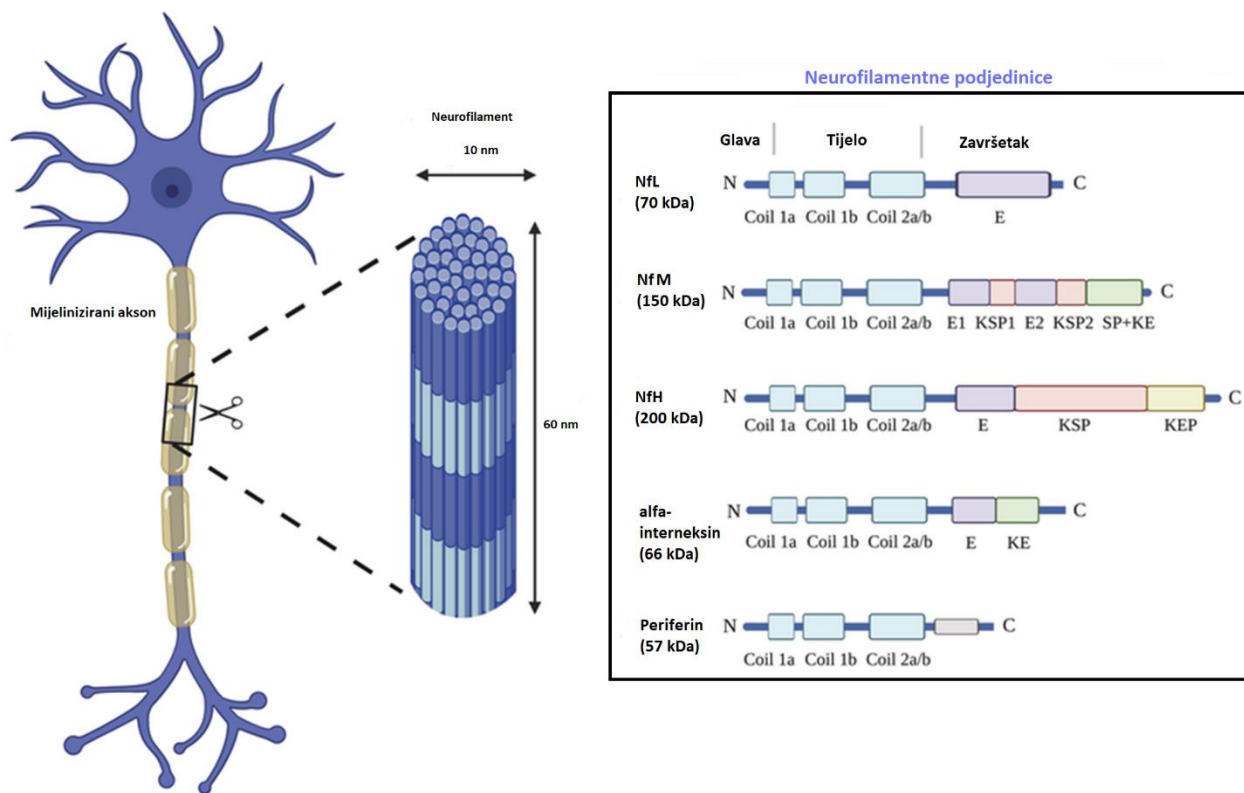
CD40 je transmembranski protein tipa I mase 48 kDa i sadrži 193 aminokiseline u izvanstaničnoj domeni, 21 aminokiselinsku signalnu sekvencu, 22 aminokiseline u transmembranskoj domeni i 62 aminokiseline u unutarstaničnoj domeni (163). Pripada superobitelji TNF-receptora. Što se tiče ekspresije, CD40 je inicijalno izražen na B stanicama, ali se također nalazi na DC, monocitima, trombocitima i makrofazima, kao i na ne hematopoetskim stanicama kao što su miofibroblasti, fibroblasti, epitelne i endotelne stanice (164). CD40L primarno je izražen na T stanicama i trombocitima.

Osim dobro znane uloge CD40-CD40L u B staničnoj aktivaciji i proizvodnji protutijela te proliferaciji upalnih stanica kao što su makrofazi i limfociti tijekom upalnog odgovora, u zadnje vrijeme sve je više poznata uloga i u neurološkim bolestima ne upalne etiologije. Izmijenjena ekspresija CD40 može biti štetna za preživljavanje neuralnog tkiva kod autoimunih neuroloških bolesti kao što je MS ili korisna kod aktivacije imunoloških stanica potrebnih za uništavanje tumorskih stanica (165).

T stanice koje infiltriraju SŽS vežu se pomoću CD40L na CD40 koju izražava mikroglia te na taj način aktiviraju mikrogliju na lučenje citokina, dušikovog oksida te metaloproteaza matriksa povećavajući demijelinizaciju. B stanice koje izražavaju CD40 su također pronađene u demijelinizacijskim lezijama preminulih osoba koje su bolovale od MS što ukazuje da produkcija protutijela koja se događa preko interakcije T i B stanica putem CD40 pridonosi patologiji MS (166).

### 1.9. Neurofilamenti

Neurofilamenti su tip IV intermedijarnih filamenata koji se nalaze u citoplazmi neurona, zajedno s mikrotubulima i mikrofilamentima formiraju neuralni citoskelet. Po svojoj strukturu oni su heteropolimeri koji se sastoje od lakog (NfL), srednjeg (NfM) i teškog (NfH) lanca neurofilamenta te interneksina  $\alpha$  ili perinefrina (Slika 4.) (167,168). Neurofilamenti doprinose rastu i stabilnosti aksona kako u centralnim, tako i u perifernim živcima, kao i održavanju stabilnosti mitohondrija (169) i sadržaja mikrotubula (170), te su odgovorni za brzinu provođenja živčanog impulsa (171).



**Slika 4.** Građa neurofilamenta. Preuzeto, prevedeno i pojednostavljeno od:

<https://www.researchgate.net/publication/359948344/figure/fig1/AS:11431281180743009@1691686083777/Neurofilament-structure-and-subunits-E-glutamic-acid-rich-segments-KE-lysine-glutamic.png> pod licencom CC BY-NC 4.0

Važnost neurofilamenata došla je do izražaja molekularnom karakterizacijom bolesti mozga i perifernih živaca povezanih s abnormalnom strukturom i funkcijom neurofilamenata. Mutacije u genu *NEFL*, koji kodira laki lanac neurofilamenta (NfL), dovode do periferne neurodegeneracije u Charcot-Marie-Tooth bolesti (172). Polimorfizmi u genu *NEFH*, koji kodira teški lanac neurofilamenta (NfH), povezani su s amiotrofičnom lateralnom sklerozom (173). Disfunkcija ili agregacija neurofilamenata može također igrati ulogu u neuropatologiji Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i drugih neurodegenerativnih poremećaja. Nakon neuralnog oštećenja, upale ili neurodegeneracije neurofilamenti se otpuštaju u međustanični prostor, likvor i na koncu u krv (174).

Postoji bliska korelacija između NfL u serumu ili plazmi i razina u CSF, koja je dokazana u brojnim studijama i kod raznih neuroloških bolesti što omogućuje donošenje zaključaka o stupnju trenutne neuroaksonalne ozljede na temelju razina u krvi bez potrebe za uzimanjem CSF-a lumbalnom punkcijom (175-183).



Kod osoba s MS, povećanje razine NfL od početne vrijednosti u krvi pokazalo se kao značajan pokazatelj pogoršanja bolesti, prediktor kratkoročne i dugoročne prognoze bolesti te biomarker za prepoznavanje odgovora na terapiju koja mijenja tijek bolesti (DMT) (184-186). NfL predstavlja tkivno specifičnu, objektivnu i kvantitativnu mjeru nedavnog gubitka neurona kao marker koji odražava stvarnu aktivnost bolesti. Povišene razine NfL koreliraju s lezijama koje pojačavaju gadolinij (Gd+), volumenom T2 lezija, rizikom od relapsa, atrofijom mozga, progresijom invaliditeta određenom pomoću EDSS, odgovorom na DMT i drugim ishodnim mjerama (187-189).

Razine NfL ovisne su i o dobi te indeksu tjelesne mase (BMI) (186,175) što potencijalno zahtijeva prilagodbe pri procjeni različitih populacija i pojedinačnih slučajeva. Smanjenje NfL uočeno je kod više DMT-ova za MS (190-192) međutim, njegova potencijalna korist kao biomarkera za liječenje tek treba biti utvrđena.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### **A. 2.1. Ciljevi istraživanja na Treg stanicama**

1. Odrediti medijan intenziteta fluorescencije (od *engl.* Median Fluorescence Intensity, MFI) FOXP3 na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> te CTLA-4 na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> limfocitima liječenih PPMS, neliječenih PPMS te kontrolne skupine.

2. Odrediti postotak FOXP3 na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> te CTLA-4 na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> limfocitima liječenih PPMS, neliječenih PPMS te kontrolne skupine.

### **A. 2.2. Hipoteze istraživanja na Treg stanicama**

1. Svi PPMS ispitanici će imati povećanu ekspresiju/postotak FOXP3 i CTLA-4 na Treg stanicama u odnosu na kontrolnu skupinu.

2. Liječeni PPMS imat će manju ekspresiju/postotak FOXP3 i CTLA-4 na Treg stanicama u odnosu na neliječene PPMS.

### **B. 2.1. Ciljevi istraživanja na subpopulacijama monocita**

1. Odrediti MFI CD192 i CD40 na subpopulacijama monocita: klasičnim (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedijarnim (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) i neklasičnim (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) kod liječenih PPMS, neliječenih PPMS te kontrolne skupine.

2. Odrediti postotak CD192 i CD40 na subpopulacijama monocita: klasičnim (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedijarnim (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) i neklasičnim (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) kod liječenih PPMS, neliječenih PPMS te kontrolne skupine.

### **B. 2.2. Hipoteze istraživanja na subpopulacijama monocita**

1. Osobe oboljele od PPMS će imati promijenjenu ekspresiju/postotak CD192 i CD40 markera na subklasama monocita u odnosu na kontrolnu skupinu.

2. Očekuju se razlike u ekspresiji/postotku CD192 i CD40 markera među subpopulacijama između liječenih i neliječenih PPMS.

### **C. 2.1. Ciljevi istraživanja na neurofilamentima**

1. Odrediti koncentraciju neurofilamenata u serumu liječenih PPMS, neliječenih PPMS te kontrolne skupine.

### **C. 2.2. Hipoteze istraživanja na neurofilamentima**

1. Liječeni i neliječeni PPMS imat će povećanu koncentraciju neurofilamenata u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu.

2. Koncentracija neurofilamenata bit će veća kod neliječenih PPMS u usporedbi s liječenim PPMS.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u okviru Klinike za neurologiju KBC-a Split te znanstvenog Laboratorija za medicinsku kemiju i biokemiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (MEFST).

Studija je provedena u skladu s Helsinškom deklaracijom i odobrena od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta sveučilišta u Splitu (klasa: 003-08/21-03/0003, br: 2181-198-03-04-21-0039, odobreno 10. ožujka 2020., i zadnji aneks klasa: 003-08/23-03/0015, br: 2181-198-03-04-23-0075, odobreno 27. rujna 2023.) i Kliničkog bolničkog centra Split (klasa: 500-03/20-01/06, No: 2181-147-01/06/M.S., odobreno 27. siječnja 2020., i zadnji aneks klasa: 500-03/20-01/06, No: 2181-147-01-06/Lj.Z.-23-04, odobren 20. rujna 2023.)

Studija je prijavljena u registru ClinicalTrials.gov, URL:

<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04604041>

Projekt: „Istraživanje subkliničkih markera multiple skleroze“ (SUBCLIN-MS, HRZZ-IP-2022-10-6203).

Informirani pristanak dobiven je od svih ispitanika uključenih u studiju, a regrutirani su s Klinike za neurologiju KBC-a Split.

Istraživanje je obuhvatilo 28 osoba s primarno progresivnom multiplom sklerozom te kontrolnu skupinu od 10 zdravih ispitanika. Svi sudionici su bili punoljetni. Osobe oboljele od PPMS su podijeljene u dvije skupine: liječenu (N=15) i neliječenu (N=13). Petnaest ispitanika oboljelih od PPMS je liječeno ocrelizumabom  $\geq$  12 mjeseci. Primali su 600 mg ocrelizumaba jednom u 6 mjeseci. Trinaest ispitanika oboljelih od PPMS, kod kojih je bolest dijagnosticirana prije više od godinu dana, nisu pristali na liječenje. Zdravi ispitanici nisu imali bolesti iz autoimunog spektra.

**Tablica 2.** Demografske karakteristike i karakteristike bolesti kod ocrelizumabom liječenih PPMS, neliječenih PPMS i kontrolne skupine.

| Parametar<br>M ± SD             | Svi<br>PPMS (N=28) | Liječeni<br>PPMS (N=15) | Neliječeni<br>PPMS (N=13) | Kontrolna<br>skupina<br>(N=10) |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Godine                          | 54.57 ± 8.71       | 53 ± 7.47               | 56.3 ± 9.97               | 48.6 ± 12.07                   |
| EDSS                            | 4.94 ± 1.54        | 4.8 ± 1.53              | 5.11 ± 1.6                | /                              |
| Trajanje<br>bolesti<br>(godine) | 10.74 ± 7.58       | 6.86 ± 5.39             | 15.58 ± 7.26              | /                              |
| Žensko/Muško<br>(n)             | 21/7               | 13/2                    | 8/5                       | 6/4                            |

PPMS-primarno progresivna multipla skleroza; M-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; N- broj ispitanika, EDSS- proširena ljestvica statusa onesposobljenosti (engl. *Expanded Disability Status Scale*)

### 3.1.1 Kliničke procjene mjere bolesti

Sve ispitanike oboljele od PPMS prilikom dolaska pregledao je neurolog na Klinici za neurologiju KBC-a Split. Pregled je obuhvaćao proširenu ljestvicu statusa onesposobljenosti (Expanded Disability Status Scale, EDSS), EDSS funkcionalni piramidni rezultat, te uzimanje podataka o početku MS-a, trajanju MS-a, duljini uzimanja ocrelizumaba, drugim popratnim bolestima i terapijama (Tablica 3.). Uzorci krvi su prikupljeni iz antekubitalne vene nakon pregleda i potpisivanja informiranog pristanka.

**Tablica 3.** Lista za prikupljanje podataka o pojedinačnom ispitaniku

|   |
|---|
| <b>Demografski podaci</b>   |
| Godine  |
| Spol  |
| Visina (cm)   |
| Težina (kg)   |
| Datum uzimanja uzorka krvi  |
| <b>Klinički podaci povezani s MS bolešću</b>  |
| Trajanje MS bolesti (u godinama)  |
| Duljina trajanja uzimanja Ocrevus-a (u godinama)  |
| Druge kronične bolesti i lijekovi   |
| EDSS rezultat/skor  |
| EDSS funkcionalni piramidni rezultat (rezultat funkcionalnog integriteta kortikospinalnog puta) |

### 3.2. Uzorci krvi

Svakom ispitaniku su vađene dvije epruvete krvi. Uzorak krvi potreban za protočnu citometriju je vađen pomoću polietilenskog katetera umetnutog u antekubitalnu venu u epruvetu s EDTA antikoagulansom i u biokemijsku epruvetu za izdvajanje seruma. Uzorci su dostavljeni unutar dva sata u Laboratorij za medicinsku kemiju i biokemiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Uzorci iz epruvete s EDTA antikoagulansom korišteni su za obradu i akviziciju imunobojačkih stanica protočnim citometrom i obrađivani su isti dan. Uzorci krvi iz biokemijske epruvete korišteni su za određivanje neurofilamenata. Nakon centrifugiranja i odvajanja seruma, serum je zaleđen na  $-20^{\circ}\text{C}$ , te se naknadno koristio za testiranje koncentracije neurofilamenata.

### 3.3. Protočna citometrija

Svi uzorci su analizirani prema istom standardnom postupku. U prvoj epruveti je inkubirano 100 mikrolitara pune krvi 20 minuta u mraku na 25°C s određenim volumenima protutijela na humane biljege monocita konjugiranih s odgovarajućim kromogenima: 4 µL CD14-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA), 4 µL CD16-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA), 3 µL CD192-BB700 (BD Horizon, San Diego, CA) i 5 µL Alexa Fluor 647 CD40- Alexa Fluor 647 (BD Pharmingen, San Diego, CA). U drugoj epruveti je inkubirano 100 mikrolitara pune krvi 20 minuta u mraku na 25°C s određenim volumenima protutijela na humane biljege limfocita konjugiranih s odgovarajućim kromogenima: 20 µL CD152-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA), 20 µL CD25-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA), 5 µL FOXP3-BB700 (BD Horizon, San Diego, CA) i 5 µL CD4-Alexa Fluor 647 (BD Pharmingen, San Diego, CA). Nakon lize crvenih krvnih stanica s BD Pharm Lyse™ otopinom (BD Biosciences, San Diego, CA) fluorescencija obojenih uzoraka izmjerena je pomoću BD Accuri C6 (BD Biosciences, Belgija) protočnog citometra. Uzorci neobojanih stanica su korišteni kao negativna kontrola da bi se postavile prikladne regije. Prikupljanje stanica je zaustavljeno kada se prikupilo 10<sup>6</sup> stanica.

#### 3.3.1. Analiza podataka protočne citometrije

Podaci dobiveni protočnom citometrijom su analizirani u programu FlowLogic Software verzija 8 (Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australia). Monociti (iz prve epruvete) i leukociti (iz druge epruvete) su prepoznati iz točkastog grafa (engl. forward scatter FSC/side scatter SSC). FSC parametar ukazuje na veličinu stanica, a SSC ukazuje na staničnu granuliranost.

### 3.4. Određivanje neurofilamenata

Za određivanje neurofilamenata korišten je Human NF-L Sandwich ELISA test (Proteintech). Svi uzorci testirani su u duplikatu. Nakon označavanja mikropločice, dodano je 100 µL standarda različitih koncentracija dobivenih razrjeđenjem i 100 µL seruma ispitanika (duplikat) u pripadajuće jažice. Pločica se inkubira 2 sata na 37°C. Nakon inkubacije slijedilo je dekantiranje te ispiranje Wash bufferom, otprilike 350-400 uL po jažici. Nakon ispiranja dodaje se po 100 µL otopine za otkrivanje protutijela (Detection antibody solution) u svaku jažicu. Slijedi inkubacija 1h na 37°C. Pločica se ponovo dekantira i pere 4 puta sa otopinom za pranje (Wash buffer). Dodaje

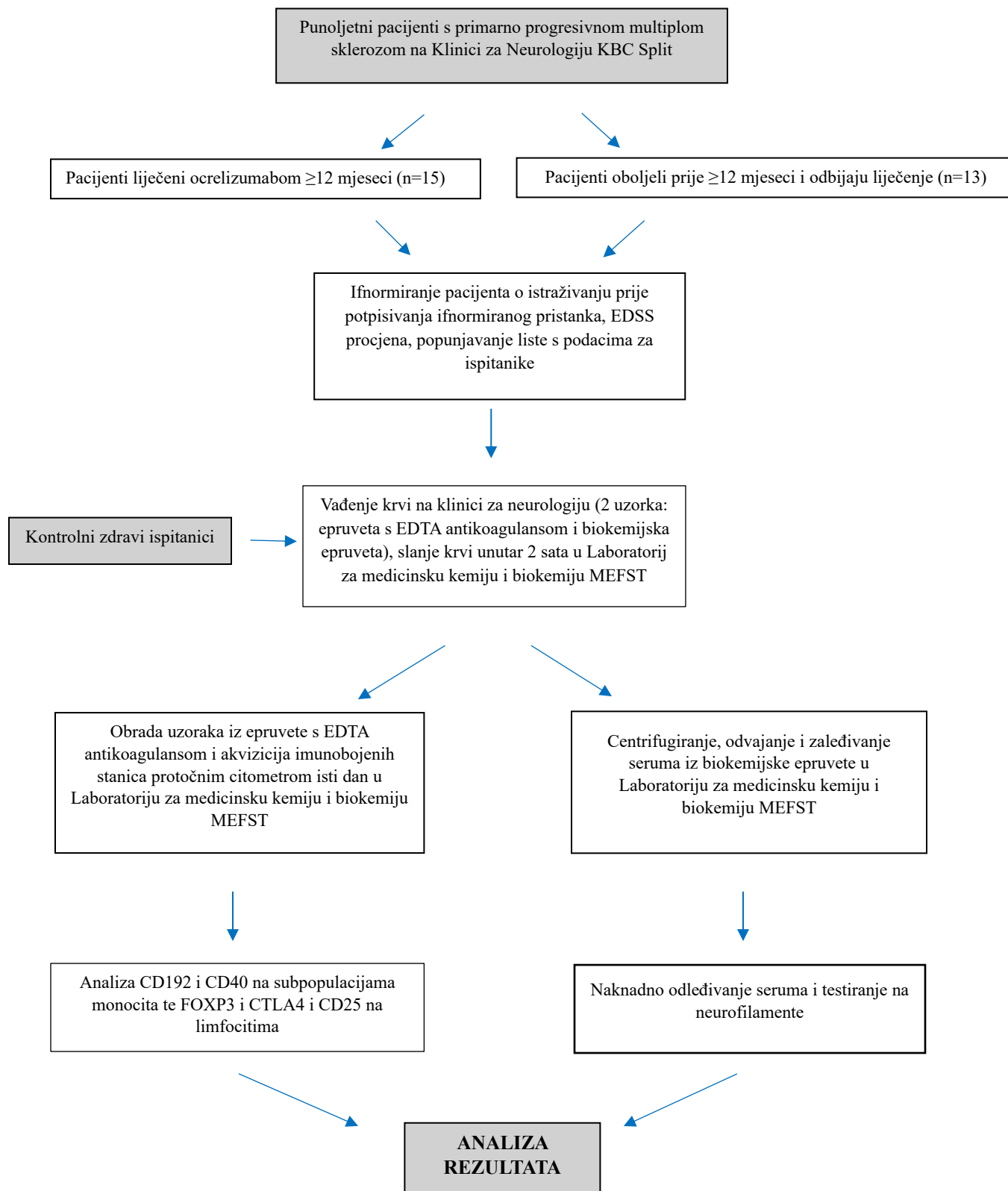


se 100  $\mu$ L Streptavidin-HRP otopine u svaku jažicu, slijedi inkubacija 40 minuta na 37°C. Ponavlja se dekantiranje i 4 puta pranje Wash otopinom. Slijedi dodavanje 100  $\mu$ L TBM (od engl. 3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine*) supstrat otopine u svaku jažicu te inkubira 15-20 minuta u mraku. Nakon toga se dodaje po 100  $\mu$ L Stop otopine u svaku jažicu istim redoslijedom kako se dodavao i TBM supstrat. Slijedi očitavanje rezultata na čitaču mikropločica na valnoj duljini od 450 nm.

#### **3.4.1. Analiza podataka za neurofilamente**

Izračunava se prosjek vrijednosti apsorbancija (duplikata) za svaku kontrolu i uzorak ispitanika. Iz načinjene standardne krivulje očitaju se dobiveni rezultati. Za testiranje razlika korišteni su analiza varijance (jednosmjerna) i t-test za nezavisne skupine. Za izračunavanje povezanosti između pojedinih skupina, korišten je Pearsonov koeficijent korelacije. Razine značajnosti postavljene su na  $p < 0,05$ ; odnosno  $p < 0,01$ .

### 3.5. Dijagram tijeka istraživanja



### 3.6. Statistički postupci

Svi podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD za kontinuirane parametrijske varijable, medijan za kontinuirane neparametrijske varijable. Student t-test korišten je za usporedbu parametarskih kontinuiranih podataka. Grupe su uspoređivane one-way ANOVA testom. Korelacijske analize rađene su Spearman-rank order korelacijom  $\rho$ .

Sve statističke analize napravljene su uz pomoć softvera Past 3. X (verzija 3.14, Sveučilište u Oslu, Norveška) sa statističkom značajnošću postavljenom na  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Rezultati ispitivanja na limfocitnim stanicama

Svi PPMS ispitanici su se razlikovali od kontrolne skupine u postotcima  $CD4^+CD25^{high}$ ,  $CD4^+CD25^+$ ;  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  i  $CD4^+CD25^+FOXP3$ . PPMS ispitanici su se razlikovali od kontrolne skupine i u površinskoj ekspresiji  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  i  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  (Tablica 4.).

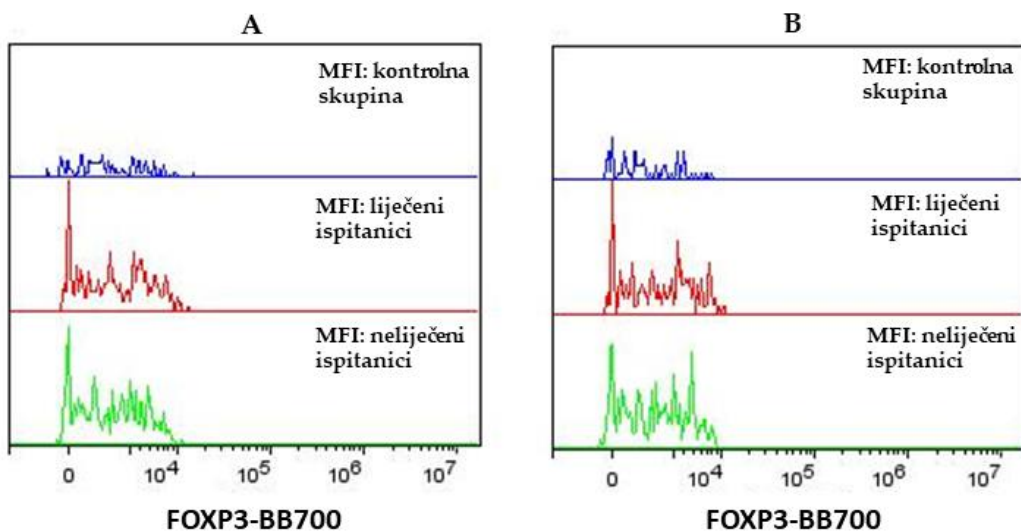
**Tablica 4.** Izražaj limfocitnih markera i njihova ekspresija na PPMS ispitanicima i kontrolama

|            |    | %                                     | MFI                                   | %                                     | MFI                                   | %                                  | MFI                                | %CD4 <sup>+</sup>  | MFI                                |
|------------|----|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|
|            |    | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> | CD25 <sup>+</sup>  | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> |
|            |    |                                       |                                       | FOXP3 <sup>+</sup>                    | FOXP3 <sup>+</sup>                    |                                    |                                    | FOXP3 <sup>+</sup> | FOXP3 <sup>+</sup>                 |
| Svi PPMS   | M  | 3.33                                  | 32738.37                              | 10.80                                 | 1746.68                               | 5.85                               | 35657.31                           | 21.49              | 1809.87                            |
| (N=28)     | SD | 0.93                                  | 2830.84                               | 2.84                                  | 360.6711                              | 1.54                               | 3235.67                            | 4.71               | 380.26                             |
| Liječeni   | M  | 3.02                                  | 33002.84                              | 10.57                                 | 1798.26                               | 5.502                              | 36098.34                           | 21.89              | 1866.49                            |
| PPMS       | SD | 0.66                                  | 3072.6                                | 3.06                                  | 433.07                                | 1.28                               | 3422.33                            | 5.41               | 474.53                             |
| (N=15)     |    |                                       |                                       |                                       |                                       |                                    |                                    |                    |                                    |
| Neliječeni | M  | 3.7                                   | 32433.22                              | 11.06                                 | 1687.15                               | 6.26                               | 35148.44                           | 21.03              | 1744.54                            |
| PPMS       | SD | 1.08                                  | 2613.08                               | 2.68                                  | 258.27                                | 1.76                               | 3060.79                            | 3.91               | 232.40                             |
| (N=13)     |    |                                       |                                       |                                       |                                       |                                    |                                    |                    |                                    |
| KS         | M  | 2.48                                  | 32561.62                              | 8.15                                  | 1441.3                                | 3.66                               | 33676.44                           | 12.87              | 1410.24                            |
| (N=10)     | SD | 0.75                                  | 1524.72                               | 3.42                                  | 211.1                                 | 1.31                               | 3512.57                            | 4.29               | 301.57                             |
| Svi PPMS   | t  | 2.61                                  | 0.17                                  | 2.39                                  | 2.39                                  | 3.98                               | 1.62                               | 5.07               | 2.99                               |
| vs KS      | df | 37                                    | 36                                    | 37                                    | 36                                    | 37                                 | 37                                 | 37                 | 37                                 |
|            | p  | 0.01*                                 | 0.85                                  | 0.02*                                 | 0.02*                                 | 0.0003***                          | 0.11                               | 0.00001****        | 0.004**                            |
| Liječeni   | t  | 1.89                                  | 0.39                                  | 1.85                                  | 2.29                                  | 3.47                               | 1.71                               | 4.41               | 2.99                               |
| PPMS vs    | df | 24                                    | 23                                    | 24                                    | 23                                    | 24                                 | 24                                 | 24                 | 24                                 |
| KS         | p  | 0.07                                  | 0.69                                  | 0.07                                  | 0.03*                                 | 0.002**                            | 0.09                               | 0.0002***          | 0.01*                              |
| Neliječeni | t  | 3.02                                  | 0.13                                  | 2.28                                  | 2.35                                  | 3.88                               | 1.07                               | 4.75               | 3                                  |
| PPMS vs    | df | 22                                    | 21                                    | 22                                    | 21                                    | 22                                 | 22                                 | 22                 | 22                                 |
| KS         | p  | 0.006**                               | 0.89                                  | 0.03*                                 | 0.02*                                 | 0.0008***                          | 0.29                               | 0.0001***          | 0.006**                            |
| Liječeni   | t  | 2                                     | 0.52                                  | 0.43                                  | 0.8                                   | 1.32                               | 0.76                               | 0.47               | 0.84                               |
| vs.        | df | 27                                    | 27                                    | 27                                    | 27                                    | 27                                 | 27                                 | 27                 | 27                                 |
| neliječeni | p  | 0.053                                 | 0.6                                   | 0.66                                  | 0.42                                  | 0.19                               | 0.44                               | 0.63               | 0.4                                |
| PPMS       |    |                                       |                                       |                                       |                                       |                                    |                                    |                    |                                    |

PPMS-primarno progresivna multipla skleroza; KS-kontrolna skupina; % - postotci; MFI- od engl. *median fluorescence intensity*; M—aritmetička sredina; SD—standardna devijacija; df-stupanj slobode; t-t-test. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001

Svi PPMS ispitanici su imali i značajno povećanje postotka  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  ( $p=0,01$ ) i  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  ( $p=0,00001$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Liječeni PPMS ( $p=0,0002$ ) i neliječeni PPMS ( $p=0,0001$ ) imali su značajno povećanje postotka  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ , dok su statistički značajno povećanje postotka  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  imali samo neliječeni PPMS ( $p=0,03$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4.).

Svi PPMS ispitanici su imali značajno povećanje postotka  $CD4^+CD25^{high}$  i  $CD4^+CD25^+$  u odnosu na kontrolnu skupinu. Neliječeni PPMS su imali značajno povećanje postotka  $CD4^+CD25^{high}$  ( $p=0,006$ ) kao i postotka  $CD4^+CD25^+$  ( $p=0,0008$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu. Liječeni PPMS su imali statistički značajno povećanje postotka  $CD4^+CD25^+$  ( $p=0,002$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu, dok nije bilo značajne razlike u postotku  $CD4^+CD25^{high}$  (Tablica 4.).



**Slika 5.** MFI od FOXP3 na  $CD4^+CD25^{high}$  (A) i  $CD4^+CD25^+$  (B) kod kontrolne skupine i PPMS ispitanika ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ).

Svi PPMS, liječeni i neliječeni su imali statistički značajno povećanu ekspresiju  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  ( $p < 0,01$ ) i  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  ( $p < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 5.).

**Tablica 5.** Postotak i ekspresija CTLA-4 na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> stanicama i Treg stanicama PPMS ispitanika i kontrolne skupine.

|  |              | % CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup><br>CTLA-4 <sup>+</sup> | MFI od<br>CTLA-4 <sup>+</sup> u<br>CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> | % CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup><br>FOXP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> | MFI od<br>CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup><br>FOXP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> |
|--|--------------|---|---|--|--|
| Svi PPMS<br>(N=28)                         | M<br>SD      | 40.98<br>7.95   | 1,308.14<br>178.37  | 32.34<br>6.08  | 2,375.4<br>273.44  |
| Liječeni<br>PPMS<br>(N=15)                 | M<br>SD      | 39.96<br>9.59   | 1,327.11<br>196.92  | 34.01<br>7.84  | 2,378.26<br>294.41   |
| Neliječeni<br>PPMS<br>(N=13)               | M<br>SD      | 42.16<br>5.67   | 1,278.63<br>151.23  | 30.41<br>4.99  | 2,372.1<br>259   |
| Kontrole<br>(N=10)                         | M<br>SD      | 36.07<br>5.48   | 907.24<br>323.23  | 25.57<br>3.89  | 2,418.35<br>218.2  |
| Svi PPMS<br>vs. kontrole                   | t<br>df<br>p | 1.79<br>37<br>0.08  | 4.5<br>31<br>0.0008*  | 2.96<br>37<br>0.005**  | 0.42<br>36<br>0.67   |
| Liječeni<br>PPMS vs.<br>Kontrole           | t<br>df<br>p | 1.15<br>24<br>0.25  | 3.89<br>22<br>0.04*   | 3.14<br>24<br>0.004**  | 0.35<br>23<br>0.72   |
| Neliječni<br>PPMS vs.<br>Kontrole          | t<br>df<br>p | 2.59<br>22<br>0.01*   | 3.12<br>17<br>0.006**   | 2.53<br>22<br>0.01*  | 0.43<br>21<br>0.66   |
| Liječeni<br>PPMS vs.<br>Neliječeni<br>PPMS | t<br>df<br>p | 0.72<br>27<br>0.47  | 0.62<br>22<br>0.53  | 1.42<br>27<br>0.16   | 0.05<br>27<br>0.95   |

PPMS-primarno progresivna multipla skleroza; % - postotci; MFI- od engl. *median fluorescence intensity*; M-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; df-stupanj slobode; t-t-test. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

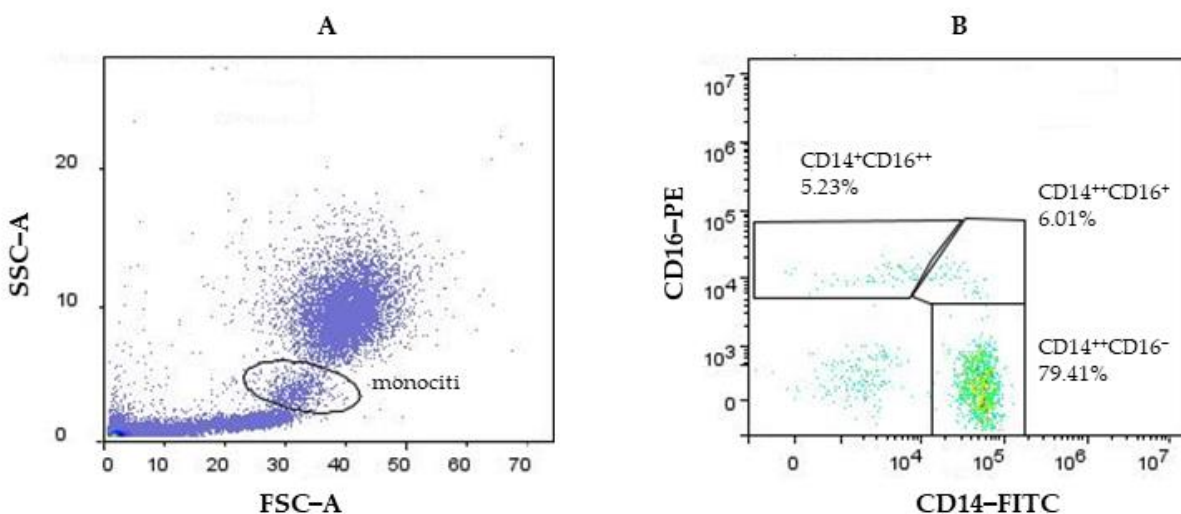


Svi PPMS su se razlikovali od kontrolne skupine u postotku  $CD4^+CD25^+FOXP3^+CTLA^-$  i u ekspresiji CTLA-4 na  $CD4^+CD25^-$  stanicama. Svi PPMS ( $p=0,0008$ ), liječeni ( $p=0,04$ ) i neliječeni ( $p=0,006$ ) su imali povećanu ekspresiju CTLA-4 na  $CD4^+CD25^-$  stanicama u odnosu na kontrolnu skupinu. Neliječeni PPMS su imali značajno povećan postotak CTLA-4 na  $CD4^+CD25^-$  stanicama u odnosu na kontrolnu skupinu, dok se liječeni PPMS nisu razlikovali od kontrolne skupine u postotku CTLA-4 na  $CD4^+CD25^-$  stanicama. Svi PPMS ( $p=0,005$ ), liječeni ( $p=0,004$ ) i neliječeni ( $p=0,01$ ) su imali povećan postotak  $CD4^+CD25^+FOXP3^+CTLA-4^+$  u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5.).

Nije nađena statistički značajna korelacija ni s jednom od varijabli u odnosu na EDSS rezultat.

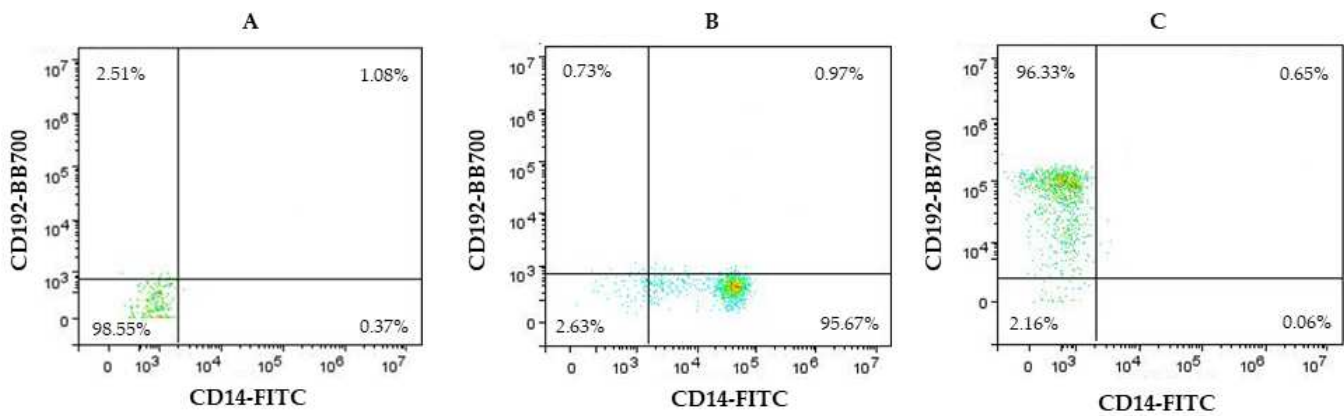
#### 4.2. Rezultati ispitivanja na monocitnim stanicama

Monocitne subpopulacije su prikazane na Slici 6. Stanična ekspresija CD14 i CD16 je prikazana u točkastom dijagramu da bi se identificirale monocitne subpopulacije  $CD14^{++}CD16^-$ ,  $CD14^{++}CD16^+$  i  $CD14^+CD16^{++}$ . Subpopulacije su analizirane kao postotak i jačina ekspresije površinskih receptora CD40 i CD192.



**Slika 6.** Reprezentativni gate za monocite (A) i monocitne subpopulacije neklasičnih ( $CD14^+CD16^{++}$ ), intermedijarnih ( $CD14^{++}CD16^+$ ) i klasičnih ( $CD14^{++}CD16^-$ ) stanica (B).

Slika 7. prikazuje ukupne monocite, korištene za praćenje strategije analize i prilagođavanje instrumenta (protočnog citometra).



**Slika 7.** Reprezentativni točkasti dijagrami za nebojeni uzorak (A), kontrolne ukupne monocite obojane markerom za CD14 (B), te CD192 (C).

Svi PPMS su se razlikovali od kontrolne skupine u postotku i ekspresiji CD192+ na klasičnim monocitima. Svi PPMS ( $p=0,001$ ), liječeni ( $p=0,0001$ ) i neliječeni ( $p=0,01$ ) imali su značajno smanjen postotak CD192+ klasičnih monocita u odnosu na kontrolnu skupinu. Svi PPMS ( $p < 0,001$ ), liječeni ( $p < 0,001$ ) i neliječeni ( $p=0,01$ ) su imali značajno povećanu ekspresiju CD192 na klasičnim monocitima u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Ekspresija i postotci CD40 i CD192 markera na klasičnim monocitima PPMS ispitanika i kontrolne skupine.

|                                |    | %CD40 <sup>+</sup> na<br>CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> | MFI CD40 na<br>CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> | %CD192 <sup>+</sup> na<br>CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> | MFI CD192 na<br>CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> |
|--------------------------------|----|---|---|--|--|
| Svi PPMS (N=28)                | M  | 56.65   | 3920.19   | 81.53  | 98461  |
|                                | SD | 21.5  | 1165.84   | 12.67  | 9733.66  |
| Liječeni PPMS<br>(N=15)        | M  | 60.48   | 4200.94   | 80.71  | 101066   |
|                                | SD | 23.26   | 1398.47   | 10.31  | 8739.42  |
| Neliječeni PPMS<br>(N=13)      | M  | 54.14   | 3596.25   | 82.47  | 95454.9  |
|                                | SD | 19.19   | 751.188   | 15.35  | 10285.6  |
| Kontrolna skupina<br>(KS)      | M  | 44.84   | 3257.63   | 95.81  | 84498.2  |
|                                | SD | 20.51   | 847.26  | 3.51   | 10124.3  |
| Svi PPMS vs. KS                | t  | 1.5   | 1.64  | 3.48   | 3.85   |
|                                | df | 37  | 37  | 37   | 37   |
|                                | p  | 0.14  | 0.1   | 0.001**  | 0.0004***  |
| Liječeni PPMS vs<br>KS         | t  | 1.72  | 1.9   | 4.43   | 4.36   |
|                                | df | 24  | 24  | 24   | 24   |
|                                | p  | 0.09  | 0.06  | 0.0001**   | 0.0002***  |
| Neliječeni PPMS vs<br>KS       | t  | 0.87  | 1.01  | 2.67   | 2.54   |
|                                | df | 22  | 22  | 22   | 22   |
|                                | p  | 0.39  | 0.32  | 0.01*  | 0.01*  |
| Liječeni vs neliječeni<br>PPMS | t  | 1.02  | 1.39  | 0.36   | 1.56   |
|                                | df | 27  | 27  | 27   | 27   |
|                                | p  | 0.31  | 0.17  | 0.72   | 0.13   |

PPMS-primarno progresivna multipla skleroza; % - postotci; MFI- od engl. *median fluorescence intensity*; M- aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; df-stupanj slobode; t-t-test. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

**Tablica 7.** Ekspresija i postotci markera na intermedijarnim monocitima PPMS ispitanika i kontrolne skupine.

|  |    | % CD40 <sup>+</sup> na<br>CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> | MFI CD40 na<br>CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> | MFI CD192 na<br>CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> |
|--|----|--|---|--|
| Svi PPMS(N=28)                           | M  | 81.18  | 10135.82  | 57880.73   |
|  | SD | 16.97  | 3586.68   | 26312.81   |
| Liječeni PPMS<br>(N=15)                  | M  | 79.59  | 9922.6  | 62825  |
|  | SD | 16.34  | 3147.26   | 21795.23   |
| Neliječeni PPMS<br>(N=13)                | M  | 83.02  | 10381.84  | 52174.69   |
|  | SD | 18.16  | 4155.25   | 30623.09   |
| Kontrolna skupina                        | M  | 78.93  | 6524.01   | 41240.43   |
|  | SD | 9.55   | 2417.85   | 15229.96   |
| Svi PPMS vs.<br>kontrolna skupina        | t  | 0.39   | 2.94  | 1.88   |
|  | df | 37   | 37  | 37   |
|  | p  | 0.69   | 0.005**   | 0.06   |
| Liječeni PPMS vs,<br>kontrolna skupina   | t  | 0.11   | 2.88  | 2.7  |
|  | df | 24   | 24  | 24   |
|  | p  | 0.9  | 0.008**   | 0.01*  |
| Neliječeni PPMS vs.<br>kontrolna skupina | t  | 0.64   | 2.6   | 1  |
|  | df | 22   | 22  | 22   |
|  | p  | 0.52   | 0.01*   | 0.31   |
| Liječeni PPMS vs.<br>neliječeni PPMS     | t  | 0.52   | 0.33  | 1  |
|  | df | 27   | 27  | 27   |
|  | p  | 0.6  | 0.74  | 0.29   |

PPMS-primarno progresivna multipla skleroza; % - postotci; MFI- od engl. *median fluorescence intensity*; M-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; df-stupanj slobode; t-t-test. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Svi PPMS su se razlikovali od kontrolne skupine po povećanoj ekspresiji (p < 0,01) CD40 na intermedijarnim monocitima. Liječeni (p < 0,01) i neliječeni (p=0,01) su također imali statistički značajno povećanu ekspresiju CD40 na intermedijarnim monocitima. Liječeni PPMS su imali značajno povećanu ekspresiju (p=0,01) CD192 na intermedijarnim monocitima u odnosu na kontrolnu skupinu.

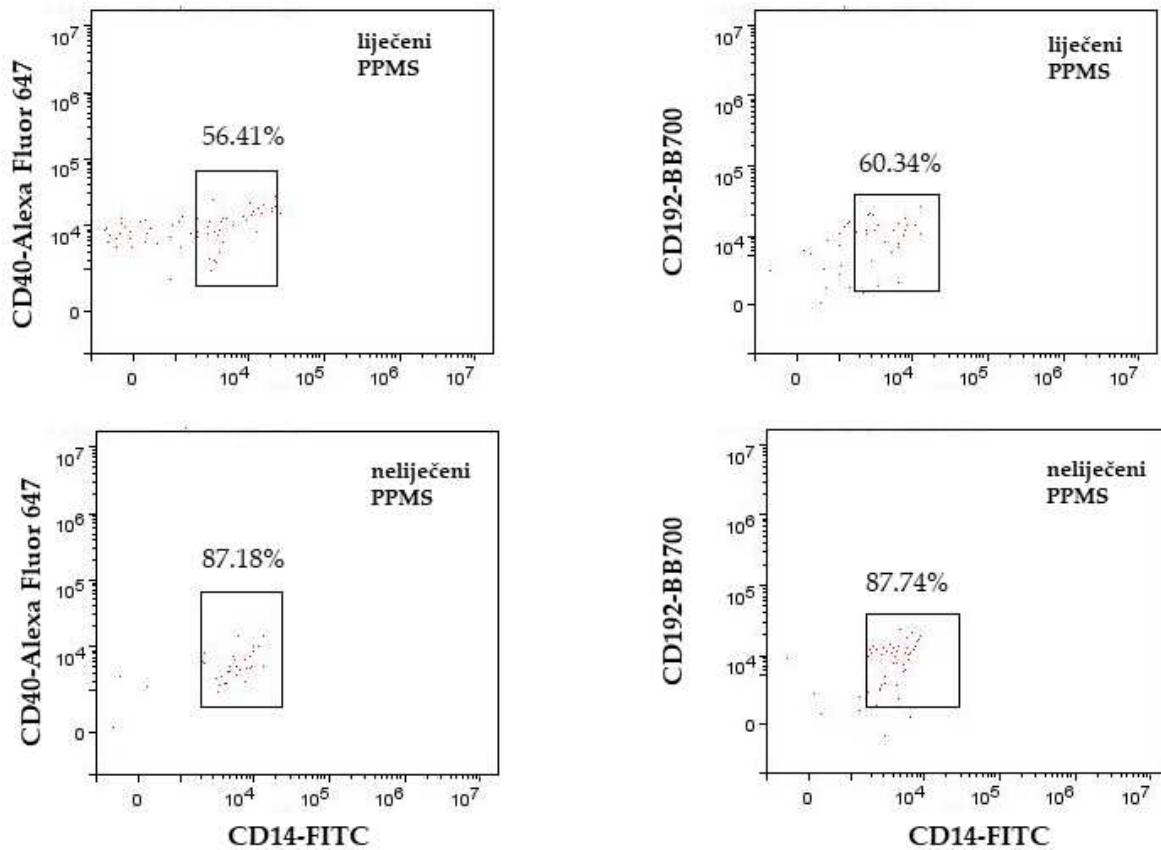
**Tablica 8.** Ekspresija i postotci CD40 i CD192 markera na neklasičnim monocitima PPMS ispitanika i kontrolne skupine.

|  |    | %CD40+ na<br>CD14+CD16 <sup>++</sup> | MFI CD40 na<br>CD14+CD16 <sup>++</sup> | %CD192+ na<br>CD14+CD16 <sup>++</sup> | MFI CD192 na<br>CD14+CD16 <sup>++</sup> |
|--|----|--------------------------------------|--|---------------------------------------|---|
| Svi                                    | M  | 67.58                                | 8763.35                                | 68.78                                 | 14690.47                                |
| PPMS(N=28)                             | SD | 14.36                                | 3400.41                                | 15.65                                 | 4296.77                                 |
| Liječeni PPMS<br>(N=15)                | M  | 61.09                                | 8931.58                                | 62.82                                 | 15177.5                                 |
|  | SD | 11.67                                | 3358.73                                | 15.3                                  | 3448.17                                 |
| Neliječeni<br>PPMS (N=13)              | M  | 75.69                                | 8553.07                                | 76.19                                 | 14081.67                                |
|  | SD | 13.61                                | 3557.23                                | 13.13                                 | 5270.45                                 |
| Kontrolna<br>skupina (KS)              | M  | 61.8                                 | 9889.83                                | 70.3                                  | 15367.56                                |
|  | SD | 20.29                                | 5871.34                                | 20.95                                 | 4885.01                                 |
| Svi PPMS vs<br>KS                      | t  | 0.94                                 | 0.78                                   | 0.24                                  | 0.41                                    |
|  | df | 35                                   | 36                                     | 36                                    | 36                                      |
|  | p  | 0.35                                 | 0.47                                   | 0.81                                  | 0.68                                    |
| Liječeni PPMS<br>vs KS                 | t  | 0.1                                  | 0.51                                   | 1.03                                  | 0.11                                    |
|  | df | 23                                   | 24                                     | 24                                    | 24                                      |
|  | p  | 0.91                                 | 0.06                                   | 0.31                                  | 0.9                                     |
| Neliječeni<br>PPMS vs KS               | t  | 1.88                                 | 0.65                                   | 0.8                                   | 0.58                                    |
|  | df | 20                                   | 21                                     | 21                                    | 21                                      |
|  | p  | 0.07                                 | 0.51                                   | 0.43                                  | 0.56                                    |
| Liječeni PPMS<br>vs neliječeni<br>PPMS | t  | 3                                    | 0.28                                   | 2.39                                  | 0.65                                    |
|  | df | 36                                   | 26                                     | 26                                    | 26                                      |
|  | p  | 0.006**                              | 0.78                                   | 0.02*                                 | 0.52                                    |

PPMS-primarno progresivna multipla skleroza; % - postotci; MFI- od engl. *median fluorescence intensity*; M- aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; df-stupanj slobode; t-t-test. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Liječeni PPMS su pokazali statistički značajno manji postotak CD40+ neklasičnih monocita (p < 0,01) u odnosu na neliječene PPMS te su imali značajno manji postotak CD192+ neklasičnih monocita (p < 0,05) u odnosu na neliječene PPMS (Tablica 8.).

Nije nađena statistički značajna korelacija ni s jednom od varijabli u odnosu na EDSS rezultat.



**Slika 8.** Postotak CD40+ i CD192+ na neklasičnim monocitima u liječenih i neliječenih PPMS ispitanika.

### 4.3. Rezultati ispitivanja koncentracije sNfL

Srednja vrijednost koncentracije sNfL za PPMS ispitanike je bila  $49,39 \pm 25,14$  pg/ml, dok je srednja vrijednost koncentracije sNfL za kontrolnu skupinu bila  $47,59 \pm 18,96$  pg/ml. Naši rezultati koncentracije sNfL pokazuju da nije bilo statistički značajne razlike između pojedinih ispitivanih skupina kod ispitanika s primarno progresivnom multiplom sklerozom (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Prikaz koncentracija neurofilamenata (pg/ml) kod PPMS ispitanika i kontrolne skupine

|                      | PPMS (N=28) |       | Liječeni PPMS (N=15) | Neliječeni PPMS (N=13) | Kontrolna skupina |           | PPMS vs KS | Liječeni PPMS vs KS | Neliječeni PPMS vs KS | Liječeni vs neliječeni PPMS |
|----------------------|-------------|-------|----------------------|------------------------|-------------------|-----------|------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|
| <b>koncentracija</b> | <b>M</b>    | 49.34 | 52.21                | 46.03                  | 47.59             | <b>t</b>  | 0.17       | 0.38                | 0.16                  | 0.64                        |
| <b>pg/ml</b>         | <b>SD</b>   | 25.14 | 29.18                | 20.16                  | 18.96             | <b>df</b> | 34         | 21                  | 19                    | 27                          |
|                      |             |       |                      |                        |                   | <b>p</b>  | 0.86       | 0.7                 | 0.86                  | 0.52                        |

PPMS-primarno progresivna multipla skleroza; KS-kontrolna skupina; M-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; df-stupanj slobode; t- t-test.

## **5. RASPRAVA**



## 5.1. Treg stanice PPMS ispitanika i zdravih kontrola

Dosadašnje studije na Treg stanicama kod osoba oboljelih od MS daju oprečne rezultate. Treg stanice prepoznate su kao jedinstvena populacija stanica koja inhibira funkciju upalnih stanica. Prvobitno su identificirane kao CD4<sup>+</sup> stanice koje izražavaju velike količine CD25, 1980-ih godina. Zbog toga što su ova dva navedena markera Treg dijelili s drugim aktiviranim T stanicama, javila se i sumnja o njihovoj ulozi regulatora autoimunosti. Veliki pomak u identifikaciji Treg-a nastaje 2000-ih godina otkrićem transkripcijskog faktora FOXP3 koji je ujedno i identifikacijski marker, jer se isključivo nalazi na Treg stanicama (193). Treg stanice se definiraju kao CD4<sup>+</sup> stanice koje, uz već spomenuti transkripcijski faktor FOXP3, izražavaju i CD25 (IL-2 receptor  $\alpha$  lanca) te CTLA-4 koji ima ulogu imunološke „kontrolne točke“ jer djeluje kao prekidač isključivanja nakon vezanja za APC. Treg inhibiraju aktivnost i citotoksičnih CD8<sup>+</sup> T limfocita cijelim spektrom mehanizama: od neposredne interakcije stanice sa stanicom do oslobađanja supresivnih citokina (194).

U ovoj studiji svi ispitanici oboljeli od PPMS, liječeni i neliječeni, imaju povećanu ekspresiju FOXP3 na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg stanicama u usporedbi sa zdravim ispitanicima, bez statističke razlike između liječenih i neličenih PPMS. Liječeni su imali nešto veću ekspresiju FOXP3 na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> u usporedbi s neličenim PPMS. Li, Y.F. i suradnici (195) su napravili meta analizu koja uključuje 16 studija; samo 5 studija u toj meta analizi identificira Treg stanice kao CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> stanice, ostale studije Treg većinom identificiraju kao CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> stanice. Studije uključene u meta analizu datirale su od 2009. do 2013. godine. Sabiranjem podataka iz ovih pet studija došli su do zaključka da su Treg stanice smanjene kod osoba oboljelih od MS u odnosu na zdrave kontrole. Ova meta analiza imala je više ograničenja, kao što su uključivanje ispitanika s različitim kliničkim oblicima MS i različitim modalitetima liječenja. Različite vrste terapija su moguće utjecale na proporciju Treg stanica, a eventualni utjecaj različitih terapija unutar tih studija na rezultate je teško ukloniti. Autori su također istaknuli da je potrebno više nezavisnih kohortnih studija s većim brojem ispitanika te da bi se Treg stanice trebale definirati kao CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>.

Rezultati naše studije pokazali su razliku i u postotku Treg stanica. Svi PPMS ispitanici zajedno su imali statistički značajno povećan postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, dok su samo neliječeni PPMS ispitanici imali statistički povećan postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg stanica

u odnosu na kontrolnu skupinu. Gonzales-Oria i suradnici su također pronašli povećan postotak Treg stanica ( $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ ) kod ispitanika oboljelih od MS (RRMS, PPMS, CIS) u odnosu na zdrave ispitanike (196). Za razliku od njih, Kouchaki i suradnici (197) su odredili značajno nižu frekvenciju  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Treg stanica kod ispitanika s MS u odnosu na zdrave ispitanike, dok je frekvencija Treg stanica bila statistički značajno veća kod težih formi MS (PPMS, SPMS) u usporedbi s blažim oblicima (CIS i RRMS) (196). Veća frekvencija Treg-a u težim formama MS-a se može objasniti većom potrebom imunološkog sustava za regulacijom autoimunoga procesa što se slaže i s našim rezultatima povećanog postotka Treg-a kod PPMS ispitanika. Značajno je spomenuti da nije bilo razlike u postotku  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  kod liječenih PPMS u odnosu na kontrole, dok su neliječeni imali povećanje postotka  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  u odnosu na kontrole, što je, smatramo, djelovanje ocrelizumaba u regulaciji autoimunog odgovora kod ocrelizumabom liječenih PPMS. Ocrelizumab nije uzrokovao povećanje CD4 Treg stanica tijekom liječenja, ali je povisio postotak CD8 Treg stanica (198).

CTLA-4 je površinska molekula aktiviranih T stanica koja održava homeostazu imunoga sustava. Modulira imuni odgovor na način da se veže za CD80 i CD86, ometajući interakciju CD80 i CD86 s CD28, te na taj način podiže prag za aktivaciju T stanica, uvelike umanjujući imunološku aktivnost (199). CTLA-4 je izražen na Treg stanicama, ali ga mogu izražavati i druge vrste T stanica, kao što su  $CD4^+$ , nakon aktivacije (200). Iscrpljene T stanice ponekad izražavaju CTLA-4, kao i druge inhibitorne receptore te se pojavljuju kod raznih infekcija, kao što su B i C hepatitis, kod infekcija adenovirusom, virusom limfocitnog koriomeningitisa, polioma virusom te Friend leukemija virusom (201). U ovoj studiji svi PPMS ispitanici su imali povećan postotak  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  (Treg) CTLA-4+ u usporedbi sa zdravim kontrolama. Liječeni PPMS su imali veću razinu statističke značajnosti u postotku  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  (Treg) CTLA-4+ nego neliječeni PPMS, u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji CTLA-4 kod  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Treg stanica između svih PPMS ispitanika i zdravih ispitanika. Sellebjerg i suradnici (202) otkrili su snižen postotak  $CD4^+CD25^{high}$  koje su bile CTLA-4 pozitivne kod neličenih RRMS ispitanika i povećan postotak istih stanica nakon liječenja s IFN- $\beta$ . U našoj studiji pronašli smo statistički značajnije povećanje postotka CTLA-4 Treg kod liječenih PPMS nego kod neličenih PPMS u odnosu na kontrolnu skupinu, iako među te dvije skupine nije bilo statistički značajne razlike. Gore navedeni rezultati većeg postotka CTLA-4 Treg

stanica kod liječenih PPMS mogli bi se pripisati učinku ocrelizumaba, obzirom CTLA-4 umanjuje imunološku aktivnost.

U našoj studiji nismo pronašli korelaciju iznosa EDSS ljestvice i promjena na limfocitima kod PPMS ispitanika (liječenih i neliječenih). Unatoč tome, pronašli smo da statistički značajnije povećanje postotka CTLA-4 Treg stanica kod ocrelizumabom liječenih ispitanika odgovara blagom padu EDSS iznosa (6%) PPMS ispitanika. Rezultat istraživanja ukazuje na to da CTLA-4 koji se nalazi na Treg stanicama, trogocitozom, slično uklanjanju membranskih proteina od strane makrofaga i monocita, uklanja CD80/CD86 molekule s antigen prezentirajućih stanica, i na taj način povećava dostupnost programiranog liganda smrti 1 (PD-L1) na ovim stanicama. PD-L1, molekula koja igra ključnu ulogu u održavanju podnošljivosti na autoantigene, može pridonijeti supresiji abnormalnog imunološkog odgovora kod MS (203), a veći postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Treg) CTLA-4 kod ocrelizumabom liječenih PPMS ispitanika stoga može ukazivati na učinak lijeka.

Neliječeni PPMS ispitanici su imali povećan postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CTLA-4<sup>+</sup> stanica dok su svi PPMS ispitanici, liječeni i neliječeni imali povećanu ekspresiju CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CTLA-4<sup>+</sup> stanica u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovaj rezultat može ukazivati na aktivnost CD4 stanica kao pokušaj regulacije autoimunog odgovora zbog toga što CTLA-4, bez obzira na kojem tipu stanica se nalazi, smanjuje dostupnost CD80/CD86 uklanjajući ih na APC i tako inhibira T staničnu aktivaciju i diferencijaciju (204). Moguće je da se radi o iscrpljenim T stanicama zbog kronične bolesti (202), što spada u prirodu same MS.

Prethodne studije pokazuju oprečne rezultate ekspresije CTLA-4 u odnosu na zdrave kontrole. Dok su neke studije prikazale smanjenu ekspresiju CTLA-4 kod MS ispitanika u usporedbi sa zdravim kontrolama (205-207), drugi nisu pronašli razliku (208-210), a Kosmaczewska i suradnici (211) prikazali su povećan medijan postotka svježe izoliranih perifernih CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> kod MS ispitanika. Razlog ovako oprečnih rezultata u studijama (205-211) može biti zbog različitih formi MS-a (RRMS, PPMS, SPMS, CIS) uključenih u navedene studije. Nijedna od navedenih studija nije istraživala uniformnu skupinu ispitanika, kao što je PPMS.

## 5.2. Razlika monocitnih subpopulacija PPMS ispitanika i zdravih kontrola

Monociti se dijele na tri subpopulacije (klasični  $CD14^{++}CD16^{-}$ , intermedijarni  $CD14^{++}CD16^{+}$  i neklasični  $CD14^{+}CD16^{++}$ ) ovisno o ekspresiji CD14 i CD16 (212). Cirkulirajući monociti i neutrofili luče inflamatorne citokine što dovodi do aksonalnog oštećenja (213,214).  $CD16^{+}$  monociti superiornije aktiviraju T stanice, čime se dolazi do zaključka da aktivno potiču upalu, više nego  $CD14^{+}$  monociti (215) te da efikasnije migriraju kroz krvno moždanu barijeru od limfocita i  $CD14^{+}$  monocita (216). Waschbisch i suradnici (217) podupiru teoriju koja kaže da  $CD16^{+}$  monociti imaju važnu ulogu pri dolasku na mjesto upale u stanju normalnog imunološkog odgovora u SŽS te da  $CD16^{+}$  monociti utječu na propusnost krvno moždane barijere kod autoimunih bolesti SŽS. Hascha i suradnici su dokazali da su neklasični monociti povećani kod RRMS ispitanika liječenih natalizumabom i predlažu imunofenotipiranje mijeloidnih stanica u MS kao metodu pomoći u ranijoj identifikaciji inaktivne RRMS i pospješenu praćenja odgovora na DMT (146). Prethodne studije kod pacijenata sa sistemskim lupusom i sepsom pokazuju da neklasični monociti imaju upalni fenotip nakon aktivacije visokim količinama proupalnih citokina i niskom količinama protuupalnoga IL-10 (147).

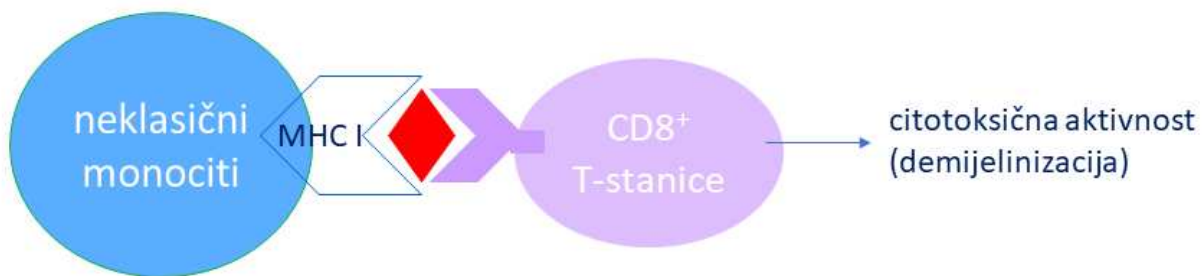
Rezultati naše studije pokazuju značajno smanjenje postotka  $CD40^{+}$  i  $CD192^{+}$  na neklasičnim monocitima ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) liječenih PPMS u usporedbi s neliječenim PPMS. Ekspresija CD192 omogućuje monocitima prelazak krvno moždane barijere (218), dok se monocitni CD40 veže za topljivi CD40 ligand i na taj način pretvara u APC, što dovodi do T i B stanične aktivacije i upale u SŽS-u (219). Stoga naše otkriće smanjenog postotka CD40 i CD192 na neklasičnim monocitima vjerojatno ukazuje na pozitivan utjecaj ocrelizumaba, zbog smanjenog ulaska monocita u SŽS i smanjene aktivacije T i B stanica u usporedbi s neliječenim PPMS.

Klasični monociti mogu imati pro i protuupalna svojstva. Monociti izolirani kod MS pacijenata liječenih glatiramer acetatom, fingolimodom, IFN- $\beta$  ili DMT pokazuju smanjene proupalne, a povećane protuupalne karakteristike (143). U ovoj studiji svi PPMS ispitanici, liječeni i neliječeni, imaju smanjen postotak CD192 na klasičnim monocitima, ali povećanu ekspresiju (MFI). Najveću ekspresiju CD192 imali su liječeni PPMS ispitanici.

U našoj studiji svi PPMS su se razlikovali od kontrolne skupine po povećanoj ekspresiji CD40 na intermedijarnim monocitima. Liječeni PPMS su imali povećanu ekspresiju CD192 u odnosu na kontrolnu skupinu. Intermedijarni monociti koji se smatraju proupalnim, inače imaju

najveću ekspresiju CD40 od svih subpopulacija monocita te se smatraju antigen prezentirajućim stanicama. Tijekom upale monociti i makrofazi imaju važnu ulogu u prezentiranju antigena te su bitni za T i B staničnu aktivaciju preko CD40-CD40L (219). Povećana ekspresija CD40 na intermedijarnim monocitima ispitanika oboljelih od PPMS govori u prilog upalnog zbivanja koji je u podlozi same bolesti. Nalaz povećane ekspresije CD192 na intermedijarnim monocitima kod liječenih ispitanika dokazuje tvrdnju da klasični monociti prelaze u intermedijarne monocite pri čemu se snižava ekspresija CD192 (140,141). U našoj studiji smo dobili povećanu ekspresiju CD192 na klasičnim monocitima koja je bila najizraženija kod liječenih PPMS u odnosu na kontrolnu skupinu.

Neke subpopulacije CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T stanica mogu izražavati CD20 te se zbog toga uspješno uklanjaju anti-CD20 protutijelima (220,221) što je dokaz da anti-CD20 terapija direktno uklanja patogene T stanice koje su CD20<sup>+</sup>. Prisutnost abnormalno proupalnih B stanica, koje služe kao APC, kod neliječenih pacijenata, aktivira potencijalno patogene T i mijeloidne stanice (89). CD16<sup>+</sup> intermedijarni i neklasični monociti služe kao antigen prezentirajuće stanice koje mogu aktivirati CD8<sup>+</sup> citotoksične T stanice i na taj način pridonijeti uništavanju mijelina (138). Wong i suradnici (222) su pronašli najveću ekspresiju MHC klase I (koja je odgovorna za prezentaciju antigena) na intermedijarnim monocitima dok Zawada i suradnici (223) nalaze najveću ekspresiju MHC I na neklasičnim monocitima (Slika 9.). Poznavajući ove korake u patogenezi, možemo pretpostaviti da smanjeni postotak CD40 i CD192 na neklasičnim monocitima liječenih pacijenata u našoj studiji može služiti kao novi marker za pozitivni efekt anti-CD20 terapije.



**Slika 9.** Uloga neklasičnih monocita u demijelinizaciji.

Kratice MHC I (od engl. *Major histocompatibility complex*)

CD16+ monociti većinom postaju migratorne dendritičke stanice (224). Dendritičke CD16+ stanice porijeklom iz monocita pokazuju povećan potencijal za preživljenje nakon fagocitne stimulacije te potiču preživljavanje i diferencijaciju CD16- stanica porijeklom iz monocita. Sve ovo navedeno upućuje na to da su neklasične monocitne subpopulacije superiornije i utječu na sudbinu velikih klasičnih monocitnih subpopulacija. Nedavno je dokazano da se uklanjanjem T i B stanica anti CD20 terapijom mijenjaju njihove interakcije in vivo (225). S obzirom da CD40+ i CD192+ neklasični monociti nemaju CD20 antigen, njihov smanjen postotak kod ocrelizumabom liječenih ispitanika je direktan rezultat promijenjene T i B stanične interakcije.

U našoj studiji nismo pronašli korelaciju EDSS-a i promjena u ekspresiji CD40 i CD192 na monocitnim populacijama kod PPMS ispitanika (liječenih i neliječenih).

### **5.3. Neurofilamenti PPMS ispitanika**

Neurofilamenti su unutarstanični proteini citoskeleta specifični za neuron koji se sastoje od lakog (NfL), srednjeg (NfM) i teškog lanca (NfH) te  $\alpha$ -interneksina i perinefrina. NfL je najviše istraživani kao biomarker neuroloških bolesti od svih navedenih jedinica.

NfL je dugo očekivani biomarker koji se može koristiti kao prognostički marker, ali i kod praćenja uspješnosti liječenja MS te se zadnjih godina intenzivno istražuje. Serumski NfL (sNfL) ima brojne prednosti nad tradicionalnim metodama za praćenje MS progresije kao što su MRI i CFS jer je minimalno invazivna metoda, relativno jeftina te se može često ponavljati da bi se pratila aktivnost bolesti i efikasnost liječenja.

U našoj studiji nismo dobili razliku koncentraciji neurofilamenata među liječenim PPMS, neliječenim PPMS i kontrolne skupine. Ono što je bitno za spomenuti kod određivanja koncentracije neurofilamenata u serumu je važnost određivanja početne koncentracije i naknadnog praćenja povećanja ili smanjenja koncentracije sNfL. Naime postoje i individualne varijacije u vrijednostima NfL kao što su BMI i volumen krvi (184), dob, druge bolesti koje mogu oštetiti periferne živce kao što je dijabetes, te liječenja koja uzrokuju neurotoksičnost primjerice kemoterapija prilikom autologne transplantacije matičnih stanica (226). Stoga se praćenje koncentracije od početne vrijednosti sNfL može koristiti kod pacijenata s MS za monitoriranje subključke aktivnosti bolesti, rizika od relapsa i razvoja Gd+ lezija. Isto tako sNfL ne mogu zamijeniti MRI koja daje informacije o diseminiranosti u prostoru i stadiju lezija (226).

Iako se koncentracija sNfL povećava kod svih formi MS-a ove vrijednosti su najveće kod pacijenata s RRMS, pogotovo tijekom relapsa (176). Još uvijek nije jasno može li se određivanje razine NfL primijeniti na ne-relapsirajuću progresivnu biologiju, uključujući kronične aktivne lezije poput polako rastućih lezija (227). Postoji nekoliko razloga zašto promjene u razinama sNfL možda ne odražavaju dinamiku progresije invaliditeta kod MS-a u odsutnosti akutne upale. Prvo, progresija bolesti kod MS-a možda nije izravno povezana s gubitkom neurona, već je posredovana neuspjehom učinkovite remijelinizacije, proliferacijom astrocita ili kroničnom aktivnom demijelinizacijom povezanim s tinjajućom upalom (228) što dovodi do polako rastućih lezija (ili moguće kombinacije svih ovih mehanizama). Drugo, ako je progresija invaliditeta kod MS-a rezultat sporog, kumulativnog i relativno konstantnog tempa neurodegeneracije, dinamičke promjene u koncentracijama sNfL, koje imaju relativno kratak obrat i vrijeme razgradnje, možda neće biti osjetljive na ovu kroničnu patologiju ili standardne kliničke skale invaliditeta koje se obično koriste za praćenje progresivne forme bolesti (229).

Prognostička vrijednost NfL istraživana je u progresivnoj MS (230) međutim, ove studije nisu razlikovale progresiju povezanu s biologijom relapsa od progresije koja je neovisna o biologiji relapsa, i dokazi ostaju kontradiktorni (231).

Mjerenje neurofilamenata iz CFS radi se standardnim enzimski povezanim imunisorbentnim testom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA*). Tradicionalni ELISA testovi mjere totalnu fluorescenciju te nisu dovoljno osjetljivi da bi identificirali količinu pg/mL koje su prisutne u krvi. Predominantna metoda za određivanje sNfL je “Simoa” (engl. *single-molecule array*) imunoesej baziran na bojom označenim magnetskim kuglicama koje su obložene protutijelom. Simoa je dovoljno osjetljiva da otkrije pojedinačnu molekulu NfL koja je vezana na kuglicu (227). U budućim istraživanjima bismo mogli pratiti kretanje FOXP3 i CTLA-4 na Treg stanicama te CD40 i CD192 na monocitnim subpopulacijama osoba oboljelih od PPMS. Poseban akcent bio bi na longitudinalno praćenje pacijenata i usporedbe kretanja navedenih markera sa standardnim metodama dijagnostike i praćenja PPMS te uspješnosti liječenja ocrelizumabom. Longitudinalnim praćenjem dobio bi se bolji uvid u kliničku značajnost ekspresije CD40 i CD192 na monocitnim subpopulacijama te FOXP3 i CTLA-4 na Treg stanicama kod osoba oboljelih od PPMS.

Što se tiče određivanja koncentracije neurofilamenata koji su trenutno najistraživaniji biomarker za MS, također je potrebno longitudinalno praćenje pogotovo kod PPMS bolesnika pošto je korelacija s tijekom bolesti kod takvih pacijenata još uvijek prilično nejasna. Uбудuće se preporuča koristiti Simoa imunoesej umjesto ELISA testa. Posebno bi bilo vrijedno nastaviti i istraživanja na monocitnim subpopulacijama i Treg stanicama zbog boljeg razumijevanja imunologije bolesti i eventualnog otkrivanja novih biomarkera koji bi pomogli dijagnostici, praćenju tijeka bolesti i liječenja PPMS.

Glavna limitacija ove studije je broj ispitanika oboljelih od PPMS. U budućnosti predlažemo ispitivanja na većem broju ispitanika, po mogućnosti na nacionalnoj razini. Nadalje, potrebno je već spomenuto longitudinalno praćenje pacijenata te korištenje Simoa imunoesej pošto je daleko osjetljiviji od ELISA testa.



## **6. ZAKLJUČCI**

1. Svi PPMS ispitanici imali su značajno povećan postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg stanica u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su samo neliječeni PPMS imali statistički povećan postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg stanica u odnosu na kontrolnu skupinu. Nalaz povećanog postotka CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg stanica kod svih PPMS ispitanika upućuje na pokušaj supresije upalnog zbivanja Treg stanicama povećanjem broja Trega. Ocrelizumabom liječeni PPMS se nisu razlikovali od kontrolne skupine u postotku CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg stanica, samo su neliječeni imali značajno povećan postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>FOXP3<sup>+</sup> u odnosu na kontrolnu skupinu. Taj rezultat može upućivati na benefit ocrelizumaba u vidu smirivanja upalnog procesa kod liječenih PPMS ispitanika, pošto nismo našli razliku u postotku CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg stanica između liječenih PPMS i kontrolne skupine.

2. CTLA-4 molekula podiže prag za aktivaciju T stanica i na taj način umanjuje imunološku aktivnost. U ovoj studiji svi PPMS ispitanici su imali povećan postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> (Treg) CTLA-4<sup>+</sup> u usporedbi sa zdravim kontrolama. Liječeni PPMS su imali veću razinu statističke značajnosti u postotku CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> (Treg) CTLA-4<sup>+</sup> nego neliječeni PPMS, u usporedbi s kontrolnom skupinom što se može pripisati učinku ocrelizumaba.

3. Neliječeni PPMS ispitanici su imali povećan postotak CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CTLA-4<sup>+</sup> stanica u odnosu na kontrolnu skupinu. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CTLA-4<sup>+</sup> stanice smatraju se iscrpljenim T stanicama koje se javljaju kod kroničnih bolesti. Ocrelizumabom liječeni PPMS nisu se razlikovali u postotku CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CTLA-4<sup>+</sup> iscrpljenih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu što se može povezati s učinkom lijeka.

4. Rezultati naše studije pokazuju značajno smanjenje postotka CD40<sup>+</sup> i CD192<sup>+</sup> na neklasičnim monocitima (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) liječenih PPMS u usporedbi s neliječenim PPMS. Ekspresija CD192 omogućuje monocitima prelazak krvno moždane barijere dok se monocitni CD40 dovodi do T i B stanične aktivacije i upale u SŽS-u. Stoga naše otkriće smanjenog postotka CD40 i CD192 na neklasičnim monocitima vjerojatno ukazuje na pozitivan utjecaj ocrelizumaba, zbog smanjenog ulaska monocita u SŽS i smanjene aktivacije T i B stanica u usporedbi s neliječenim PPMS.

5. U našoj studiji nismo dobili razliku u koncentraciji neurofilamenata među liječenim PPMS, neliječenim PPMS i kontrolne skupine. Pošto je sNfL biomarker koji se intenzivno istražuje za dijagnostiku i praćenje liječenja u MS, potrebno je u budućnosti nastaviti istraživanja na osjetljivijim Simoa immunoesejima te ispitanike uključiti u longitudinalno praćenje.

## **7. LITERATURA**

1. Axisa PP, Hafler DA. Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. *Current Opinion in Neurology*. 2016 Jun;29(3):345–53.
2. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Multiple Sclerosis Journal*. 2017 Feb;23(8):1123–36.
3. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014 Sep 8;83(11):1022–4.
4. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2002 Apr;359(9313):1221–31.
5. Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Revue neurologique*. 2016;172(1):3–13.
6. Benjak T, Štefančić V, Draušnik Ž, Cerovečki I, Roginić D, Habek M, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Croatia: data from national and non-governmental organization registries. *Croatian Medical Journal*. 2018 Apr;59(2):65–70.
7. Svjetski Dan multiple skleroze [Internet]. [cited 2024 Nov 26]. Available from: <https://www.hzjz.hr/news-2/svjetski-dan-multiple-skleroze-2/>
8. Naseri A, Nasiri E, Sahraian MA, Daneshvar S, Talebi M. Clinical Features of Late-Onset Multiple Sclerosis: a Systematic Review and Meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2021 May;50:102816.
9. Català-Senent JF, Andreu Z, Hidalgo MR, Soler-Sáez I, Roig FJ, Yanguas-Casás N, et al. A deep transcriptome meta-analysis reveals sex differences in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2023 Jun 1;181:106113.
10. Muñoz-Culla M, Irizar H, Sáenz-Cuesta M, Castillo-Triviño T, Osorio-Querejeta I, Sepúlveda L, et al. SncRNA (microRNA & snoRNA) opposite expression pattern found in multiple sclerosis relapse and remission is sex dependent. *Sci Rep*. 2016 Feb 1;6:20126.
11. Voskuhl RR. The effect of sex on multiple sclerosis risk and disease progression. *Mult Scler*. 2020 Apr;26(5):554-60.

12. Lasrado N, Jia T, Massilamany C, Franco R, Illes Z, Reddy J. Mechanisms of sex hormones in autoimmunity: focus on EAE. *Biol Sex Differ*. 2020 Sep 7;11(1):50.
13. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2018 Apr 21;391(10130):1622-36.
14. Zandman-Goddard G, Peeva E, Shoenfeld Y. Gender and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2007 Jun;6(6):366-72.
15. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):727-39.
16. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015 Nov;64:13-25.
17. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2015; 47: 1107–13.
18. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2013; 45: 1353–60.
19. Willer CJ, Dymant DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 28;100(22):12877-82.
20. Bu GL, Xie C, Kang YF, Zeng MS, Sun C. How EBV Infects: The Tropism and Underlying Molecular Mechanism for Viral Infection. *Viruses*. 2022 Oct 27;14(11):2372.
21. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
22. Ascherio A, Munger KL. EBV and Autoimmunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;390(Pt 1):365-85.
23. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and the risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010 Jun;67(6):824-30.
24. Rosso M, Chitnis T. Association Between Cigarette Smoking and Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA Neurol*. 2020 Feb 1;77(2):245-53.

25. Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 2009 Sep 1;73(9):696-701.
26. Bäärnhielm M, Hedström AK, Kockum I, Sundqvist E, Gustafsson SA, Hillert J, et al. Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen-DRB1\*15. *Eur J Neurol*. 2012 Jul;19(7):955-62.
27. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006 Dec 20;296(23):2832-8.
28. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. Body mass index during adolescence, rather than childhood, is critical in determining MS risk. *Mult Scler*. 2016 Jun;22(7):878-83.
29. Baranowska-Bik A, Uchman D, Litwiniuk A, Kalisz M, Martyńska L, Baranowska B, et al. Peripheral levels of selected adipokines in patients with newly diagnosed multiple sclerosis. *Endokrynol Pol*. 2020;71(2):109-15.
30. Kvistad SS, Myhr KM, Holmøy T, Šaltytė Benth J, Wergeland S, Beiske AG, et al. Body mass index influence interferon-beta treatment response in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2015 Nov 15;288:92-7.
31. Rijnsburger M, Djuric N, Mulder IA, de Vries HE. Adipokines as Immune Cell Modulators in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 7;22(19):10845.
32. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009 Mar 3;72(9):800-5.
33. Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, Sormani MP, Pelletier D, Okuda DT. Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event. *Annals of Neurology*. 2020 Aug;88(2):407-17.
34. Okuda DT, Siva A, Kantarci O, Inglese M, Katz I, Tutuncu M, et al. Radiologically Isolated Syndrome: 5-Year Risk for an Initial Clinical Event. *PLoS ONE*. 2014 Mar 5;9(3):e90509.

35. Lebrun-Fréney C, Rollot F, Mondot L, Zephir H, Louapre C, Le Page E, et al. Risk Factors and Time to Clinical Symptoms of Multiple Sclerosis Among Patients With Radiologically Isolated Syndrome. *JAMA Netw Open*. 2021 Oct 11;4(10):e2128271.
36. Tintore M, Rovira A, Arrambide G, Mitjana R, Río J, Auger C, et al. Brainstem lesions in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010 Nov 23;75(21):1933-8.
37. Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008 Mar 25;70(13 Pt 2):1079-83.
38. Crnošija L, Gabelić T, Barun B, Adamec I, Krbot Skorić M, Habek M. Evoked potentials can predict future disability in people with clinically isolated syndrome. *Euro J of Neurology*. 2020 Mar;27(3):437-44.
39. Brinar V, Adamec I, Barun B, Bilić E, Borovečki F, Gabelić T, et al. *Neurologija za medicinare*. 2. obnovljeno i dopunjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. 610 p.
40. Lublin FD. Relapses do not matter in relation to long-term disability: no (they do). *Mult Scler*. 2011 Dec;17(12):1415-6.
41. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol*. 2006 Apr;5(4):343-54.
42. Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, Muraro PA, Ebers GC. Onset of secondary progressive phase and long-term evolution of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Jan;85(1):67-75.
43. Plantone D, De Angelis F, Doshi A, Chataway J. Secondary Progressive Multiple Sclerosis: Definition and Measurement. *CNS Drugs*. 2016 Jun;30(6):517-26.
44. Antel J, Antel S, Caramanos Z, Arnold DL, Kuhlmann T. Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity? *Acta Neuropathol*. 2012 May;123(5):627-38.

45. Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, Calabresi PA, Antel J, Simon J, et al. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Annals of Neurology*. 2009 Oct;66(4):460-71.
46. Ontaneda D. Progressive Multiple Sclerosis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2019 Jun;25(3):736-52.
47. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology*. 2014 Jul 15;83(3):278-86.
48. Katz Sand I, Krieger S, Farrell C, Miller AE. Diagnostic uncertainty during the transition to secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014 Oct;20(12):1654-7.
49. Kingwell E, Leung AL, Roger E, Duquette P, Rieckmann P, Tremlett H. Factors associated with delay to medical recognition in two Canadian multiple sclerosis cohorts. *Journal of the Neurological Sciences*. 2010 May;292(1-2):57-62.
50. Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi M, Montalban X, et al. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 1997 Jun 1;120(6):1085-96.
51. Vugmeyster Y, Beyer J, Howell K, Combs D, Fielder P, Yang J, et al. Depletion of B Cells by a Humanized Anti-CD20 Antibody PRO70769 in *Macaca Fascicularis*. *Journal of Immunotherapy*. 2005 May;28(3):212-9.
52. Dörner T, Burmester GR. New approaches of B-cell-directed therapy: beyond rituximab. *Current Opinion in Rheumatology*. 2008 May;20(3):263-8..
53. Parolini D, Cassinelli L, Razini P, Sitzia C, Tonna N, Erratico S, et al. Expression of CD20 reveals a new store-operated calcium entry modulator in skeletal muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012 Dec;44(12):2095-105.
54. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. 1980 Oct;125(4):1678-85.
55. Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, et al. Rituximab Efficiently Depletes Increased CD20-Expressing T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *The Journal of Immunology*. 2014 Jul 15;193(2):580-6.



56. Stahnke AM, Holt KM. Ocrelizumab: A New B-cell Therapy for Relapsing Remitting and Primary Progressive Multiple Sclerosis. *Ann Pharmacother.* 2018 May;52(5):473-83.
57. Montalban X, Belachew S, Wolinsky JS. Ocrelizumab in Primary Progressive and Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017 Apr 27;376(17):1694.
58. Morschhauser F, Marlton P, Vitolo U, Lindén O, Seymour J, Crump M, et al. Results of a phase I/II study of ocrelizumab, a fully humanized anti-CD20 mAb, in patients with relapsed/refractory follicular lymphoma. *Annals of Oncology.* 2010 Sep;21(9):1870-6.
59. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004 Jun 17;350(25):2572-81.
60. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017 Jan 19;376(3):221-34.
61. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med.* 2020 Dec;133(12):1380-90.e2.
62. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron.* 2018 Feb;97(4):742-68.
63. Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med.* 2015 Oct 21;7(310):310ra166.
64. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 2011 Sep;134(Pt 9):2755-71.
65. Laurent SA, Strauli NB, Eggers EL, Wu H, Michel B, Demuth S, et al. Effect of Ocrelizumab on B- and T-Cell Receptor Repertoire Diversity in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis From the Randomized Phase III OPERA Trial. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2023 Jul;10(4):e200118.

66. Gingele S, Skripuletz T, Jacobs R. Role of CD20<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis: implications for treatment with ocrelizumab. *Neural Regen Res.* 2020 Apr;15(4):663-64.
67. Gingele S, Jacobus TL, Konen FF, Hümmert MW, Sühs K, Schwenkenbecher P, et al. Ocrelizumab Depletes CD20<sup>+</sup> T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Cells.* 2018 Dec 28;8(1):12.
68. Derfuss T, Weber M, Hughes R, Eggebrecht J, Wang Q, Sauter A, et al. P36 Serum immunoglobulin levels and risk of serious infections in the pivotal phase III trials of ocrelizumab in multiple sclerosis and their open-label extensions. *Clinical Neurophysiology.* 2020 Apr;131(4):e196.
69. Lisak RP, Nedelkoska L, Benjamins JA, Schalk D, Bealmear B, Touil H, et al. B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro. *Journal of Neuroimmunology.* 2017 Aug;309:88-99.
70. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jun;9(6):393-407.
71. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015 Sep 15;15(9):545-58.
72. van Langelaar J, Rijvers L, Smolders J, van Luijn MM. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front Immunol.* 2020 May 8;11:760.
73. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007 Aug 30;357(9):851-62.
74. Hellings N, Barée M, Verhoeven C, D'hooghe MB, Medaer R, Bernard CC, et al. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res.* 2001 Feb 1;63(3):290-302.
75. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2004 Mar 15;172(6):3893-904.

76. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004 Apr 5;199(7):971-9.
77. Villar LM, Casanova B, Ouamara N, Comabella M, Jalili F, Leppert D, et al. Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2014 Aug;76(2):231-40.
78. Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cellular Immunology*. 1989 Nov;124(1):132-43.
79. Voskuhl RR, Martin R, Bergman C, Dalal M, Ruddle NH, McFarland HF. T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity*. 1993;15(2):137-43.
80. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002 May;8(5):500-8.
81. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA Jr. Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med*. 1993 Jan 1;177(1):57-68.
82. Hutchinson M. Natalizumab: A new treatment for relapsing remitting multiple sclerosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2007 Apr;3(2):259-68.
83. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *The American Journal of Pathology*. 2008 Jan;172(1):146-55.
84. Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Özenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999 Apr;5(2):101-4.

85. Brucklacher-Waldert V, Stuerner K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2009 Dec;132(12):3329-41.
86. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):4712-6.
87. Tapia-Maltos M, Treviño-Frenk I, García-González H, Rosetti M, Barriga-Maldonado V, Morales-Ramírez F, et al. Identification of regulatory T cell molecules associated with severity of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2021 Oct;27(11):1695-705.
88. Li R, Rezk A, Healy LM, Muirhead G, Prat A, Gommerman JL, Bar-Or A; MSSRF Canadian B cells in MS Team. Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2016 Jan 8;6:626..
89. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol*. 2010 Apr;67(4):452-61.
90. Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2002 Apr;249(4):375-89.
91. Kouwenhoven M, Teleshova N, Özenci V, Press R, Link H. Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile. *Journal of Neuroimmunology*. 2001 Jan;112(1-2):197-205.
92. Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *Journal of Autoimmunity*. 2014 Feb;48-49:134-42.
93. Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2013 Oct;333(1-2):1-4.
94. 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 Jan 29;338(5):278-85.

95. Prineas JW, Kwon EE, Cho E, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, et al. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2001 Nov;50(5):646-57.
96. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009 May;132(5):1175-89.
97. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012 Nov 5;8(11):647-56.
98. Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019 Jan 10;9:3116.
99. Göschl L, Scheinecker C, Bonelli M. Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Semin Immunopathol*. 2019 May;41(3):301-14.
100. Burnet FM. A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production using the Concept of Clonal Selection. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 1976 Mar 1;26(2):119-21.
101. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
102. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004 Mar;5(3):266-71.
103. Tung KS, Harakal J, Qiao H, Rival C, Li JC, Paul AG, et al. Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. *Journal of Clinical Investigation*. 2017 Feb 20;127(3):1046-60.
104. Ali N, Zirak B, Rodriguez RS, Pauli ML, Truong H, Lai K, et al. Regulatory T Cells in Skin Facilitate Epithelial Stem Cell Differentiation. *Cell*. 2017 Jun;169(6):1119-1129.e11.

105. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al. A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair. *Cell*. 2013 Dec;155(6):1282-95.
106. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, Kamei N, Lee J, Shoelson SE, et al. PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature*. 2012 Jun;486(7404):549-53.
107. Deliyanti D, Talia DM, Zhu T, Maxwell MJ, Agrotis A, Jerome JR, et al. Foxp3<sup>+</sup> Tregs are recruited to the retina to repair pathological angiogenesis. *Nat Commun*. 2017 Sep 29;8(1):748.
108. Knochelmann HM, Dwyer CJ, Bailey SR, Amaya SM, Elston DM, Mazza-McCrann JM, et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cell Mol Immunol*. 2018 May;15(5):458-69.
109. Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*. 2008 Jan;28(1):100-11.
110. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CJ, et al. Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire. *Immunity*. 2008 Jan;28(1):112-21.
111. Zhengl SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2018-27.
112. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86.
113. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:245-68.
114. Lin JX, Leonard WJ. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Dec;8(4):313-32.

115. Georgiev P, Charbonnier L, Chatila TA. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *J Clin Immunol*. 2019 Oct;39(7):623-40.
116. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36(1):411-33.
117. Scheinecker C, Göschl L, Bonelli M. Treg cells in health and autoimmune diseases: New insights from single cell analysis. *Journal of Autoimmunity*. 2020 Jun;110:102376.
118. Vignoli M, Ciullini Mannurita S, Fioravanti A, Tumino M, Grassi A, Guariso G, et al. CD25 deficiency: A new conformational mutation prevents the receptor expression on cell surface. *Clinical Immunology*. 2019 Apr;201:15-9.
119. Xiao Y, Li B, Zhou Z, Hancock WW, Zhang H, Greene MI. Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function. *Current Opinion in Immunology*. 2010 Oct;22(5):583-91.
120. Colamatteo A, Carbone F, Bruzzaniti S, Galgani M, Fusco C, Maniscalco GT, et al. Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Front Immunol*. 2020 Feb 3;10:3136.
121. Hsieh CS, Lee HM, Lio CW. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb 10;12(3):157-67.
122. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007 Feb;5(2):e38.
123. Ben-Skowronek I. IPEX Syndrome: Genetics and Treatment Options. *Genes (Basel)*. 2021 Feb 24;12(3):323.
124. Hossen MM, Ma Y, Yin Z, Xia Y, Du J, Huang JY, et al. Current understanding of CTLA-4: from mechanism to autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2023;14:1198365.
125. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*. 2016 May 17;44(5):973-88.
126. Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*. 2002 Jun;16(6):769-77.

127. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity*. 1995 Jul;3(1):87-98.
128. Schwartz RH. T Cell Anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003 Apr;21(1):305-34.
129. Alegre M, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*. 2001 Dec;1(3):220-8.
130. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1353-62.
131. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600-3.
132. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011 Sep;12(9):870-8.
133. Kempkes RWM, Joosten I, Koenen HJPM, He X. Metabolic Pathways Involved in Regulatory T Cell Functionality. *Front Immunol*. 2019 Dec 3;10:2839.
134. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018 Oct 16;49(4):595-613.
135. McKim DB, Yin W, Wang Y, Cole SW, Godbout JP, Sheridan JF. Social Stress Mobilizes Hematopoietic Stem Cells to Establish Persistent Splenic Myelopoiesis. *Cell Reports*. 2018 Nov;25(9):2552-62.e3.
136. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019 Jul 25;106(2):309-22.
137. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science*. 2009 Jul 31;325(5940):612-6.



138. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012 Sep;53(1-3):41-57.
139. Lund H, Boysen P, Åkesson CP, Lewandowska-Sabat AM, Storset AK. Transient Migration of Large Numbers of CD14(++) CD16(+) Monocytes to the Draining Lymph Node after Onset of Inflammation. *Front Immunol.* 2016 Aug 29;7:322.
140. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine.* 2017 Jul 3;214(7):1913-23.
141. Ożańska A, Szymczak D, Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand J Immunol.* 2020 Jul;92(1):e12883.
142. Mishra MK, Yong VW. Myeloid cells - targets of medication in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2016 Sep;12(9):539-51.
143. Haase S, Linker RA. Inflammation in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 2021 Apr 16;14:17562864211007687.
144. Spiteri AG, Wishart CL, Pamphlett R, Locatelli G, King NJC. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function. *Acta Neuropathol.* 2022 Feb;143(2):179-224.
145. Strizova Z, Benesova I, Bartolini R, Novyzedlak R, Cecdlova E, Foley LK, et al. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality. *Clin Sci (Lond).* 2023 Aug 14;137(15):1067-93.
146. Haschka D, Tymoszek P, Bsteh G, Petzer V, Berek K, Theurl I, et al. Expansion of Neutrophils and Classical and Nonclassical Monocytes as a Hallmark in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2020 Apr 29;11:594.
147. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* 2015 Sep 11;5:13886.

148. Ong SM, Hadadi E, Dang TM, Yeap WH, Tan CT, Ng TP, et al. The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 15;9(3):266.
149. Makinde HM, Cuda CM, Just TB, Perlman HR, Schwulst SJ. Nonclassical Monocytes Mediate Secondary Injury, Neurocognitive Outcome, and Neutrophil Infiltration after Traumatic Brain Injury. *The Journal of Immunology.* 2017 Nov 15;199(10):3583-91.
150. Padgett LE, Marcovecchio PM, Olingy CE, Araujo DJ, Steel K, Dinh HQ, et al. Nonclassical monocytes potentiate anti-tumoral CD8<sup>+</sup> T cell responses in the lungs. *Front Immunol.* 2023 Jun 22;14:1101497.
151. Carstensen M, Christensen T, Stilund M, Møller HJ, Petersen EL, Petersen T. Activated monocytes and markers of inflammation in newly diagnosed multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol.* 2020 Aug;98(7):549-62.
152. Mohamed H, Saleh R, Taha S, Mohamed S, Kamal N. MONOCYTE SUBSETS IN RELAPSING REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS EGYPTIAN PATIENTS. *Ain Shams Medical Journal.* 2023 Sep 1;74(3):719-27.
153. Gjelstrup MC, Stilund M, Petersen T, Møller HJ, Petersen EL, Christensen T. Subsets of activated monocytes and markers of inflammation in incipient and progressed multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol.* 2018 Feb;96(2):160-74.
154. Monteclaro FS, Charo IF. The Amino-terminal Domain of CCR2 Is Both Necessary and Sufficient for High Affinity Binding of Monocyte Chemoattractant Protein 1. *Journal of Biological Chemistry.* 1997 Sep;272(37):23186-90.
155. Mulet M, Blasco-Ibáñez JM, Kirstein M, Crespo C, Nacher J, Varea E. Phenotypic characterization of MCP-1 expressing neurons in the rat cerebral cortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 2020 Jul;106:101785.
156. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Oct 28;94(22):12053-8.

157. Moore UM, Kaplow JM, Pleass RD, Castro SW, Naik K, Lynch CN, et al. Monocyte chemoattractant protein-2 is a potent agonist of CCR2B. *Journal of Leukocyte Biology*. 1997 Dec 1;62(6):911-5.
158. Tsou C, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007 Apr 2;117(4):902-9.
159. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice Lacking the Cc Chemokine Receptor (Ccr2). *The Journal of Experimental Medicine*. 2000 Oct 2;192(7):1075-80.
160. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. Cc Chemokine Receptor 2 Is Critical for Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000 Sep 18;192(6):899-905.
161. Giladi A, Wagner LK, Li H, Dörr D, Medaglia C, Paul F, et al. Cxcl10+ monocytes define a pathogenic subset in the central nervous system during autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2020 May 1;21(5):525-34.
162. Varvel NH, Neher JJ, Bosch A, Wang W, Ransohoff RM, Miller RJ, et al. Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Sep 20;113(38):E5665-74.
163. Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews*. 2009 May;229(1):152-72.
164. Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:307-28.
165. Ots HD, Tracz JA, Vinokuroff KE, Musto AE. CD40-CD40L in Neurological Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 8;23(8):4115.
166. Aarts SABM, Seijkens TTP, van Dorst KJF, Dijkstra CD, Kooij G, Lutgens E. The CD40-CD40L Dyad in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2017 Dec 12;8:1791.

167. Yuan A, Rao MV, Sasaki T, Chen Y, Kumar A, Veeranna RKH, et al.  $\alpha$ -Internexin Is Structurally and Functionally Associated with the Neurofilament Triplet Proteins in the Mature CNS. *J Neurosci*. 2006 Sep 27;26(39):10006-19.
168. Yuan A, Sasaki T, Kumar A, Peterhoff CM, Rao MV, Liem RK, et al. Peripherin Is a Subunit of Peripheral Nerve Neurofilaments: Implications for Differential Vulnerability of CNS and Peripheral Nervous System Axons. *Journal of Neuroscience*. 2012 Jun 20;32(25):8501-8.
169. Gentil BJ, Tibshirani M, Durham HD. Neurofilament dynamics and involvement in neurological disorders. *Cell Tissue Res*. 2015 Jun;360(3):609-20.
170. Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, Eyer J. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci*. 2009 Sep 2;29(35):11043-54.
171. Barry DM, Stevenson W, Bober BG, Wiese PJ, Dale JM, Barry GS, et al. Expansion of neurofilament medium C terminus increases axonal diameter independent of increases in conduction velocity or myelin thickness. *J Neurosci*. 2012 May 2;32(18):6209-19.
172. Kim HJ, Kim SB, Kim HS, Kwon HM, Park JH, Lee AJ, et al. Phenotypic heterogeneity in patients with NEFL-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Mol Genet Genomic Med*. 2022 Feb;10(2):e1870.
173. Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meiningner V, Dib M, Rouleau GA, et al. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 1994;3(10):1757-61.
174. Gaiottino J, Norgren N, Dobson R, Topping J, Nissim A, Malaspina A, et al. Increased Neurofilament Light Chain Blood Levels in Neurodegenerative Neurological Diseases. *PLoS ONE*. 2013 Sep 20;8(9):e75091.
175. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018 Oct;14(10):577-89.

176. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2017 Jun;81(6):857-70.
177. Kuhle J, Barro C, Disanto G, Mathias A, Soneson C, Bonnier G, et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler*. 2016 Oct;22(12):1550-9.
178. Piehl F, Kockum I, Khademi M, Blennow K, Lycke J, Zetterberg H, et al. Plasma neurofilament light chain levels in patients with MS switching from injectable therapies to fingolimod. *Mult Scler*. 2018 Jul;24(8):1046-54.
179. Wilke C, Preische O, Deuschle C, Roeben B, Apel A, Barro C, et al. Neurofilament light chain in FTD is elevated not only in cerebrospinal fluid, but also in serum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Nov;87(11):1270-2.
180. Lu CH, Macdonald-Wallis C, Gray E, Pearce N, Petzold A, Norgren N, et al. Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2015 Jun 2;84(22):2247-57.
181. Meeter LH, Dopfer EG, Jiskoot LC, Sanchez-Valle R, Graff C, Benussi L, et al. Neurofilament light chain: a biomarker for genetic frontotemporal dementia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016 Aug;3(8):623-36.
182. Bar-Or A, Thanei G, Harp C, Bernasconi C, Bonati U, Cross AH, et al. Blood neurofilament light levels predict non-relapsing progression following anti-CD20 therapy in relapsing and primary progressive multiple sclerosis: findings from the ocrelizumab randomised, double-blind phase 3 clinical trials. *eBioMedicine*. 2023 Jul;93:104662.
183. Zhou F, Chen D, Li H, Zhu C, Shen Y, Peng Z, et al. The Association of Serum Neurofilament Light Chain and Acute Ischaemic Stroke Is Influenced by Effective Revascularization. *Disease Markers*. 2022 May 3;2022:1-6.

184. Anderson V, Bentley E, Loveless S, Bianchi L, Harding KE, Wynford-Thomas RA, et al. Serum neurofilament-light concentration and real-world outcome in MS. *Journal of the Neurological Sciences*. 2020 Oct;417:117079.
185. Delcoigne B, Manouchehrinia A, Barro C, Benkert P, Michalak Z, Kappos L, et al. Blood neurofilament light levels segregate treatment effects in multiple sclerosis. *Neurology*. 2020 Mar 17;94(11):e1201-e1212.
186. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, Manouchehrinia A, Yaldizli Ö, Maceski A, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *The Lancet Neurology*. 2022 Mar;21(3):246-57.
187. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain*. 2018 Aug 1;141(8):2382-91.
188. Kapoor R, Smith KE, Allegretta M, Arnold DL, Carroll W, Comabella M, et al. Serum neurofilament light as a biomarker in progressive multiple sclerosis. *Neurology*. 2020 Sep 8;95(10):436-44.
189. Kuhle J, Plavina T, Barro C, Disanto G, Sangurdekar D, Singh CM, et al. Neurofilament light levels are associated with long-term outcomes in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2020 Nov;26(13):1691-9.
190. Leppert D, Kropshofer H, Häring DA, Dahlke F, Patil A, Meinert R, et al. Blood Neurofilament Light in Progressive Multiple Sclerosis: Post Hoc Analysis of 2 Randomized Controlled Trials. *Neurology*. 2022 May 24;98(21):e2120-e2131.
191. Ziemssen T, Arnold DL, Alvarez E, Cross AH, Willi R, Li B, et al. Prognostic Value of Serum Neurofilament Light Chain for Disease Activity and Worsening in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis: Results From the Phase 3 ASCLEPIOS I and II Trials. *Front Immunol*. 2022 Mar 31;13:852563.

192. Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, Axelsson M, Khademi M, Gunnarsson M, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*. 2017 Nov 28;89(22):2230-7.
193. Benoist C, Mathis D. Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Sep 1;4(9):a007021.
194. Calahorra L, Camacho-Toledano C, Serrano-Regal MP, Ortega MC, Clemente D. Regulatory Cells in Multiple Sclerosis: From Blood to Brain. *Biomedicines*. 2022 Feb 1;10(2):335.
195. Li YF, Zhang SX, Ma XW, Xue YL, Gao C, Li XY, et al. The proportion of peripheral regulatory T cells in patients with Multiple Sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019 Feb;28:75-80.
196. González-Oria MC, Márquez-Coello M, Girón-Ortega JA, Argente J, Moya M, Girón-González JA. Monocyte and Lymphocyte Activation and Regulation in Multiple Sclerosis Patients. *Therapy Effects. J Neuroimmune Pharmacol*. 2019 Sep;14(3):413-22.
197. Kouchaki E, Salehi M, Reza Sharif M, Nikoueinejad H, Akbari H. Numerical status of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) and CD8(+)CD28(-) regulatory T cells in multiple sclerosis. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17(4):250-5.
198. Howlett-Prieto Q, Fengl X, Kramer JF, Kramer KJ, Houston TW, Reder AT. Anti-CD20 therapy corrects a CD8 regulatory T cell deficit in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2021 Dec;27(14):2170-9.
199. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol*. 2018 Mar 28;8:86.
200. Chan DV, Gibson HM, Aufiero BM, Wilson AJ, Hafner MS, Mi QS, et al. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immun*. 2014 Jan;15(1):25-32.
201. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010 Apr;129(4):474-81.

202. Sellebjerg F, Krakauer M, Khademi M, Olsson T, Sørensen PS. FOXP3, CBLB and ITCH gene expression and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression on CD4(+) CD25(high) T cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2012 Nov;170(2):149-55.
203. Medina S, Sainz de la Maza S, Villarrubia N, Álvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, Arroyo R, et al. Teriflunomide induces a tolerogenic bias in blood immune cells of MS patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Jan 15;6(2):355-63.
204. Rabe H, Lundell AC, Andersson K, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Higher proportions of circulating FOXP3+ and CTLA-4+ regulatory T cells are associated with lower fractions of memory CD4+ T cells in infants. *J Leukoc Biol*. 2011 Dec;90(6):1133-40.
205. Mohammadzadeh A, Rad IA, Ahmadi-Salmasi B. CTLA-4, PD-1 and TIM-3 expression predominantly downregulated in MS patients. *Journal of Neuroimmunology*. 2018 Oct;323:105-8.
206. Wang H, Wang K, Zhong X, Dai Y, Wu A, Li Y, et al. Plasma sCD28, sCTLA-4 levels in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Neuroimmunol*. 2012 Feb 29;243(1-2):52-5.
207. Derakhshani A, Asadzadeh Z, Safarpour H, Leone P, Shadbad MA, Heydari A, et al. Regulation of CTLA-4 and PD-L1 Expression in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients after Treatment with Fingolimod, IFN $\beta$ -1 $\alpha$ , Glatiramer Acetate, and Dimethyl Fumarate Drugs. *J Pers Med*. 2021 Jul 27;11(8):721.
208. Mena E, Rohowsky-Kochan C. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood mononuclear cells in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1999 Aug;100(2):92-6.
209. Lavon I, Heli C, Brill L, Charbit H, Vaknin-Dembinsky A. Blood Levels of Co-inhibitory Receptors: A Biomarker of Disease Prognosis in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019 Apr 30;10:835.
210. Oliveira EM, Bar-Or A, Waliszewska AI, Cai G, Anderson DE, Krieger JI, et al. CTLA-4 dysregulation in the activation of myelin basic protein reactive T cells may distinguish patients with multiple sclerosis from healthy controls. *J Autoimmun*. 2003 Feb;20(1):71-81.



211. Kosmaczewska A, Bilinska M, Ciszak L, Noga L, Pawlak E, Szteblich A, et al. Different patterns of activation markers expression and CD4+ T-cell responses to ex vivo stimulation in patients with clinically quiescent multiple sclerosis (MS). *J Neuroimmunol*. 2007 Sep;189(1-2):137-46.
212. Bar-Or A. The immunology of multiple sclerosis. *Semin Neurol*. 2008 Feb;28(1):29-45.
213. Steinbach K, Piedavent M, Bauer S, Neumann JT, Friese MA. Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4531-9.
214. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating monocytes trigger EAE progression but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*. 2011 Jul 31;14(9):1142-9.
215. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):584-92.
216. Chuluundorj D, Harding SA, Abernethy D, La Flamme AC. Expansion and preferential activation of the CD14(+)CD16(+) monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol*. 2014 Jul;92(6):509-17.
217. Waschbisch A, Schröder S, Schraudner D, Sammet L, Weksler B, Melms A, et al. Pivotal Role for CD16+ Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. *J Immunol*. 2016 Feb 15;196(4):1558-67.
218. Paré A, Mailhot B, Lévesque SA, Juzwik C, Ignatius Arokia Doss PM, Lécuyer MA, et al. IL-1 $\beta$  enables CNS access to CCR2<sup>hi</sup> monocytes and the generation of pathogenic cells through GM-CSF released by CNS endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Feb 6;115(6):e1194-e1203.
219. Chitnis T, Khoury SJ. Role of costimulatory pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Nov;112(5):837-49; quiz 850.

220. von Essen MR, Ammitzbøll C, Hansen RH, Petersen ERS, McWilliam O, Marquart HV, et al. Proinflammatory CD20+ T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain*. 2019 Jan 1;142(1):120-32.
221. Sabatino JJ, Wilson MR, Calabresi PA, Hauser SL, Schneck JP, Zamvil SS. Anti-CD20 therapy depletes activated myelin-specific CD8<sup>+</sup>T cells in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019 Dec 17;116(51):25800-7.
222. Wong KL, Tai JJ, Wong W, Han H, Sem X, Yeap W, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011 Aug 4;118(5):e16-e31.
223. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell R, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011 Sep 22;118(12):e50-e61.
224. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schäkel K. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):517-27.
225. Shinoda K, Li R, Rezk A, Mexhitaj I, Patterson KR, Kakara M, et al. Differential effects of anti-CD20 therapy on CD4 and CD8 T cells and implication of CD20-expressing CD8 T cells in MS disease activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2023 Jan 17;120(3):e2207291120.
226. Freedman MS, Gnanapavan S, Booth RA, Calabresi PA, Khalil M, Kuhle J, et al. Guidance for use of neurofilament light chain as a cerebrospinal fluid and blood biomarker in multiple sclerosis management. *EBioMedicine*. 2024 Mar;101:104970.
227. Elliott C, Wolinsky JS, Hauser SL, Kappos L, Barkhof F, Bernasconi C, et al. Slowly expanding/evolving lesions as a magnetic resonance imaging marker of chronic active multiple sclerosis lesions. *Mult Scler*. 2019 Dec;25(14):1915-25.
228. Absinta M, Sati P, Masuzzo F, Nair G, Sethi V, Kolb H, et al. Association of Chronic Active Multiple Sclerosis Lesions With Disability In Vivo. *JAMA Neurol*. 2019 Dec 1;76(12):1474-83.

229. Gafson AR, Barthélemy NR, Bomont P, Carare RO, Durham HD, Julien JP, et al. Neurofilaments: neurobiological foundations for biomarker applications. *Brain*. 2020 Jul 1;143(7):1975-98.
230. Gafson AR, Jiang X, Shen C, Kapoor R, Zetterberg H, Fox RJ, et al. Serum Neurofilament Light and Multiple Sclerosis Progression Independent of Acute Inflammation. *JAMA Netw Open*. 2022 Feb 8;5(2):e2147588.
231. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology*. 2019 Mar 5;92(10):e1007-e1015.

## **8. SAŽETAK**

**Uvod i ciljevi istraživanja:** Multipla skleroza je demijelinizacijska bolest koja dovodi do progresivne neurodegeneracije. Posljedica je aberantne imunološke aktivacije, gdje autoreaktivni CD4<sup>+</sup> limfociti zaobilaze negativnu selekciju i klonalnu eliminaciju da bi ušli u SŽS gdje započinje privlačenje upalnih stanica. Ova kaskada dovodi do produkcije protutijela i oslobađanja proupalnih citokina što na koncu dovodi do oštećenja mijelinske ovojnice. Cilj studije je bio istražiti Treg stanice i monocite, odnosno ekspresiju CTLA-4 i FOXP3 na Treg stanicama, ekspresiju CD40 i CD192 na monocitnim subpopulacijama te odrediti serumsku koncentraciju lakog lanca neurofilamenta (sNfL) u ispitanika s primarno progresivnom multiplom sklerozom (PPMS).

**Ispitanici i postupci:** Imunološka analiza stanica je rađena iz uzoraka krvi 28 ispitanika oboljelih od PPMS (15 ispitanika liječenih ocrelizumabom i 13 ispitanika koji nisu pristali na liječenje) i 10 zdravih ispitanika (kontrolna skupina). Uzorci krvi inkubirani su s anti-humanim CD14, CD16, CD40 i CD192 protutijelima za monocite, i anti-humanim CD4, CD25, FOXP3 i CTLA-4 protutijelima za limfocite. ELISA test je korišten za određivanje koncentracije sNfL iz seruma ispitanika.

**Rezultati:** Rezultati studije su pokazali da su ocrelizumabom liječeni (N=15) i neliječeni (N=13) PPMS ispitanici imali značajno povećan postotak CTLA-4 i FOXP3 na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg stanicama. Nadalje, ocrelizumabom liječeni PPMS u usporedbi s neliječenim ispitanicima su imali značajno sniženje postotka CD40 i CD192 na neklasičnim monocitima. Nismo našli razlike u koncentraciji sNfL između liječenih PPMS, neliječenih PPMS i kontrolne skupine.

**Zaključak:** Povećanje postotka CTLA-4 i FOXP3 kod CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg stanica kod liječenih i neliječenih PPMS ispitanika govori o supresivnoj funkciji Treg stanica kod abnormalnog imunog zbivanja u PPMS. Smanjeni postotak CD40<sup>+</sup> i CD192<sup>+</sup> neklasičnih monocita kod liječenih u odnosu na neliječene PPMS možebitno ukazuje na ulogu ocrelizumaba u smirivanju upalnog zbivanja u SŽS-u.

## **9. SUMMARY**

**TITLE: Differences in T regulatory lymphocytes and monocytes in subjects with primary progressive multiple sclerosis treated with ocrelizumab and the ones who didn't accept treatment**

**Background and aim:** Multiple sclerosis is a demyelinating disease that leads to progressive neurodegeneration. It is the result of abnormal immune system activation, allowing self-targeting CD4<sup>+</sup> immune cells to enter the central nervous system and initiate inflammation. This process triggers antibody production and the release of pro-inflammatory cytokines, resulting in eventual myelin sheath damage. The objective of this study was to examine T regulatory cells (Tregs) and monocytes, specifically focusing on the expression of CTLA-4 (CD152) and FOXP3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, as well as the expression of CD40<sup>+</sup> and CD192<sup>+</sup> in monocyte subpopulations among individuals with primary progressive multiple sclerosis (PPMS). Additionally, we measured serum neurofilament light (sNfL) concentrations in both PPMS subjects and a control group.

**Subject and methods:** The immunological analysis was performed on peripheral blood samples obtained from 28 PPMS participants (15 receiving ocrelizumab treatment and 13 untreated) and 10 healthy control subjects (HCs). Blood samples were treated with anti-human CD4, CD25, FOXP3, and CTLA-4 antibodies for lymphocyte analysis and anti-human CD14, CD16, CD40, and CD192 antibodies for monocyte analysis. Serum samples were utilized in an ELISA test to determine sNfL concentrations.

**Results:** The findings indicate that both ocrelizumab-treated (N=15) and untreated (N=13) PPMS subjects exhibited a significantly higher percentage of CTLA-4<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs compared to HCs. Furthermore, ocrelizumab-treated PPMS subjects showed a significantly lower percentage of CD192<sup>+</sup> and CD40<sup>+</sup> in non-classical monocytes when compared to untreated subjects. No significant differences in sNfL concentrations were observed among treated PPMS, untreated PPMS, and HCs.

**Conclusion:** The elevated percentages of CTLA-4<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs among both treated and untreated PPMS subjects suggest a suppressive role of Tregs in modulating the aberrant immune response associated with PPMS. The reduced percentages of CD40<sup>+</sup> and CD192<sup>+</sup> in CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes in treated subjects compared to untreated ones may indicate the potential role of ocrelizumab in suppressing central nervous system inflammation.

## **10. ŽIVOTOPIS**

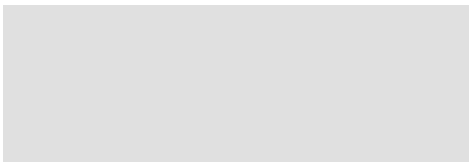


**OSOBNI PODATCI:**

Ime i prezime: Nina Ipavec

Datum rođenja: 07.01.1984.

Mjesto rođenja: Split



Materinji jezik: hrvatski

**OBRAZOVANJE:** 1998.-2002. Prva jezična gimnazija Split, srednja Glazbena škola Josip Hatze

2002.-2008. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; SMJER: doktor medicine

2010.-2014. specijalizacija iz Transfuzijske medicine

2019.-2020. Tečaj iz osnova medicinske akupunkture (ICMART)

2011.- Poslijediplomski studij Klinička medicina utemeljena na dokazima, Sveučilište u Splitu

**ZAPOSLENJE:** Klinički bolnički centar Split, specijalist transfuzijske medicine na Zavodu za transfuzijsku medicine KBC-a Split

Adresa: Spinčićeva 1, 21000 Split

**PUBLIKACIJE:**

1. **Ipavec N**, Rogić Vidaković M, Markotić A, Pavelin S, Buljubašić Šoda M, Šoda J, Dolić K, Režić Mužinić N. Treated and Untreated Primary Progressive Multiple Sclerosis: Walkthrough Immunological Changes of Monocytes and T Regulatory Cells. *Biomedicines*. 2024; 12(2):464. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12020464>

2. L Kustura, D Bobek, A Poljičanin, S Pavelin, M Buljubašić Šoda, J Šoda, J Aksentijević, K Duka Glavor, N Narančić Knez, V Viali, A Cukrov, I Todorčić Laidlaw, **N Ipavec**, D Vukorepa, I Stipica, K Bakrač, B Bošković, A Mastelić, N Režić Mužinić, A Markotić, Z Đogaš, K Dolić, M Rogić Vidaković, Psychometric properties and observational data for COVID-19 Yorkshire Rehabilitation Scale (C19-YRSm) for post-COVID-19 syndrome, *QJM: An International Journal of Medicine*, Volume 117, Issue 1, January 2024, Pages 38–47, <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcad224>