

Mjerenje proteina CD163 u pacijenata s relapsno-remitirajućom multiplom sklerozom

Jerčić, Mario

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:368794>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mario Jerčić

**MJERENJE PROTEINA CD163 U PACIJENATA S RELAPSNO-REMITIRAJUĆOM
MULTIPLOM SKLEROZOM**

Diplomski rad

Akadska godina:

2022./2023.

Mentorica:

Izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

Split, rujan 2023.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija	2
1.2. Etiologija	4
1.2.1. Genetski čimbenici	4
1.2.2. Okolišni čimbenici.....	4
1.3. Imunopatogeneza.....	5
1.4. Klinička slika.....	7
1.4.1. Klinički fenotipovi	7
1.4.2. Simptomatologija	9
1.4.2.1. Motorni i osjetni simptomi/znaci	10
1.4.2.2. Optički neuritis	10
1.4.2.3. Zahvaćanje malog mozga	10
1.4.2.4. Zahvaćanje moždanog debla	11
1.5. Dijagnoza	11
1.6. Proširena skala stanja invaliditeta.....	14
1.7. Liječenje.....	14
1.8. CD163	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	20
2.1. Ciljevi istraživanja	21
2.1. Hipoteze	21
3. ISPITANICI I POSTUPCI	22
Ustroj istraživanja.....	23
3.1. Uzorak ispitanika	23
3.2. Postupci prikupljanja podataka: prikupljanje seruma, ELISA i klinička procjena (neurološka i radiološka).....	24
3.3. Postupak kvantitativnog mjerenja CD163 u serumu.....	24
3.4. Etička načela.....	25
3.5. Statistički postupci.....	26
4. REZULTATI.....	26
5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČCI.....	34
7. LITERATURA.....	36
8. SAŽETAK.....	48
9. SUMMARY	50
10. ŽIVOTOPIS.....	53

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Nikolini Režić Mužinić na savjetima, znanju i strpljivosti prilikom provedbe istraživanja i pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala obitelji i prijateljima.

Najveće hvala roditeljima i sestri i bratu koji su bili uz mene ovih šest godina.

POPIS KRATICA

MS – multipla skleroza

RRMS – relapsno-remitentna multipla skleroza

PPMS – primarno progresivna multipla skleroza

SPMS – sekundarno progresivna multipla skleroza

CIS – klinički izolirani sindrom

MZ – monozigotni

DZ – dizigotni

HLA – humani leukocitni antigen

MHC – glavni kompleks histokompatibilnosti

IL – interleukin

EBV – virus Epstein-Barr

EBNA1 – Epstein-Barr nuklearni antigen 1

Th – pomagački limfociti T

CMV – citomegalovirus

UV – ultraljubičasto

CD4⁺ – limfociti T pozitivni na CD4

CD8⁺ – limfociti T pozitivni na CD8

KMB – krvno-moždana barijera

SŽS – središnji živčani sustav

APC – antigen prezentirajuće stanice

HHV-6 – humani herpesvirus 6

OCB – oligoklonalne vrpce

NK – stanice prirodne ubojice

IFN – interferon

EAE – eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis

TGF – transformirajući čimbenik rasta

CSF – cerebrospinalni likvor

DIS – diseminacija u prostoru

DIT – diseminacija u vremenu

GMN – gornji motoneuron

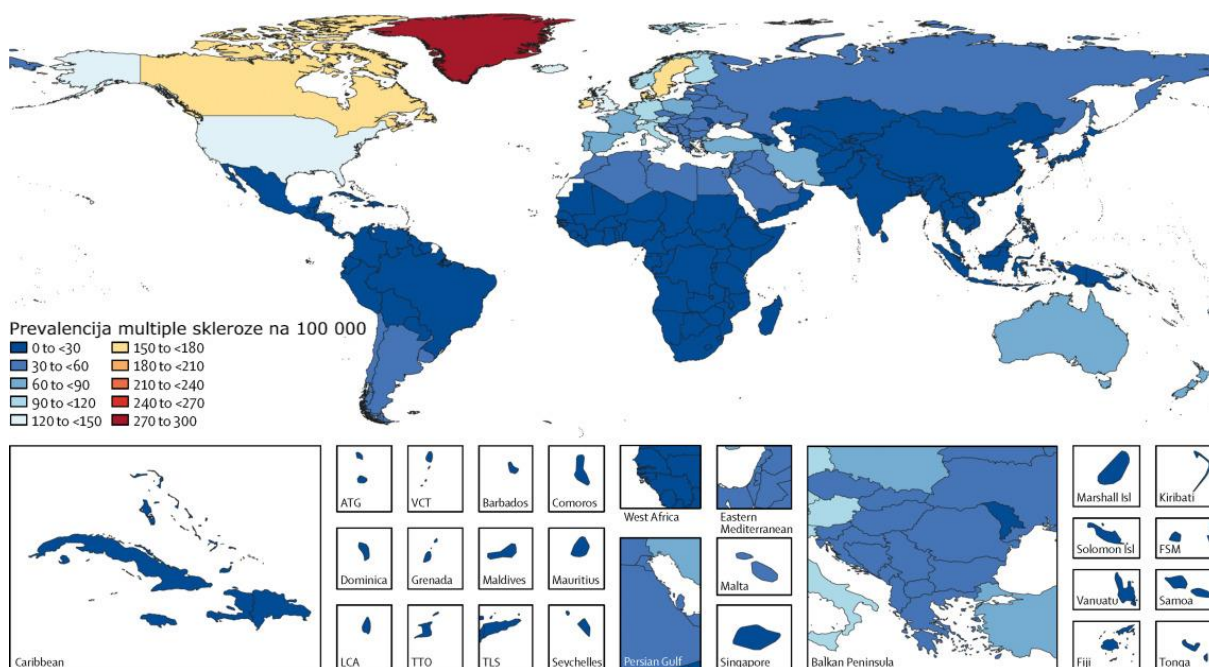
MBP – mijelin bazični protein

Treg – regulacijska T stanica

1. UVOD

1.1. Epidemiologija

Multipla skleroza (MS) je najčešća upalna neurološka bolest u mladim odraslim osoba, a njegova prevalencija je u porastu (1). Prevalencija je najveća u Sjevernoj Americi, Zapadnoj Europi i Australiji, Novom Zelandu i Novoj Gvineji s više od 100 slučajeva na 100 000 stanovnika, a najniža u zemljama sa središtem oko ekvatora s manje od 30 slučajeva na 100 000 stanovnika (2). S prevalencijom u rasponu od 50 do 300 na 100 000, procjenjuje se da danas u svijetu ima približno 2,3 milijuna ljudi s MS-om, iako je to vjerojatno podcijenjeno s obzirom na relativni nedostatak podataka u velikim populacijama, posebice u Indiji i Kini (3). U relapsno-remitirajućem obliku MS-a (RRMS) žene zahvaća gotovo tri puta češće od muškaraca, a srednja dob početka je oko 30 godina, dok su u primarno progresivnoj MS (PPMS) stope oboljelih muškaraca i žena slične, a srednja dob od početka je ~40 godina (4–6). Prevalencija MS-a raste s geografskom širinom; međutim, ovaj gradijent se smanjuje u Norveškoj i SAD-u, dvjema zemljama u kojima je proučavan (7,8). Iako je multipla skleroza češća kod žena to nije uvijek bio slučaj. U serijama slučajeva iz ranih 1900-ih omjer spolova bio je gotovo jednak. Od tada je omjer spolova u stalnom porastu i sada je blizu 3:1 (Ž:M) u većini razvijenih zemalja (9). Globalna prevalencija multiple skleroze značajno se razlikuje po spolu. Među predtinejdžerskom djecom, prevalencija MS-a je slična u dječaka i djevojčica. Tijekom adolescencije, krivulje se počinju razilaziti, a prevalencija se više povećava među djevojčicama nego među dječacima. Ovaj obrazac se nastavlja sve do kraja šestog desetljeća života, kada je omjer spolova 2:1 u korist žena (1). Pronađen je jak gradijent geografske širine za prevalenciju multiple skleroze, s povećanjem prevalencije od 1,03 puta po stupnju geografske širine. Smanjenje prevalencije od sjevera prema jugu prema gradijentu geografske širine prepoznato je u Sjevernoj Americi i zapadnoj Europi (10,11), a obrnuto povećanje gradijenta od juga prema sjeveru zabilježeno je u Australiji (10). Vremenski trendovi u prevalenciji pokazuju da su ti gradijenti slabili u 20. stoljeću (12), ali se distribucija multiple skleroze još uvijek općenito može opisati kao tri zone učestalosti ili rizika, kako je izvorno predložio Kurtzke (13). U 2016. sjevernoeuropske zemlje i Sjeverna Amerika činile su zonu visokorizične prevalencije, s procjenama od 100 ili više slučajeva multiple skleroze na 100 000 stanovnika. Ove regije ograničene su područjima srednje učestalosti (prevalencija 30–100 slučajeva na 100 000). Područja niske učestalosti nalaze se oko ekvatora, a prevalencija u Aziji manja je od 30 slučajeva na 100 000 stanovnika (Slika 1).



Slika 1. Dobno standardizirana prevalencija multiple skleroze na 100 000 stanovnika u 2016. za oba spola, prema lokaciji (1).

Sve je više dokaza o povećanoj incidenciji MS-a, usprkos poboljšanim dijagnostičkim tehnikama, osobito u žena s relapsno-remitentnim početkom (9). Većina bolesnika javlja se u ranoj odrasloj dobi, ali posljednjih godina povećana je svijest o prezentaciji u djetinjstvu (14). Većina pacijenata koji se jave u kasnijoj životnoj dobi progresivni su od početka (15). U Hrvatskoj je 2018. bilo ukupno 6160 pacijenata kojima je utvrđena MS-a, dok su od toga 72% bile žene. Većina muškaraca bila je u dobi od 40 do 49 godina, a žene od 50 do 59 godine. Stopa prevalencije iznosila je 143.8/100 000 stanovnika (16). Područje Čabra u Gorskom kotaru ima najveću učestalost MS-a u Hrvatskoj gdje je 2010. godine prevalencija iznosila 205.7/100 000 stanovnika (17,18). Iako se globalna distribucija MS-a povećava kako se odmičemo od ekvatora (7), postoje iznimke od ove generalizacije, iako je MS uobičajena u regijama naseljenim ljudima iz sjeverne Europe, ovaj učinak je modificiran mjestom gdje ti pojedinci žive u ranoj dobi. Studije o migracijama unatrag 50 godina pokazuju da je migracija iz regija niskog rizika u regije visokog rizika u djetinjstvu povezana s niskim rizikom i obrnuto (19). Najviša stopa prevalencije zabilježena je za dobnu skupinu između 35 i 64 godine, a bolest se pojavljuje u prosjeku 5 godina ranije u žena (20,21).

1.2. Etiologija

U nastanku MS-a djeluju genetski i okolišni čimbenici. Iako je prava etiologija MS-a složena uočeno je da bolest nije rezultat jednog uzročnog događaja, već se razvija kod genetski osjetljivih pojedinaca izloženih okolišnim čimbenicima (22).

1.2.1. Genetski čimbenici

Postoji genetski utjecaj osjetljivosti na MS, otprilike jedan od osam pacijenata ima obiteljsku povijest MS-a (23). Studije blizanaca provedene u Sjevernoj Europi i Sjevernoj Americi, gdje je prevalencija MS-a velika, dosljedno se slažu oko viška konkordantnih parova među monozigotnim (MZ) blizancima u usporedbi s DZ (dizigotnim) blizancima (24–30). Stope podudarnosti za MZ kreću se od 21-40%, dok su oni za DZ blizance oko 5%. Italija ima niže stope podudarnosti parova u odnosu na zemlje s visokom prevalencijom MS-a, ali razlika među MZ i DZ blizancima postoji (31). Veličina razlike između MZ i DZ implicira na nemendelsko naslijeđe. Rizik za srodnika u prvom koljenu iznosi 3-4% što je 7-40 puta veći rizik od opće populacije (29,30). Humani leukocitni antigen (HLA) DRB1*15:01 alel u klasi II glavnog kompleksa tkivne histokompatibilnosti (MHC) je najraniji i najdominantniji rizični faktor identificiran u MS-u (32). Najprisutniji je na Sjeveru Europe, dok je u drugim dijelovima Europe povezanost uglavnom uočena s HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0405 i HLA-DRB1*1303 (33). Nadalje, studije povezanosti cijelog genoma su otkrile da su gen za alfa receptor interleukina 2 (IL-2) i gen za alfa receptor interleukina 7 (IL-7) također nasljedni faktori rizika (34). S druge strane, varijante klase I HLA-A*02 i HLA-B*44 su povezani sa zaštitom od bolesti (35).

1.2.2. Okolišni čimbenici

Najraniji tragovi utjecaja okoliša došli su iz studija o učinku geografske širine i migracije. Poznato je da postoji gradijent MS-a po geografskoj širini. Raširenija je što je populacija udaljenija od ekvatora (10). Također, studije migracija pokazale su da migranti koji sele iz visokorizičnih u niskorizične zemlje prije adolescencije imaju smanjenu stopu bolesti, dok oni koji prelaze iz niskorizične u visokorizičnu zemlju stječu veći rizik (36). Iz ovoga proizlazi da izloženost rizičnom čimbeniku u prva dva desetljeća utječe na pojavu bolesti.

Virus Epstein-Barr (EBV): Utvrđeno je da su skoro svi pojedinci s MS-om (>99%) bili zaraženi u usporedbi s 94% zdrave populacije (37). Ljudi s visokim titrom anti-EBV antitijela

imaju veći rizik za razvoj MS-a u usporedbi s ljudima s niskim titrom. Međutim, ova veza je samo privremena jer titar Epstein-Barr nuklearnog antigena 1 (EBNA1) se povisi nekoliko godina prije nastupa simptoma MS-a (38,39). Pojedinci s infektivnom mononukleozom imaju veći rizik za razvoj adultnog oblika MS-a gdje je infektivna mononukleoza vjerojatno marker za abnormalan imunološki odgovor. Abnormalan imunološki odgovor povećava rizik za MS, a ne infekcija (40).

Pušenje: Ranije studije su ukazale na rast rizika s porastom broja popušanih cigareta (41). Pušenje utječe na pojavu tako što potiče odgovor pomagačkog limfocita T (Th) 17 u plućima. S druge strane, Hedström i suradnici su dokazali da je oralni duhan uz citomegalovirusnu (CMV) infekciju, alkohol i kofein povezan sa sniženim rizikom za razvoj MS-a (42).

Vitamin D i ultraljubičasto zračenje (UV): Dva su čimbenika rizika pomoću kojih se može objasniti i utjecaj geografske širine na pojavu MS-a. Visoke razine vitamina D osobito prije dvadesete godine života su povezane s nižim rizikom za razvoj MS kasnije u životu (43). Vitamin D suprimira proliferaciju B i T stanica te skreće T stanice od upalnog prema regulatornom odgovoru. Nadalje promovira tolerogene monocite i dendritičke fenotipove (44).

1.3. Imunopatogeneza

MS je složena bolest u kojoj imunološki sustav ima ključnu ulogu u nastanku uz genetičku predispoziciju i okolišne čimbenike (36,45). Prvi i ključni događaj u patogenezi u uključuje aktivaciju potencijalno autoreaktivnog T limfocita pozitivnog na receptore CD4 (CD4⁺) na periferiji (45). Aktivirani periferni limfociti tada migriraju kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) procesom transmigracije koji uključuje interakciju između adhezijskih molekula, *very late antigen-4* (VLA-4) prisutnog na T limfocitima i *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) prisutnog na kapilarnim endotelnim stanicama uz istovremeno otpuštanje metaloproteinaza (MPP). Metaloproteinaze su enzimi koji stvaranjem otvora u KMB-u narušavaju njezinu semipermeabilnost i na taj način omogućavaju olakšan prolazak drugih stanica imunološkog sustava (46). Ovo se zove „vanka-unutra“ hipoteza za razliku od „unutra-vanka“ hipoteze u kojoj MS započinje inicijalnim događajem u središnjem živčanom sustavu (SŽS) (47). Zdravi pojedinci također imaju T stanice koje su reaktivne na mijelin, ali su one naivne i ne migriraju u SŽS dok su kod pacijenata s MS-om aktivirane i memorijskog fenotipa i vjerojatnije da budu Th1 fenotipa (48). Ključan faktor aktivacije na periferiji je prepoznavanje određenih antigena koji se nalaze na površini antigen-prezentirajućih stanica

(APC), a koji pružaju kostimulatorni signal T limfocitima. Pretpostavlja se da je većina ovih antigena u formi peptida koji potječe od humanog herpesvirusa 6 (HHV6), EBV ili *C. pneumoniae*. Ovi peptidni fragmenti omogućuju aktivaciju T limfocita specifičnog za mijelin bazični protein (MBP) putem dva mehanizma: molekularne mimikrije i oštećenjem tolerancije na vlastite antigene u upalnom okružju (49). Kada periferno aktivirani autoreaktivni T limfociti dođu SŽS oni mogu biti ponovno aktivirani od APC, dendritičnim stanicama, makrofagima i B stanicama, koji autoantigene peptide prikazuju u sklopu MHC II molekula. To uzrokuje lučenje citokina i kemokina, novačenje dodatnih stanica imunološkog sustava uključujući T stanice, B stanice, monocite i trajnu aktivaciju mikroglije i makrofaga što rezultira lokalnim oštećenjem uz daljnje narušavanje KMB-a (50,51). Aktivacija glijalnih stanica održava trajnu upalu čak i u odsustvu daljnje infiltracije upalnim stanicama s periferije (52). Osim demijelinizacije dolazi do ozljede aksona i uništenja oligodendrocita putem slobodnih radikala, aktivacije komplementa, stanice prirodne ubojice (NK stanice), fagocitoze mijelina, sekrecije proteaza i apoptoze oligodendrocita. Smatra se da ovim mehanizmima upravljaju CD4⁺ limfociti (45). Ozljeda aksona je povezana s progresijom invaliditeta, ali je važna i za prijelaz relapsno-remitirajućeg u progresivni oblik (53). Gubitak aksona unutar pojedinih lezija varira, ali razina gubitka je značajno povezana s progresijom (54). Osim upalnih medijatora, ozljeda može nastati u kroničnim lezijama i zbog manjka neurotrofičnih faktora koje proizvode oligodendrociti (45). Pacijenti u ranim fazama MS-a dobro podnose gubitak aksona jer im ostatno tkivo može kompenzirati početnu ozljedu (53). S obzirom da je upala glavni uzrok početnog gubitka, važna je strategija rane primjene lijekova kako bi se promijenio patogenetski proces (55). Jedna od karakteristika plakova u MS-u su dobro diferencirani rubovi koji predstavljaju prepreku ulasku prekursorskih oligodendrocita. Malen broj stanica uđe u plak, ali to je dovoljno za kvalitetnu remijelinizaciju u malog broja lezija.

Astrociti također sudjeluju kao APC autoreaktivnim T limfocitima. Mogu izraziti adhezijske molekule koje olakšavaju prolazak kroz KMB te oslobađanjem MPP sudjelovati u uništavanju čvrstih veza između endotelnih stanica krvnih žila (48).

Osim Th1 subpopulacije CD4⁺ limfocita, važnu ulogu u patogenezi MS imaju i Th17 subpopulacija i T regulacijske stanice (Treg) (56). Osnovni citokin koji Th17 stanice luče je interleukin 17 (IL-17) koji je izrazito proupalan. U animalnom modelu MS, eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu (EAE), Th17 stanice su nositelji upale, dok Th1 ima zaštitnu ulogu. U tom modelu omjer Th17 i Th1 određuje hoće li doći do upale i gdje će se stvarati plakovi. Ako je Th17/Th1 omjer veći od 1 tada dolazi do prekomjernog izlučivanja IL-17 i stvaranja upale i lezija u mozgu. U kralježničnoj moždini upala nastane ako je omjer manji od

1 što upućuje na Th1 stanice kao glavnog medijatora (57). Također, Th17 i Treg se nalaze u funkcionalnom antagonizmu. Th17 stanice su proupalne, dok su Treg imunosupresivne. Oboje koriste isti faktor diferencijacije, transformirajući čimbenik rasta (TGF) β , koji ako se nalazi u upalnom okruženju vodi prema Th17, dok u suprotnom slučaju prema Treg (58).

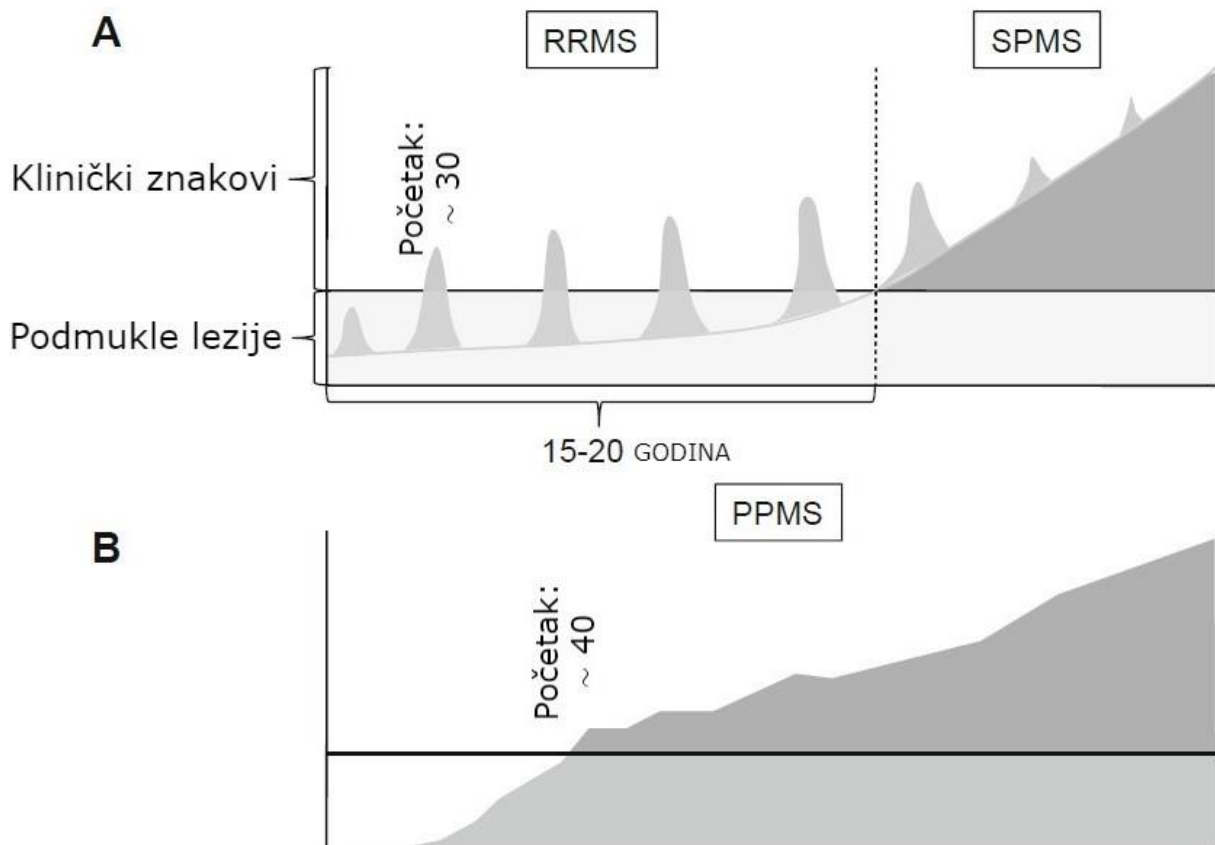
B stanice pridonose patogenezi MS-a na različite načine: kao APC te izvor protutijela za različite komponente mijelina, aksona i neurona. Nadalje, služe kao regulatorne stanice koje lučenjem citokina utječu na Treg. Također, formiraju ektopične limfoidne strukture zajedno s plazma stanicama u meningealnim ovojnica (52).

CD8⁺ T stanice imaju važnu ulogu u MS. One čine većinu stanica na rubu plakova u perivaskularnom infiltratu. Omjer CD4⁺:CD8⁺ stanica u cerebrospinalnom likvoru (CSF) varira od 3:1 do 6:1, a u perifernoj krvi je 2:1 u pacijenata s MS-om. Svoj patološki učinak ostvaruju putem stanica koje izražavaju specifične peptide putem MHC I molekula te lučenjem interferon (IFN) γ i IL-17 (59).

1.4. Klinička slika

1.4.1. Klinički fenotipovi

Točan opis kliničkog fenotipa MS-a je važan zbog komunikacije, prognoze te za donošenje odluka o liječenju. Klinički fenotip se može svrstati u 3 skupine: relapsno-remitirajući, primarno progresivni i sekundarno progresivni (SPMS). On se procjenjuje uzimajući u obzir trenutni status i anamnestičke podatke. Važno je znati da bolest može imati dinamičan tijek i da se početni podtip identificiran tijekom procjene može razvijati s vremenom. Na primjer, početna klasifikacija kao relapsno-remitirajući podtip mogla bi se potencijalno transformirati u sekundarno progresivni podtip u kasnijoj fazi (60). Klinički tijek pojedinih podtipova prikazan je na Slici 2 (61).



Slika 2. Klinički tijek multiple skleroze (61).

Klinički izolirani sindrom (CIS) predstavlja prvu kliničku epizodu u kojoj pacijent ima simptome i znakove koji snažno upućuju na upalnu demijelinizaciju u SŽS. Akutnog ili subakutnog je tijeka, traje najmanje 24 sata, svoj vrhunac doseže unutar 2-3 tjedna, a u odsustvu vrućice ili infekcije i bez znakova encefalopatije (62,63). Po definiciji je uvijek izoliran u vremenu, dok je u 77% slučajeva izoliran u prostoru. Bolesnici se najčešće prezentiraju sindromom nepotpunog zahvaćanja kraljezničke moždine, optičkim neuritisom i sindromom moždanog debla ili maloga mozga (64). Kao i u klinički definitivne MS i CIS je oko 2,5 puta češći kod žena. 70% pacijenata se prezentira u dobi između 20-40 godina (65). Iako je klinička prezentacija u djece slična onoj u odraslih, multifokalni simptomi nisu neuobičajeni (63). 50-70% odraslih s CIS-om ima višestruke T2 asimptomatske lezije bijele tvari. Tri dugoročne studije u kojoj su se bolesnici pratili 7, 15 i 20 godina su zabilježile stope konverzije u MS u 65%, 72% i 80% slučajeva s abnormalnim početnim MRI snimkama i 8%, 25% i 20% slučajeva s normalnim početnim MRI snimkama (66–68). Prisutnost abnormalnog nalaza CSF-a u pacijenata s abnormalnim MRI snimkama ne pruža mnogo prognostičke vrijednosti, ali zato kod pacijenata s normalnim MRI nalazom povećava prediktivnu vrijednost za prijelaz u MS s

4% na 23% (69). Kliničke značajke koje su povezane s povećanim rizikom novoga napadaja u naredne dvije godine su: mlađa dob, etnicitet, ženski spol, dok za multifokalnost postoje oprečni dokazi (65).

RRMS je najčešći fenotip MS-a koji se dijagnosticira u 85% pacijenata s MS-om. Karakteriziran je izmjenom razdoblja recidiva i razdoblja relativne stabilnosti bez pojave novih neuroloških simptoma (remisije). Učestalost recidiva varira od pacijenta do pacijenta. Tijekom recidiva mogu biti prisutni različiti neurološki simptomi i znakovi koji traju najmanje 24 sata u odsutnosti metaboličkih poremećaja i infekcije (70). U polovici slučajeva nepotpuni oporavak od akutnih egzacerbacija vodi postupnom pogoršanju čiji je rezultat s vremenom povećanje onesposobljenosti (71). Urinarne, gastrointestinalne, a naročito infekcije gornjih dišnih putova su otkriveni kao okidači koji povećavaju stopu relapsa (72). Iako mnogi pacijenti prijave stres kao okidač, Mohr i suradnici nisu pronašli jaku poveznicu stresa kao samostalnog čimbenika, već su utvrdili da on ima aditivan učinak na druge čimbenike koji utječu na stopu recidiva (73). Trudnoća s druge strane smanjuje stopu recidiva. Ovaj učinak je posljedica prirođenog imunotolerantnog učinka trudnoće koji se prekida porodom (74).

Početni relapsno-remitirajući klinički tijek u većine pacijenata prijeđe u sekundarno progresivni oblik, sa ili bez povremenih relapsa (60). Prosječno vrijeme od RRMS do SPMS je 19 godina, s prosječnom godišnjom stopom konverzije od 2,5% (75). Ne postoje jasni klinički, slikovni, imunološki ili patološki kriteriji kojima bi mogli utvrditi prijelaznu točku (70). Dijagnoza se postavlja retrospektivno, subjektivnom procjenom kliničara. Riječ progresija označava pogoršavanje neurološkog oštećenja tijekom barem 6-12 mjeseci. Starija dob, muški spol te simptomi kralježničke moždine su povezani s kraćim razdobljem do progresije (76).

Oko 15% pacijenata s MS-om će imati primarno progresivni fenotip. Karakteriziran je stalnom progresijom te odsutnošću početne relapsno-remitirajuće faze. Tijek progresije nije uniforman, a moguća je pojava relapsa kao i razdoblja relativne stabilnosti (70).

1.4.2. Simptomatologija

Klinički simptomi i znakovi MS-a variraju ovisno o lokalizaciji i ozbiljnosti lezija koje zahvaćaju različita područja mozga i leđne moždine (77,78). Mnogi bolesnici imaju vrlo raznolike kliničke manifestacije koje značajno ugrožavaju kvalitetu života bolesnika. U većini slučajeva neurološke manifestacije MS-a se očituju epizodno potom progrediraju u progresivnu fazu sa stalnim nakupljanjem neuroloških deficita (77). Početak bolesti je najčešće monosimptomatski, rjeđe kad je u početku bolesti prisutno više simptoma bolesnik ima barem

dvije vrste ispada. Najčešće je prisutna osjetna simptomatologija, a potom motorička i vidna. Ostali simptomi su rjeđi (17).

1.4.2.1. Motorni i osjetni simptomi/znaci

Slabost je čest nalaz u bolesnika s MS-om. Posljedica je zahvaćanja kortikospinalnih putova i stoga su također prisutni i drugi znakovi u sklopu oštećenja gornjeg motoneurona (GMN): hiperrefleksija, spastičnost, klonus patele i gležnja, Babinski refleks. Bolesnici opisuju slabost kao težinu i krutost. Češće i ranije su zahvaćene noge od ruku. U početku bolesti slabost zahvati jednu nogu, ali progresijom bolesti slabost zahvati i drugu nogu. Spastičnost uzrokuje karakterističan hod i ograničava fizičku aktivnost (79).

Osjetni ispadi su među najčešćim tegobama bolesnika s MS-om. Tipični simptomi su obamrlost, osjećaj bockanja, disestezijska bol, žarenje i trnci koji su redovito prisutni u ranom kliničkom tijeku. Ovakvi senzorni simptomi više upućuju na demijelinizaciju stražnjih kolumni, nego spinotalamičkog puta. Rjeđe, neurološki pregled može otkriti oštećenje i smanjenje osjećaja vibracije kao i abnormalnosti u osjetu finog dodira i propiocepcije. U osjetne ispade ubrajamo i Lhermitteov znak kojeg bolesnici opisuju kao nagli osjećaj strujanja koje se širi niz kralježnicu i u ekstremitete pri fleksiji vrata (77). Neuroanatomska lokalizacija lezije odgovorne za ovaj znak je u stražnim kolumnama u cervikalnoj ili gornjoj torakalnoj kralježničnoj moždini (79).

1.4.2.2. Optički neuritis

Akutni demijelinizirajući optički neuritis je prezentirajući simptom u petine bolesnika, a čak u polovici se javi tijekom bolesti (80). Bolesnici s ovim stanjem obično razviju subakutni gubitak vida na jednom oku tijekom nekoliko sati do dana. Oko 90% ima i retroorbitalnu bol pri pomicanju oka. Također, vid u boji i kontrastni vid mogu biti zahvaćeni. Prilikom neurološkog pregleda bolesnika s ovim stanjem otkrit će se prisutnost relativnog-afherentnog pupilarnog defekta. Fundoskopski se u oko trećine otkrije edem papile (81). Obostrani optički neuritis je rijedak i stoga bi takav nalaz trebao pobuditi sumnju na druge uzroke (82).

1.4.2.3. Zahvaćanje malog mozga

Cerebelarna ataksija je česta pojava u tijeku bolesti, a tremor je najčešća manifestacija. Tremor u početnom tijeku nije stalan i zahvaća dominantno ruke, a pojačavaju ga emocije (17). Nalazi lezija u malom mozgu su prediktor onesposobljenosti i progresije bolesti (83). Kod progresivnog oblika MS-a često se pronađu lezije koje opsežno zahvaćaju korteks (84).

1.4.2.4. Zahvaćanje moždanog debla

Moždano deblo je često zahvaćeno lezijama u MS-u. Ovisno o lokalizaciji lezije bolesnik može imati različite kliničke prezentacije. Ako su zahvaćeni III, IV ili VI moždani živac bolesnik ima dvoslike, pri zahvaćanju medijalnog longitudinalnog fascikulusa (MLF) internuklearnu oftalmoplegiju, ako zahvati facijalni živac može imati miokimiju ili slabost mišića lica te zahvaćanjem VIII živca vertigo. Lezije u produženoj moždini mogu se prezentirati dizartrijom, disfagijom ili slabošću mišića jezika (79).

1.5. Dijagnoza

Za postavljanje dijagnoze koriste se revidirani McDonaldovi kriteriji iz 2017. godine koji se oslanjaju na dva osnovna principa: diseminaciji u prostoru (DIS) i diseminaciji u vremenu (DIT). Važno je naglasiti da bi se ovi kriteriji trebali primijeniti samo kod pacijenata s tipičnim CIS-om, odnosno kod pacijenata koji imaju veliku vjerojatnost MS-a. Ako su McDonaldovi kriteriji iz 2017. ispunjeni i ne postoji bolje objašnjenje za kliničku prezentaciju onda se postavlja dijagnoza MS-a (Tablica 1) (85).

Tablica 1. McDonaldovi kriteriji za dijagnozu multiple skleroze

Broj napadaja	Broj lezija s objektivnim kliničkim dokazom	Dodatni podatci potrebni za postavljanje dijagnoze
≥2 klinička napadaja	≥2	Nema
≥2 klinička napadaja	1 (kao i jasni dokaz prethodnog napadaja koji uključuje leziju na određenom anatomskom mjestu)	Nema
≥2 klinička napadaja	1	DIS prikazan dodatnim kliničkim napadajem koji upućuje na drugo mjesto u SŽS-u ili MRI
1 klinički napadaj	≥2	DIT prikazan dodatnim kliničkim napadajem ili MRI ili pozitivne OCBs
1 klinički napadaj	1	DIS prikazan dodatnim kliničkim napadajem koji upućuje na drugo mjesto u SŽS-u ili MRI i DIT prikazan dodatnim kliničkim napadajem ili MRI ili pozitivne OCBs

^a diseminacija u prostoru (DIS)

^b diseminacija u vremenu (DIT)

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

Diseminacija u prostoru se može dokazati prisutnošću kliničkih znakova ili neuroradiološkim prikazom područja demijelinizacije na različitim anatomskim lokacijama unutar SŽS. Lezije moraju biti prisutne u barem 2 od 4 navedena područja: periventrikularno, jukstakortikalno, infratentorijalno ili u kralježničnoj moždini. Diseminacija u vremenu se može klinički dokazati prisutnošću dvaju odvojenih napadaja ili prisutnošću novih neuroloških simptoma koji su se pojavili u različitim vremenskim razdobljima. Također, može se dokazati prisutnošću novih lezija na naknadnom MRI pregledu u usporedbi s prethodnim pregledom, bez obzira je li pacijent imao kliničke simptome ili ne. Ako je napravljena samo jedna magnetska snimka i prilikom davanja kontrasta uoči se barem jedna aktivna i barem jedna neaktivna lezija, kriterij diseminacije u vremenu može biti ispunjen (86). Revidirani McDonaldovi kriteriji iz 2017. godine donijeli su neke promjene. U pacijenata koji se prezentiraju s tipičnim CIS-om i koji imaju ispunjene kliničke ili slikovne kriterije za DIS, a koji nemaju alternativno objašnjenje za kliničke simptome, pozitivne specifične oligoklonske trake (OCB) u likvoru mogu biti zamjena za kriterij DIT-a i omogućiti postavljanje dijagnoze MS-a. Nadalje, simptomatske i asimptomatske lezije se može uzeti u obzir pri procjeni DIS ili DIT kriterija, osim lezija u očnom živcu kod pacijenata s optičkim neuritisom. Kortikalne i jukstakortikalne lezije se mogu koristiti za ispunjavanje DIS kriterija. Isto tako, u trenutku postavljanja dijagnoze ujedno treba odrediti i privremeni tijek bolesti kao i procijeniti aktivnost bolesti i progresiju temeljem prošlogodišnje povijesti bolesti. Fenotip bi trebalo periodično reevaluirati temeljem prikupljenih podataka (85).

Magnetska rezonancija je visoko osjetljiva metoda za prikaz plakova u mozgu i kralježničkoj moždini što je čini najvažnijim parakliničkim alatom za dijagnozu MS-a. Također, ima ključnu ulogu u isključivanju alternativnih patologija ili u identificiranju nepravilnosti koje ukazuju na drugačiju dijagnozu (87). Akutne i kronične MS lezije se, poput drugih patologija mozga, prikazuju kao svijetla područja na T2 snimkama. Diskretne MS lezije su relativno dobro ograničene, ali mogu pokazivati aureolu manje upadljivog hiperintenziteta, vjerojatno zbog edema u vrlo akutnom stadiju upale (88). Također, u akutnoj fazi zbog edema, sa ili bez destrukcije matriksa, lezije se u T1 snimci prikazuju kao hipointenziteti koji mogu nestati kako upala jenjava. Kronična žarišta hipointenziteta, trajne „crne rupe“, ukazuju na područja s ozbiljnim oštećenjem tkiva (89). Prisutnost poremećaja krvno-moždane barijere na koju ukazuje bojanje gadolinijskim kontrastom u novim lezijama najbolje služi za razgraničavanje akutne upale, koja ima tendenciju da traje od 2 od 6 tjedana. Pojačanje kontrasta također ukazuje na recidiv upale unutar već postojećih lezija (90). T2 sekvence su najosjetljivije za parenhimske promjene u MS-u zbog dužeg T2 vremena u lezijama u odnosu

na bijelu tvar. Za lakše otkrivanje lezija smještenih u blizini CSF-a koristi se FLAIR sekvenca koja atenuira signale iz vode, dok za središnje strukture mozga kao što su corpus callosum, hipofiza, optička hijazma i moždano deblo koriste T1 sekvence (91).

U većini slučajeva s tipičnim kliničkim i slikovnim nalazima, analiza CSF-a često nije potrebna. Međutim, može ponuditi dodatnu potvrdu prisutnosti multiple skleroze. Tipičan nalaz analize likvora su: normalan ili blago povećan broj leukocita, dominantno limfocita, i proteina, povećan imunoglobulin G (IgG) indeks i IgG oligoklonalne vrpce. OCB predstavljaju IgG koji nije prisutan u serumu (92). OCB nisu jedinstvene za MS, već pružaju dokaz o intratekalnoj sintezi IgG-a. Mogu se pronaći i u drugim upalnim i infektivnim bolestima SŽS-a, ali mogu se razlikovati u odnosu na MS korištenjem dodatnih parakliničkih i kliničkih nalaza. Nešto manje od 90% pacijenata s MS-om i oko 68% pacijenata s CIS-om je OCB pozitivno. Pacijenti s CIS-om koji su OCB pozitivni imaju povećan rizik za konverziju u MS (93).

Multimodalni evocirani potencijali (EP) (somatosenzorni, motorni, vidni i slušni) pružaju funkcionalne informacije o putevima u SŽS-u. Demijelinizacija i aksonski blok ili gubitak aksona uzrokuju abnormalnosti u prikazu EP-a kao što su odgođena latencija, morfološke abnormalnosti i produženo refrakturno razdoblje. Očuvana morfologija vala, skupa s odgodom latencije, ukazuje na demijelinizirajući poremećaj, ali nijedna od ovih abnormalnosti nije specifična za MS (94). Danas je korištenje EP-a uvelike smanjeno zbog znatno niže osjetljivosti za detekciju lezija u odnosu na MRI. MRI je bolji u otkrivanju supratentorijalnih lezija jer plakovi koji se uobičajeno nalaze periventrikularno ne utječu na senzorne i motoričke puteve. EP mogu biti nenormalni samo ako su lezije zahvatile njihov odgovarajući put. Ova karakteristika ih čini korisnima u objektivizaciji suptilnih simptoma i znakova, ali ograničava u otkrivanju asimptomatskih lezija (95).

S obzirom na autoimunu prirodu MS-a, opsežni istraživački naponi su usmjereni na specifične komponente imunološkog sustava u pokušaju otkrivanja i dijagnosticiranja bolesti u njezinim najranijim fazama. Autoantitijela koja ciljaju površinske proteine mijelina, kao što je mijelinski oligodendrocitni glikoprotein, MBP, mijelinski proteolipidni protein i glikoprotein povezan s mijelinom, pokazala su korelaciju s MS-om. Međutim, trenutno im nedostaje preciznost da bi služili kao pouzdani biomarkeri (96). Nova područja interesa uključuju autoantitijela koja ciljaju glikane i površinske ionske kanale, ali unatoč brojnim kandidatima još nema konačnog testa koji bi mogao točno dijagnosticirati ili pratiti napredovanje MS-a (97).

1.6. Proširena skala stanja invaliditeta

Proširena skala stanja invaliditeta (EDSS) je metoda kvantifikacije invaliditeta kod pacijenata s MS-om koju je razvio John F. Kurtzke (98). Ona se sastoji od osam funkcionalnih sustava: piramidalni, mali mozak, moždano deblo, osjetilni sustav, probava i mokrenje, vizualni, moždani i ostali deficiti povezani s MS-om. Svakom sustavu kliničar daje ocjenu i tako na kraju formira sveukupnu procjenu bolesnikova stanja od 0 (normalan neurološki status) do 10 (smrt zbog MS) u intervalima povećanja za 0,5 nakon EDSS ocjene 1. Donje vrijednosti ove skale mjere oštećenja na temelju neurološkog pregleda, dok EDSS>6 se odnosi na ograničenja u kretanju. EDSS je najčešće korišten za opisivanje progresije invaliditeta kao i za procjenu učinkovitosti terapije koja modificira bolest u kliničkim ispitivanjima. Od ograničenja ove ljestvice ističe se preveliki oslonac na sposobnost kretanja te ne uzimanje u obzir umor, bol i depresiju (99).

1.7. Liječenje

Liječenje MS-a može se podijeliti u 3 glavne kategorije koje uključuju: liječenje akutnog napadaja, liječenje koje mijenja tijek bolesti te simptomatsko liječenje (100).

Akutne epizode/relapsi su fokalni neurološki poremećaji koji traju duže od 24 sata, a kojima je prethodio period u kojemu nije bilo neuroloških ispada najmanje 30 dana. Pseudorelaps predstavlja pogoršanje u neurološkom statusu bez aktivnosti MS, a može biti uzrokovan vrućicom, metaboličkim promjenama, lijekovima, menstruacijom ili infekcijom (101). Važno je razlučiti relaps, odnosno novu aktivnost od pseudorelapsa jer krivo prepoznavanje može rezultirati neadekvatnom upotrebom lijekova (73). Kortikosteroidna terapija predstavlja prvu liniju liječenja egzacerbacija. Koriste se visoke doze metilprednizolona u rasponu od 500 do 1000 mg na dan intravenski tijekom 3 do 7 dana. Umjesto metilprednizolona može se koristiti i oralni prednizolon u rasponu od 625 do 1250 mg na dan tijekom 3 do 7 dana bez postupnog smanjivanja doze (102). Kortikosteroidni učinak je pleiotropan. Djeluje na molekularnoj razini tako što smanji ekspresiju gena proupalnih citokina, interferon (IFN) γ i faktor nekroze tumora (TNF) α , a povećava ekspresiju gena protuupalnih citokina IL-10 i TGF- β (103). Djeluje i neposredno tako što aktivacijom kaskadnih puteva putem proteina na membrani stanice suprimira imunološke stanice. Sveukupno je njegov učinak protuupalni i imunosupresivni, ali njegova dugoročna primjena nije indicirana. Rijetko,

kortikosteroidi mogu uzrokovati povećanu sklonost infekcijama, dispepsiju te promjene mentalnog stanja (104).

Izvanredan napredak u liječenju RRMS postignut je lijekovima koji modificiraju tijek bolesti. Ovi lijekovi mijenjaju tijek bolesti kroz supresiju ili modulaciju imunološke funkcije smanjenjem Th1/Th17 stanica koje su zaslužne za induciranje bolesti, induciranjem T regulatornih stanica, utječući na migraciju imunoloških stanica u SŽS-u i djelujući na B stanice (78). S obzirom da je u upotrebi velik broj lijekova za relapsnu formu MS-a važno je poznavati relativnu razliku u učinkovitosti između lijekova te njihove nuspojave. Odabir lijekova ovisi o: aktivnosti bolesti, stupnju onesposobljenosti te nalazu MR-a (36). U liječenju relapsne faze razlikuju se dva pristupa. Jedan pristup je eskalacijski gdje se kronična terapija kontinuirano primjenjuje i optimizira ovisno o aktivnosti bolesti. Drugi pristup je indukcijska terapija koja pomoću pulsne imunološke rekonstitucije može prolazno ili trajno inducirati imunološke promjene s mogućnošću postizanja razdoblja remisije koja ne zahtijeva primjenu lijekova (105).

Eskalacijski pristup predstavlja uobičajenu strategiju liječenja MS u kojem se lijekovi prve linije, interferoni β -1a i β -1b, glatiramer acetat (GA), teriflunomid i dimetilfumarat (DMF), uvode na početku liječenja niskoaktivnog oblika bolesti. Ovi lijekovi su umjerene učinkovitosti, ali visokog sigurnosnog profila što je važno s obzirom na potrebu za dugotrajnom primjenom (106). Preporuke za početak 1. linije liječenja u osoba s RRMS-om su: 1. Ispunjeni revidirani McDonaldovi kriteriji za RRMS iz 2017. 2. EDSS \leq 6,5 i 3. Odsustvo trudnoće (IFN- β i GA se mogu koristiti tijekom trudnoće). Nakon uvođenja terapije bolesnike treba pažljivo pratiti kako bi se procijenila učinkovitost lijeka te otkrilo bolesnike koji zahtijevaju primjenu 2. linije lijekova. U upotrebi je nekoliko alata koji omogućuju identifikaciju bolesnika koji imaju veliki rizik od buduće aktivnosti bolesti (107). Modificirani Riovi kriteriji se koriste za procjenu učinkovitosti terapije IFN- β na temelju kliničkih i radioloških parametara (108). Bolesnici koji tijekom prve godine liječenja IFN- β imaju $2 \geq$ relapsa ili $4 \geq$ nove lezije trebaju započeti liječenje 2. linijom (109). Slični rezultati su dobiveni primjenom modificiranih Riovih kriterija kod bolesnika liječenih GA (110). Drugi alat koji pomaže neurolozima je MAGNIMS zbroj. Što je MAGNIMS zbroj veći to je vjerojatnost progresije bolesti ili ponovnog relapsa veća (111). On se osim za IFN- β može koristiti i za teriflunomid (112). Drugu liniju lijekova čine natalizumab, okrelizumab, alemtuzumab, fingolimod i kladribin (113). Obilježja koja ukazuju na bolesnike koji bi mogli imati visokoaktivan oblik bolesti, odnosno nepovoljan klinički tijek su: muški spol, starija životna dob, multifokalni početak bolesti, inicijalna prezentacija simptomima kralježnične moždine ili moždanog debla, prisutnost $2 \geq$ lezija koje se

imbibiraju kontrastom, pristutnost $9 \geq T2$ lezija te abnormalnosti na multimodalnim evociranim potencijalima (114). Optimalan terapijski pristup kod bolesnika s visokoaktivnim oblikom bolesti je započinjanje liječenja lijekovima visoke učinkovitosti. Prva opcija je kronična primjena 2. linije terapije održavanja, a druga opcija je imunorekonstitucijska terapija (107).

Indukcijska terapija je relativno nov pristup liječenju. Koriste se imunosupresivi tijekom kratkog razdoblja koje je onda praćeno razdobljem bez lijekova. Temelji se na principu ranog iscrpljivanja autoreaktivnih limfocita što ima dug učinak jer kronični fenomeni poput kompartmentalizacije imunološkog odgovora unutar SŽS-a i širenja antigena nisu još uspostavljeni (115). Visoko efektivni lijekovi su uspješniji u supresiji aktivnosti bolesti ako se uvedu u početku bolesti nego u kasnijem tijeku (116). Isto tako, bolesnici s RRMS-om koji su liječeni indukcijskim pristupom su kasnije progredirali u SPMS nego oni liječeni eskalacijskim pristupom (117). Prosječne godišnje promjene u EDSS su veće kod bolesnika na eskalacijskom režimu liječenja (118). Ovakav način liječenja popraćen je i brojnim nuspojavama. Najčešće nuspojave kod primjene anti-CD20 terapije su reakcije na mjestu uboda. Od ostalih moguće su reaktivacije virusa kao što su hepatitis B virus (HBV), virus varicella-zoster (VZV), tuberkuloza, pojava progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML) te razvoj malignih bolesti (119).

Simptomatsko liječenje je važno jer popravlja kvalitetu života. Kognitivna disfunkcija i psihijatrijski poremećaji su čest problem kod pacijenata s MS-om. Kognitivno bihevioralna terapija uz farmakoterapiju je korisna u ovakvim slučajevima (120). Za sindrom nemirnih nogu se može koristiti DOPA agonist (121). Spastičnost koju iskusi 90% pacijenata s MS-om značajno smanjuje kvalitetu života. Cilj u liječenju spasticiteta osim korištenja spazmolitika je popraviti pokretljivost, držanje i održavanje higijene (122). Kod pacijenata s nokturijom se koristi dezmpresin, kod retencije antikolinergici, a kod urgencije i frekvencije Keglove vježbe (123).

Interferon beta: Interferoni su endogeni citokini koji utječu na imunosni odgovor tijekom virusne infekcije. Točan mehanizam djelovanja u MS-u je nejasan, ali sveukupan učinak je indukcija protuupalnog odgovora putem smanjenja aktivnosti molekula zaduženih za imunosno prepoznavanje kao što su MHC II, kostimulatori i adhezijske molekule, pomakom ravnoteže između proupalnih i protuupalnih citokina, smanjenjem migracije limfocita kroz KMB i mogućom stimulacijom faktora rasta živaca (124). Interferoni su sigurni lijekovi. Među najčešćim nuspojava su reakcije na mjestu aplikacije i simptomi slični gripi koji reagiraju na NSAR, paracetamol i glukokortikoide. Asimptomatska disfunkcija jetre je moguća, ali teško oštećenje je vrlo rijetko (125).

Glatiramer acetat je nasumična kombinacija glutamata, lizina, alanina i tirozina koji su antigenski slični mijelinskom bazičnom proteinu. Imunomodulatorni učinak glatiramer acetata posredovan je snažnom indukcijom Th2 suprimirajućih stanica koje migriraju u mozak te snažnim vezanjem za MHC molekule kojima time različiti antigeni mijelina ne budu prezentirani T stanicama (126).

Teriflunomid je aktivni metabolit leflunomida koji se od 1998. koristi za liječenje reumatoidnog artritisa. On selektivno inhibira dihidroorotat dehidrogenazu, jednog od ključnih enzima za primkidinsku sintezu, što vodi smanjenoj proliferaciji aktiviranih T i B stanica (127). Uzima se jednom dnevno u dozi od 14 mg. Najčešće nuspojave su: glavobolja, proljev, mučnina, povišene vrijednosti ALT-a. Rijetke nuspojave su: hepatotoksičnost, supresija koštane srži, infekcije oportunističkim agensima, povišen krvni tlak, periferna neuropatija i intersticijska bolest pluća. Za vrijeme uzimanja teriflunomida bolesniku se preporuča da ne uzima cjepivo. Upravo zbog toga se prije uvođenja terapije bolesnicima pregledava cjepni karton, cijepu se cjepivima koja nisu primili te se isključuje latentna infekcija tuberkulozom. Za vrijeme liječenja, vrijednosti bilirubina i transaminaza se moraju provjeravati svaki mjesec u prvih pola godine, dok diferencijalna krvna slika i testovi bubrežne funkcije svakih 6 mjeseci (128).

Dimetil fumarat ima imunomodulatorni učinak koji uključuje promjenu citokinskog profila s proupalnog na protuupalni te antioksidativna svojstva. Primjenjuje se peroralno. Najčešća nuspojava je crvenilo i gastrointestinalni simptomi. Pacijenti bi trebali kontrolirati razinu limfocita jer DMF u određenih pojedinaca može uzrokovati tešku limfopeniju (115).

Fingolimod je prvi S1P modulator koji je odobren za liječenje RRMS. Nakon što se fingolimod veže za receptor to uzrokuje njegovu internalizaciju. To prevenira izlazak limfocita iz sekundarnih limfnih organa. Naivne i centralne memorijske T stanice su najviše pogođene ovim lijekom zbog njihove fiziološke recirkulacije limfnim organima. To uzrokuje pad apsolutnog broja limfocita u krvnoj slici do 80% (129).

Natalizumab je prvo humanizirano monoklonalno protutijelo odobreno za liječenje MS. Veže se za $\alpha 4\beta 1$ integrin, komponente VLA-4, koji je izražen na limfocitima i koji kroz interakciju sa svojim ligandom posreduje migraciju limfocita kroz KMB. Natalizumab je povezan s povećanim rizikom od razvoja PML-a, infektivne i potencijalno smrtonosne bolesti bijele tvari, uzrokovane polioima virusom JC (115).

Okrelizumab je IgG1 protutijelo koje napada CD20⁺ B stanice i uzrokuje njihovo raspadanje. Prije početka korištenja ovog lijeka potrebno je napraviti kompletnu krvnu sliku i cjepni status. Serološko testiranje za HBV i VZV kao i skrining za tuberkulozu se preporučeni.

Potpuna cijepna pokrivenost prije početka terapije okrelizumabom je neophodna. Najčešća nuspojava je infuzijska reakcija (130).

Alemtuzumab je humanizirano monoklonsko protutijelo koje napada stanice s ekspresijom CD52⁺ i tako uzrokuje brzu i dugotrajnu depleciju tih stanica. Glavne nuspojave primjene ovog lijeka su infuzijske reakcije, infekcije i autoimuni poremećaji (115).

Kladribin je jedini lijek u indukcijskom protokolu koji se uzima peroralno. To je sintetički analog purinskog nukleozida koji pogađa limfocite u proliferativnoj fazi. Nuspojave uključuju infekcije gornjeg dišnog sustava, glavobolju, limfopeniju (131).

1.8. CD163

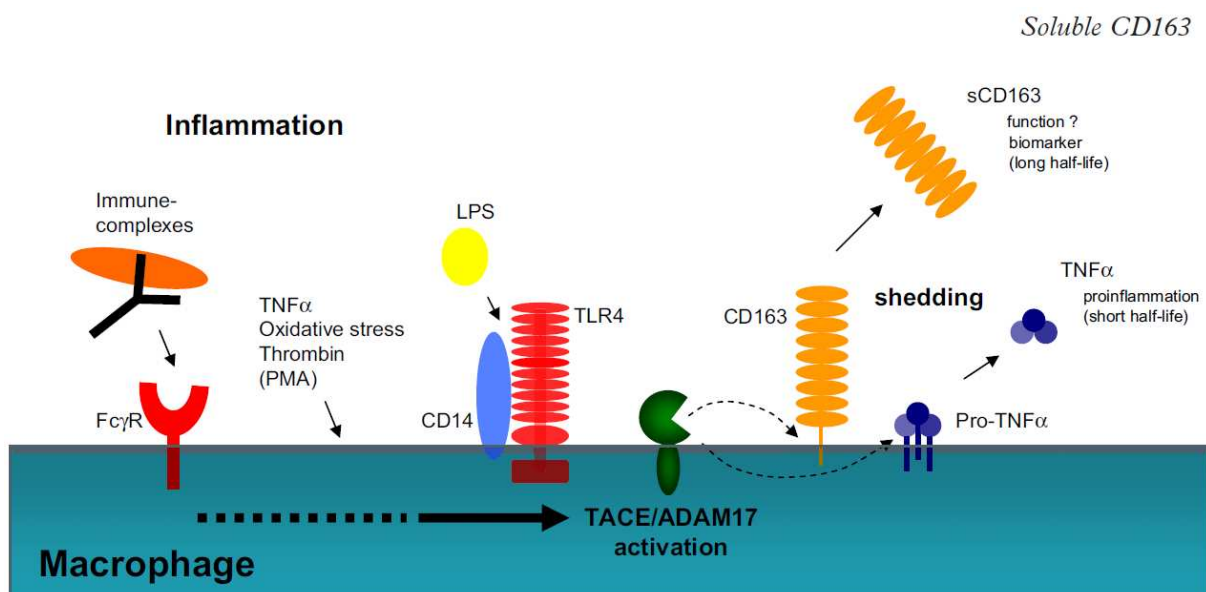
CD163 je prvi put identificiran 1987. godine i dobio je svoj CD broj 1996 (132). To je transmembranski protein od 130 kDa s kratkim citoplazmatskim repom koji pripada porodici receptora čistača s domenama klase B bogatih cisteinom (133). Ekspresija CD163 je ograničena na stanice monocitno/makrofagne loze, a dominantno je prisutna na tkivnim makrofagima kao što su makrofagi u crvenoj pulpi u slezeni, Kupfferove stanice u jetri, intersticijske i alveolarne stanice u plućima, perivaskularni makrofagi (PVM) i mikroglija u SŽS (134) te M2c makrofagima koji infiltriraju tkivo za vrijeme faze cijeljenja u upali (135). Ekspresija je značajno veća u zrelim stanicama u odnosu na monocite u krvi, ukazujući da se radi o markeru diferencijacije makrofagne loze s povećanjem ekspresije duž puta diferencijacije (136).

mCD163 visokim afinitetom veže hemoglobinsko-haptoglobinski kompleks (Hb-Hp) što dovodi do endocitoze i čišćenja ovoga kompleksa i na taj način štiti tkiva od oksidativnog oštećenja posredovanog slobodnim hemoglobinom (Hb). Ekspresija i CD163 i Hb je visoko pojačana glavnim reaktantima akutne faze, IL-6 i glukokortikoidima (137). Nadalje, na makrofagima prisutnim u koštanoj srži i drugim makrofagima uključenima u stvaranje otočića eritroblasta služi kao receptor adhezije i ima regulacijsku ulogu tijekom eritropoeze (138). Osim homeostatskih funkcija, križno povezivanje CD163 s monoklonskim protutijelima usmjerenim protiv CD163 uzrokuje proizvodnju upalnih medijatora kao što su dušikov monoskid (NO), TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-10 što upućuje na ulogu u prirođenoj imunosti (139). CD163 prepoznaje gram pozitivne i gram negativne bakterije i dovodi do inicijacije lokalnog protuupalnog odgovora koji odstranjuje infekciju (134).

Topljivi oblik, sCD163, nastaje cijepanjem mCD163 metaloproteinazama (140) (Slika 3). Njegova funkcija je nepoznata, a tijekom upale njegove razine se akutno povećavaju (141). Može se pronaći u plazmi i drugim tjelesnim tekućinama kao što je CSF (142). Pacijenti s

demijelinizirajućim bolestima imaju značajno povišene razine u CSF-u što je u skladu s neuropatološkim nalazima u aktivnim lezijama u pacijenata s RRMS-om. U ovim aktivnim lezijama makrofagi su gusto raspoređeni i također se mogu pronaći i u kroničnim, aktivnim lezijama, ali u manjem broju. U kroničnim lezijama, makrofagi su vjerojatno aktivirani mehanizmima koji uključuju i proupalne i protuupalne stimulse (143). U CSF-u ga vjerojatno oslobađaju makrofagi i mikroglia. Pacijenti s progresivnim oblikom također imaju povišene razine sCD163 što je u skladu s patološkim nalazom koji pokazuje prisutnost propadanja posredovanog stalnom upalom (144). Također, mCD163 je obrnuto povezan s razinom sCD163 u plazmi. U pacijenata s MS, proteolitičko izlučivanje CD163 u plazmu je povećano. sCD163 u serumu se može mjeriti pomoću ELISA testa, a vrlo je koristan i kao biomarker aktivacije makrofaga u raznim upalnim bolestima, npr. sindroma aktivacije makrofaga, sepse i bolesti jetre. Štoviše, opći je marker rizika komorbiditeta i smrtnosti u nekoliko kroničnih upalnih bolesti (Reumatoidni artritis, spondiloartropatije, skleroderma, astma, celijakija i Crohnova bolest) (145).

Potencijalna uloga sCD163 u MS-u trenutno nije jasna. Istraživanja su pokazala da bi mogao biti koristan kao biomarker za praćenje aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju. Stilund i sur. su pokazali da sCD163 u CSF-u i serumu nije bio u značajnoj korelaciji s EDSS, trajanjem bolesti, vremena od posljednjeg napada ili broja napadaja, ali je CSF/serum omjer bio značajno povećan u bolesnika s MS/CIS-om u odnosu na zdrave pojedince (145).



Slika 3. Stvaranje sCD163. Pokazalo se da nekoliko upalnih signala inducira odvajanje ektodomene sCD163 in vitro. Odvajanje se može izazvati npr. aktivacijom TLR4 ili FcγR-umrežavanjem posredovanim ADAM17/TACE. Poluživot sCD163 je mnogo duži od poluživota TNF- α (141).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi razliku u koncentraciji CD163 proteina između sudionika s multiplom sklerozom i kontrolne skupine.
2. Utvrditi povezanost između procjene aktivnosti bolesti (CD163) i kliničke procjene stanja onesposobljenosti (EDSS) pacijenata s RRMS.
3. Utvrditi razliku u koncentraciji CD163 proteina s obzirom na spol sudionika s RRMS.

2.1. Hipoteze

1. Očekuje se kako će sudionici s RRMS imati višu koncentraciju CD163 proteina u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, dok se ne očekuje razlika u koncentraciji CD163 proteina između sudionika s različitom težinom kliničkih oblika RRMS.
2. Očekuje se pozitivna povezanost između procjene aktivnosti bolesti i kliničke procjene stanja onesposobljenosti pacijenata s RRMS.
3. Ne očekuje se razlika u koncentraciji CD163 proteina s obzirom na spol sudionika.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

Ustroj istraživanja

Provedeno je presječno kliničko istraživanje na bolesnicima s MS-om analizom podataka prikupljenih u 2022. godini u dnevnoj bolnici Klinike za neurologiju Kliničkoga bolničkog centra Split i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

3.1. Uzorak ispitanika

Četrdeset šest bolesnika s RRMS-om liječenih teriflunomidom (Aubagio) ≥ 12 mjeseci razmatrano je za uključivanje u studiju koja se provodila u KBC-u. Njih jedanaest nije ispunilo kriterije uključivanja u pogledu trajanja uzimanja lijeka, a dvanaest je odbilo sudjelovati u istraživanju (tj. žive na otocima, imaju problema s hodanjem i sl.). Konačni uzorak studije sastavljen je od onih koji su zadovoljili kriterije uključivanja i pristali sudjelovati u studiji. Konačni uzorak studije uključivao je dvadeset i tri bolesnika s RRMS-om, prosječne dobi od $41,65 \pm 8,89$ i deset zdravih kontrolnih osoba (HC) s prosječnom dobi od $37 \pm 13,9$. Većina pacijenata s MS-om bile su žene (60,87%). Prosječno trajanje bolesti bilo je $9,39 \pm 5,73$ godine, a medijan EDSS rezultata bio je 2,5 (3,0). Od 23 pacijenta s MS-om, 57,8% je primilo kortikosteroidnu terapiju tri ili više od tri puta tijekom cijelog liječenja. Teriflunomid je primijenjen kako je navedeno u Aubagio monografiji proizvoda (14 mg na dan). Također, niti jedan od pacijenata nije doživio recidiv 3 mjeseca prije sudjelovanja u ovoj studiji.

Tablica 2. Usporedba osnovnih karakteristika pacijenata s MS-om i HC skupine

Parametar	Pacijenti s MS-om (N = 23)	HC (N = 10)	<i>P</i>
Srednja vrijednost \pm SD			
Dob	$41,65 \pm 8,89$	$37 \pm 13,90$	0,25
Visina (cm)	$175 \pm 10,27$	$179 \pm 10,34$	0,30
Tjelesna masa (kg)	$77,96 \pm 19,08$	$74,2 \pm 11,72$	0,57
ITM (kg/m ²)	$25,14 \pm 3,78$	$23 \pm 1,84$	0,10
Žene/Muškarci (n)	14/9	6/4	

Osnovni parametarski podaci prikazani su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija za parametarske podatke, kategorički podaci prikazani su kao brojevi. Kratice: HC - zdrave kontrole; BMI - indeks tjelesne mase; n - broj ispitanika prema spolu.

3.2. Postupci prikupljanja podataka: prikupljanje seruma, ELISA i klinička procjena (neurološka i radiološka)

Prvo je provedena radiološka MRI procjena mozga i leđne moždine. Jedan ili dva dana kasnije prikupljen je serum, nakon čega je uslijedio neurološki pregled. Uzimanje seruma i neurološki pregled obavljen je u KBC-u Split (Odjel za neurologiju). Analiza seruma provedena je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu (Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju).

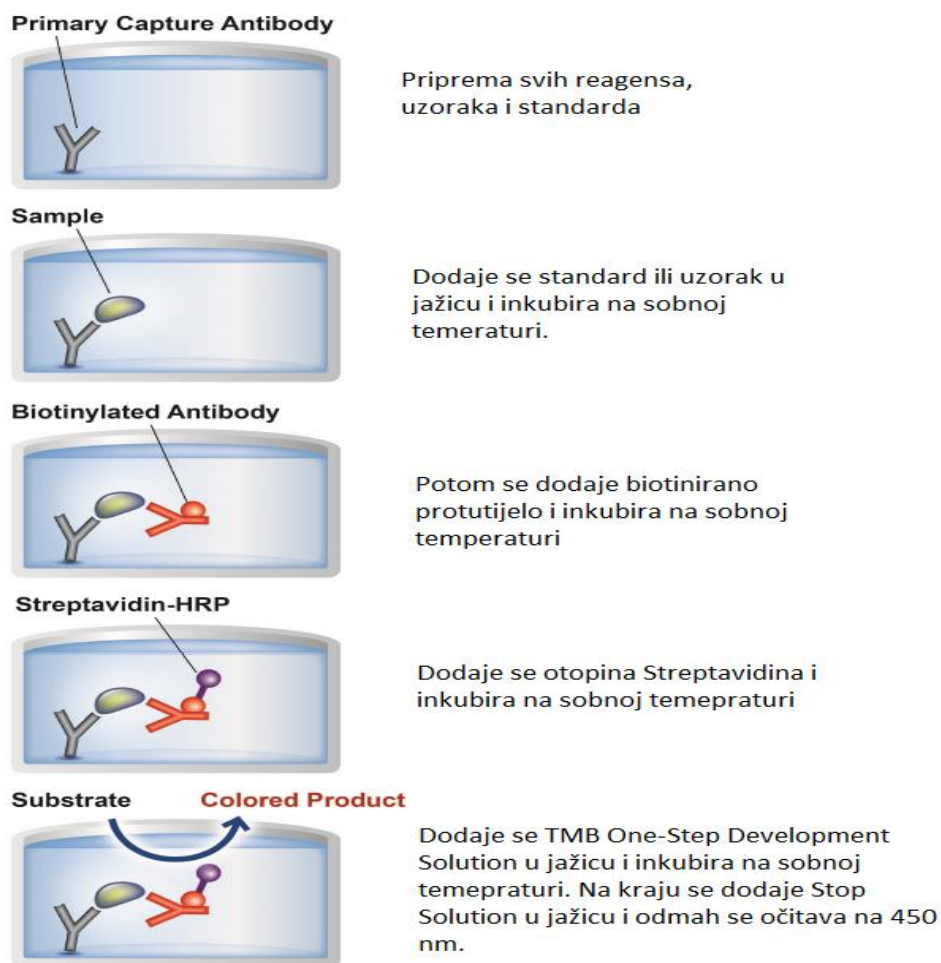
3.3. Postupak kvantitativnog mjerenja CD163 u serumu

Kvantitativno mjerenje CD163 u serumu izvršilo se korištenjem Human CD163 ELISA Kit (M130) (ab155428) koji se temelji na „sandwich“ principu.

Prije upotrebe potrebno je uravnotežiti temperature svih materijala i pripremljenih reagensa na prostornoj temperaturi (18 - 25°C). Ispitivanje svih standarda, kontrola i uzoraka vršilo se u duplikatu. Postupak je prikazan na Slici 4.

- U prvom koraku dodali smo 100 µL svakog standarda i uzorka u odgovarajuće jažice. Dobro smo poklopili i inkubirali 2,5 sata na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje.
- Potom smo isprali 4 puta s 1X Wash Otopinom. Ispire se punjenjem svake jažice s Wash Bufferom (300 µL) korištenjem višekanalne pipete ili autowasher-a. Kompletno uklanjanje tekućine u svakom koraku bitno je za dobro izvođenje. Nakon zadnjeg pranja uklonili smo sve ostatke Wash Buffera aspiracijom ili dekantiranjem.
- U trećem koraku smo dodali 100 µL 1X pripremljenog biotiniranog protutitijela u svaku jažicu. Inkubirali smo 1 sat na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje. Odbacuje se otopina te se ponavlja pranje kao u drugom koraku.
- Slijedi dodavanje 100 µL pripremljene otopine Streptavidina za svaku jažicu te inkubacija tijekom 45 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje.
- Nakon 45 minuta nužno je odbaciti otopinu te ponoviti pranje kao u drugom koraku. Svakoj smo jažici dodali 100 µL *TMB One-Step Substrate* reagensa prilikom čega se razvije boja čiji je intenzitet u razmjeru s količinom prisutnog CD163. Inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi u tami uz lagano treskanje.
- U zadnjem koraku dodali smo 50 µL Stop otopine u svaku jažicu koja promijeni boju iz plave u žutu, a potom se odmah izvrši očitavanje na 450 nm. Dobili smo srednju apsorbanciju za svaki skup dvostrukih standarda, kontrola i uzoraka i oduzima od

prosječnog nultog standarda optičke gustoće. Potom se koristi formula dana od proizvođača seta i pomoću nje kvantitativno izračunava CD163 u serumu.



Slika 4. ELISA postupak. Preuzeto sa:

<https://www.abcam.com/products/elisa/human-cd163-elisa-kit-m130-ab155428.html>

3.4. Etička načela

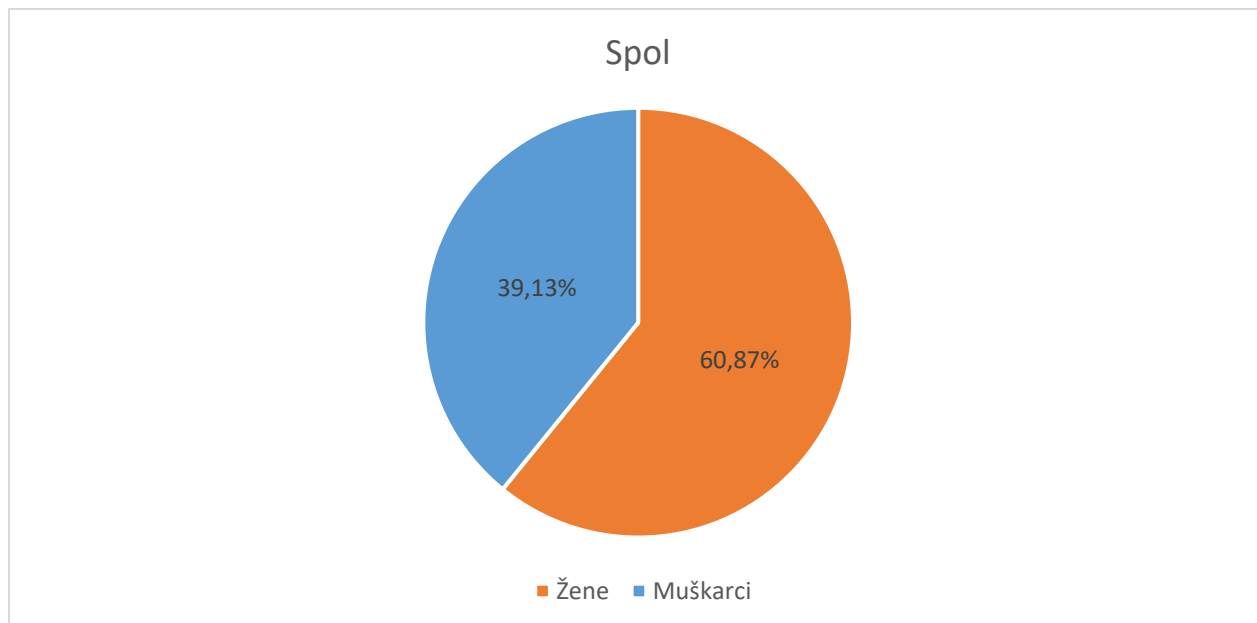
Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, a odobrilo ga je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (Klasa: 003-08 / 21-03 / 0003, Broj: 2181-198-03- 04-21-0039- travanj 2021. aneks, i drugi aneks Klasa: 003-08/22-03/003, Broj: 2181-198-03-04-22-0021, ožujak 2021.) i KBC-a Split (Kl. : 500-03/20-01/06, br: 2181-147-01/06/M.S.-20.2.2020.)

3.5. Statistički postupci

Za analizu podataka korišten je software Jamovi 2.3. Za testiranje razlika korišteni su jednosmjerna analiza varijance i t-test za nezavisne skupine. Za izračunavanje povezanosti korišten je Pearsonov koeficijent korelacije. Razine značajnosti postavljene su na $P < 0,05$, odnosno $P < 0,01$.

4. REZULTATI

Uzorak s RRMS-om se sastoji od bolesnika koji su zadovoljili kriterij uvrštenja i pristali sudjelovati u studiji. Ukupno je bilo 14 žena (60,87%) i 9 muškaraca (39,13%), omjer žene:muškarci je stoga 1,56:1. Na Slici 5 prikazana je razdioba po spolu bolesnika oboljelih od MS-e.



Slika 5. Grafički prikaz razdiobe skupine oboljelih od MS-a

Od 23 bolesnika s RRMS-om, 15 ih je imalo teži klinički oblik (65,22%) uz EDSS rezultat ($2,57 \pm 1,47$), a 8 ih je imalo blaži klinički oblik (34,78%) uz EDSS rezultat ($1,06 \pm 1,02$) (Slika 6).



Slika 6. Grafički prikaz podjele bolesnika s obzirom na oblik multiple skleroze

Tablica 3 sadrži prikaz deskriptivnih parametara pokazatelja bolesti.

Tablica 3. Deskriptivni parametri pokazatelja bolesti (N=31)

Varijabla	Skupina	<i>M</i>	<i>SD</i>	Medijan	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>IQR</i>	Raspon	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>P</i>
CD163 (ng/ml)	T	834,57	335,29	789,00	298	1322	510,00	1024	2,08	2/28	0,143
	L	720,31	156,98	699,75	486	978	137,50	492			
	Z	591,75	225,10	526,50	297	902,5	392,13	605,5			
EDSS	T	2,57	1,47	3,50	0	4,00	1,50	4,00			
	L	1,06	1,02	1,00	0	2,50	2,00	2,50			

T- teži oblik MS-a

L- lakši oblik MS-a

Z- zdrava kontrola

Podaci za varijable prikazani su kao *M*- srednja vrijednost, *SD*- standardna devijacija, *min*- minimum, *max*- maksimum i *IQR*- interkvartilni raspon.

Iz Tablice 3 je vidljivo kako nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji CD163 proteina u serumu između sudionika s različitom težinom kliničkih oblika RRMS-a, kao ni razlika između sudionika s RRMS-om i zdrave kontrolne skupine ($P>0.05$).

Kako bi se provjerila povezanost između aktivnosti bolesti (CD163) i kliničke procjene stanja onesposobljenosti (EDSS) pacijenata s RRMS-om izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije između promatranih varijabli.

Nije utvrđena statistički značajna korelacija ($r=0,112$, $P=0,609$) između serumske koncentracije CD163 i EDSS-a.

Kako bismo provjerili razliku u koncentraciji CD163 proteina s obzirom na spol sudionika s RRMS-om proveden je t-test za nezavisne uzorke čiji su rezultati prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. t-test za utvrđivanje razlike u koncentraciji CD163 proteina s obzirom na spol sudionika s RRMS-om (N=23).

Varijabla	M _M	M _ž	SD _M	SD _ž	t	df	P
CD163 (ng/ml)	947	697	227	285	2,22*	21	0,038

M- muškarci, ž- žene,

Podaci za varijable prikazani su kao M- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija

* $P < 0,05$

Provedbom t-testa za nezavisne uzorke utvrđena je značajna razlika u koncentraciji CD163 s obzirom na spol ($P=0,038$). Muškarci imaju višu koncentraciju CD163 u odnosu na žene.

5. RASPRAVA

Multipla skleroza je najčešća upalna neurološka bolest u mladih odraslih osoba koja je ujedno najčešći uzrok netraumatskog invaliditeta (1). Prevalencija je u porastu, a procjenjuje se da trenutno oko 2,3 milijuna ljudi boluje od MS-a (3). U RRMS-u žene su gotovo tri puta češće zahvaćene od muškaraca, sa srednjom dobi početka ~30 godina, dok su u PPMS-u muškarci i žene podjednako zahvaćeni sa srednjom dobi početka ~40 godina (4). Dobne skupine između 35 i 64 godine bilježe najveću stopu prevalencije, a bolest se pojavljuje u prosjeku 5 godina ranije u žena (20,21). Nastanak multiple skleroze je složen. Nije rezultat jednog uzročnog događaja, već kombinacije okolišnih čimbenika i genetske predispozicije (22). Aktivacija potencijalno autoreaktivnog CD4 limfocita na periferiji predstavlja ključan događaj u patogenezi, koji jednom kad dođe u SŽS biva ponovno aktiviran te uzrokuje lokalno oštećenje uz trajnu aktivaciju mikroglije i makrofaga (52). Za postavljanje dijagnoze koriste se McDonaldovi kriteriji koji se temelje na diseminaciji u prostoru i diseminaciji u vremenu. Za ispunjavanje kriterija koriste se klinički, MRI i CSF dokazi. Unatoč tome, dijagnoza ove bolesti je i dalje izazovna zbog kliničke i radiološke raznolikosti MS-a te nedostatak specifičnoga i osjetljivog biomarkera (86). Zbog autoimune prirode MS-a, brojna su se istraživanja usredotočila na specifične komponente imunološkog sustava, kao što su MBP, MOG i MPP kako bi se pokušalo dijagnosticirati pacijente u najranijoj mogućoj fazi njihove bolesti. Dokazala im se korelacija s MS-om, ali trenutno im nedostaje upotrebljivost kao točnih dijagnostičkih biomarkera (96).

Među istraživanim markerima je i CD163 koji se u serumu može mjeriti pomoću ELISA testa, a vrlo je koristan i kao biomarker aktivacije makrofaga u raznim upalnim bolestima, npr. sindroma aktivacije makrofaga, sepse i bolesti jetre. Štoviše, opći je marker rizika komorbiditeta i smrtnosti u nekoliko kroničnih upalnih bolesti (Reumatoidni artritis, spondiloartropatije, skleroderma, astma, celijakija i Crohnova bolest) (145). Pacijenti s demijelinizirajućim bolestima imaju značajno povišene razine u CSF-u što je u skladu s neuropatološkim nalazima u aktivnim lezijama u pacijenata s RRMS-om. U ovim aktivnim lezijama makrofagi su gusto raspoređeni i također se mogu pronaći i u kroničnim, aktivnim lezijama, ali u manjem broju. U kroničnim lezijama, makrofagi su vjerojatno aktivirani mehanizmima koji uključuju i proupalne i protuupalne stimuluse (143). U CSF-u ga vjerojatno oslobađaju makrofagi i mikroglija. Lassmann i suradnici su pokazali da pacijenti s progresivnim oblikom također imaju povišene razine sCD163 što je u skladu s patološkim nalazom koji pokazuje prisutnost propadanja posredovanog stalnom upalom (144).

Kao i kod većine autoimunih bolesti, MS je češća kod žena. U RRMS-u žene su 3 puta češće zahvaćene od muškaraca. U našem istraživanju je bilo 1,56 puta više žena od muškaraca

što se ne poklapa sa studijom Confavreux i suradnika (4). Ovaj niski omjer može biti posljedica male skupine promatranih bolesnika ili se može pripisati većoj suradljivosti muškaraca nego žena.

U ovoj studiji nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji CD163 proteina u serumu između sudionika s različitom težinom kliničkih oblika RRMS-a, kao ni razlika između sudionika s RRMS-om i zdrave kontrolne skupine. Rezultati sCD163 u bolesnika s težom kliničkom slikom iznosili su 834.57 ± 335.29 ng/ml, u bolesnika s lakšom kliničkim oblikom 720.31 ± 156.98 ng/ml, a u zdravoj kontroli 591.75 ± 225.10 ng/ml. Ovi rezultati su u skladu s nalazima De Fino i suradnika (146) te Stilunda i suradnika (145), koji nisu dobili statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina pacijenata s multiplom sklerozom i kontrolnih skupina u pogledu serumskih razina sCD163. De Fino i suradnici su izvijestili o srednjoj serumskoj razini sCD163 u RRMS pacijenata od 470 ng/ml $\pm 464,2$ (146), dok su Stilund i suradnici izvijestili o srednjoj serumskoj razini sCD163 u RRMS skupini od 1490 ng/ml s rasponom od 390 do 4530 ng/ml (145). Za razliku od našeg istraživanja, Farrokhi i suradnici te Mona i suradnici su otkrili da je serumska razina sCD163 značajno viša u pacijenata s RRMS-om u odnosu na zdrave kontrolne osobe (147,148). Srednja vrijednost serumskih razina Farrokhi i suradnika iznosila je sCD163 bila je 2160 ng/ml ± 1140 SD u bolesnika s RRMS-om, dok je u kontrolnoj skupini iznosila 1450 ng/ml ± 730 (147), dok su Mona i suradnici dobili medijan od 1200 ng/ml s rasponom od 150 do 5000 ng/ml u bolesnika s RRMS-om, dok je u kontrolnoj skupini medijan bio $76,5$ ng/ml, a raspon od $1,5$ do 100 ng/ml (148). Međutim, u studiji koju su proveli Mona i suradnici pacijenti su u odnosu na našu studiju bili oko 10 godina mlađi s oko 5 godina kraćim trajanjem bolesti, a u studiji koju je proveo Farrokhi sa suradnicima bilo je dva puta više muškaraca od žena, prosječno trajanje bolesti je bilo oko 5 godina kraće, a pacijenti su bili isključeni ako su bili u relapsu.

U ovoj studiji nije utvrđena povezanost između serumske koncentracije CD163 i kliničke procjene stanja onesposobljenosti (EDSS) pacijenata s RRMS-om. Ovo je u skladu s nalazom Mona i suradnika (148), Gjelstrupa i suradnika (149) te Stilunda i suradnika (145) koji također nisu pronašli statistički značajnu povezanost između sCD163 i EDSS-a. Farrokhi i suradnici (147) su dobili značajno pozitivnu korelaciju između sCD163 i EDSS-a. Razlog ovome nalazu mogao bi biti zbog njihovog kriterija isključenja pacijenata koji su bili podvrgnuti imunomodulirajućem liječenju unutar mjeseca prije uzorkovanja.

U našem istraživanju muškarci su imali višu koncentraciju CD163 u odnosu na žene. Razlog ovakvom nalazu može biti zbog maloga broja ispitanika. Druga su istraživanja umjesto

razlike u koncentraciji CD163 između spolova, gledala korelaciju spola i CD163 i nisu je utvrdili (145).

Potencijalna uloga sCD163 kao dijagnostičkog markera u MS-u trenutno nije jasna. Istraživanja su pokazala da bi mogao biti koristan kao biomarker za praćenje aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju (145).

Ograničenja ovoga istraživanja jesu presječni oblik istraživanja, nedovoljno velik uzorak ispitanika, što se studija usredotočila na ograničeni podtip MS-a i provedba istraživanja samo u jednome centru.

6. ZAKLJUČCI

Provedenim istraživanjem prikazali smo sljedeće rezultate:

1. Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji CD163 proteina u serumu između sudionika s različitom težinom kliničkih oblika RRMS-a, kao ni razlika između sudionika s RRMS-om i zdrave kontrolne skupine.
2. Ne postoji povezanost između procjene aktivnosti bolesti i kliničke procjene stanja onesposobljenosti pacijenata s RRMS.
3. Muškarci imaju višu koncentraciju CD163 u odnosu na žene.

7. LITERATURA

1. Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E, Bhutta ZA, Gebrehiwot TT, Hay SI i sur. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18:269–85.
2. Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol.* 2014;72:132–41.
3. Zwibel HL, Smrtka J. Improving quality of life in multiple sclerosis: an unmet need. *Am J Manag Care.* 2011;17:139–45.
4. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain J Neurol.* 2006;129:606–16.
5. Wallin MT, Culpepper WJ, Campbell JD, Nelson LM, Langer-Gould A, Marrie RA i sur. The prevalence of MS in the United States: A population-based estimate using health claims data. *Neurology.* 2019;92:1029–40.
6. Cree BAC, Gourraud P, Oksenberg JR, Bevan C, Crabtree-Hartman E, Gelfand JM i sur. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann Neurol.* 2016;80:499–510.
7. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV i sur. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology.* 2014;83:1022–4.
8. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 2010;9:520–32.
9. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD i sur. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol.* 2006;5:932–6.
10. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van Der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011;82:1132–41.
11. Noonan CW, Williamson DM, Henry JP, Indian R, Lynch SG, Neuberger JS i sur. The prevalence of multiple sclerosis in 3 US communities. *Prev Chronic Dis.* 2010;7:A12.
12. Wallin MT, Culpepper WJ, Coffman P, Pulaski S, Maloni H, Mahan CM i sur. The Gulf War era multiple sclerosis cohort: age and incidence rates by race, sex and service. *Brain.* 2012;135:1778–85.
13. Kurtzke JF. Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain.* 2013;136:2904–17.
14. Krupp LB, Tardieu M, Amato MP, Banwell B, Chitnis T, Dale RC i sur. International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating disorders: revisions to the 2007 definitions. *Mult Scler J.* 2013;19:1261–7.
15. Bermel RA, Rae-Grant AD, Fox RJ. Diagnosing multiple sclerosis at a later age: more than just progressive myelopathy. *Mult Scler J.* 2010;16:1335–40.

16. Benjak T, Štefančić V, Draušnik Ž, Cerovečki I, Roginić D, Habek M i sur. Prevalence of multiple sclerosis in Croatia: data from national and non-governmental organization registries. *Croat Med J.* 2018;59:65–70.
17. Sepčić J, Antonelli L, Materljan E, Šepić-Grahovac D. Multiple sclerosis cluster in Gorski Kotar, Croatia, Yugoslavia. In Battaglia M, editor. *Multiple sclerosis research.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division); 1989. str. 165-9.
18. Perković O, Jurjević A, Antončić I, Dunatov S, Bralić M, Ristić S. The town of Cabar, Croatia, familiar pseudocluster for multiple sclerosis--descriptive epidemiological study. *Coll Antropol.* 2010;34:141–4.
19. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *BMJ.* 1971;3:725–9.
20. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L i sur. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol.* 2006;13:700–22.
21. Bašić Kes V. *Neuroimunologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2015. 442 str.
22. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol.* 2010;9:727–39.
23. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2018;20:43–7.
24. Williams A, Eldridge R, McFarland H, Houff S, Krebs H, McFarlin D. Multiple sclerosis in twins. *Neurology.* 1980;30:1139–1139.
25. Sadovnick AdeleD, Heltberg A, Holm NielsV. Concordance in twins and recurrence in sibships in multiple sclerosis. *The Lancet.* 1982;319:1068.
26. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W i sur. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med.* 1986;315:1638–42.
27. Kinnunen E, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K. Multiple sclerosis in a nationwide series of twins. *Neurology.* 1987;37:1627–1627.
28. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GPA, Bulman D, Hashimoto L, Party DW i sur. A population-based study of multiple sclerosis in twins: Update. *Ann Neurol.* 2004;33:281–5.
29. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DAS. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology.* 1994;44:11–11.
30. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, The Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:12877–82.
31. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol.* 2019;26:27–40.

32. Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A i sur. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet.* 2005;77:454–67.
33. Marrosu MG. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2907–16.
34. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL i sur. *N Engl J Med.* 2007;357:851–62.
35. Sawcer S, Franklin RJM, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* 2014;13:700–9.
36. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple sclerosis: Mechanisms and immunotherapy. *Neuron.* 2018;97:742–68.
37. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol.* 2007;61:288–99.
38. Sundstrom P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nystrom L i sur. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: A prospective study. *Neurology.* 2004;62:2277–82.
39. Levin LI. Temporal relationship between elevation of Epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA.* 2005;293:2496.
40. Yeh EA, Chitnis T, Krupp L, Ness J, Chabas D, Kuntz N i sur. Pediatric multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2009;5:621–31.
41. Hernan MA. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol.* 2001;154:69–74.
42. Hedström A, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2011;17:788–93.
43. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* 2006;296:2832.
44. Aranow C. Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med.* 2011;59:881–6.
45. Lazibat I. Multiple sclerosis: new aspects of immunopathogenesis. *Acta Clin Croat.* 2018. doi: 10.20471/acc.2018.57.02.17.
46. Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide: MS pathophysiology and the place of teriflunomide. *Acta Neurol Scand.* 2011;124:75–84.
47. Malpass K. ‘Outside-in’ demyelination in MS. *Nat Rev Neurol.* 2012;8:61–61.
48. Racke M. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol.* 2009;12:215.
49. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683–747.

50. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:291–301.
51. Prat E, Martin R. The immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Rehabil Res Dev.* 2002;39:187–99.
52. O’connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol.* 2001;21:81–92.
53. Dutta R, Trapp BD. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology.* 2007;68:22–31.
54. Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol.* 1999;12:295–302.
55. Waxman SG. Demyelinating diseases — new pathological insights, new therapeutic targets. *N Engl J Med.* 1998;338:323–5.
56. Louten J, Boniface K, De Waal Malefyt R. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:1004–11.
57. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells. *Nat Med.* 2008;14:337–42.
58. Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:87–90.
59. Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A i sur. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2013;123:247–60.
60. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ i sur. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology.* 2014;83:278–86.
61. Yamasaki R, Kira J ichi. *Multiple Sclerosis.* Myelin Singapore: Springer Singapore. 2019. doi: 10.1007/978-981-32-9636-7_14.
62. Miller D, Weinshenker B, Filippi M, Banwell B, Cohen J, Freedman M i sur. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler J.* 2008;14:1157–74.
63. Krupp LB, Banwell B, Tenenbaum S. Consensus definitions proposed for pediatric multiple sclerosis and related disorders. *Neurology.* 2007;68:7–12.
64. Söderström M, Lindqvist M, Hillert J, Käll TB, Link H. Optic neuritis: findings on MRI, CSF examination and HLA class II typing in 60 patients and results of a short-term follow-up. *J Neurol.* 1994;241:391–7.
65. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol.* 2012;11:157–69.

66. The Optic Neuritis Study Group. Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up. *Arch Neurol*. 2008;65:727–732.
67. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R i sur. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008;131:808–17.
68. Tintore M, Rovira A, Rio J, Nos C, Grive E, Tellez N i sur. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006;67:968–72.
69. Tintore M, Rovira A, Rio J, Tur C, Pelayo R, Nos C i sur. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008;70:1079–83.
70. Klineova S, Lublin FD. Clinical course of multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8:a028928.
71. Lublin FD, Baier M, Cutter G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology*. 2003;61:1528–32.
72. Vollmer T. The natural history of relapses in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2007;256:5–13.
73. Mohr DC, Hart SL, Julian L, Cox D, Pelletier D. Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ*. 2004;328:731.
74. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;339:285–91.
75. Vukusic S, Confavreux C. Prognostic factors for progression of disability in the secondary progressive phase of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2003;206:135–7.
76. Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol*. 2006;5:343–54.
77. Javalkar V, McGee J, Minagar A. Clinical manifestations of multiple sclerosis: an overview. Elsevier. 2016. doi: 10.1016/B978-0-12-800763-1.00001-4.
78. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of multiple sclerosis: a review. *Am J Med*. 2020;133:1380-1390.
79. Gelfand JM. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. U: Goodin DS, urednici. *Handbook of Clinical Neurology*. Treće izdanje. Elsevier; 2014. str. 269-290.
80. Balcer LJ. Optic neuritis. *N Engl J Med*. 2006;354:1273–80.
81. Optic neuritis study group. The clinical profile of optic neuritis: experience of the optic neuritis treatment trial. *Arch Ophthalmol*. 1991;109:1673.
82. Burman J, Raininko R, Fagius J. Bilateral and recurrent optic neuritis in multiple sclerosis: Optic neuritis in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2011;123:207–10.

83. Tornes L, Conway B, Sheremata W. Multiple sclerosis and the cerebellum. *Neurol Clin.* 2014;32:957–77.
84. Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H i sur. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2007;17:38–44.
85. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G i sur. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17:162–73.
86. Solomon AJ. Diagnosis, differential diagnosis, and misdiagnosis of multiple sclerosis. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2019;25:611–35.
87. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *The Lancet.* 2017;389:1336–46.
88. Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, Schmidt R, Niederkorn K, Horner S i sur. Criteria for an increased specificity of MRI interpretation in elderly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology.* 1988;38:1822–1822.
89. Van Walderveen MAA, Kamphorst W, Scheltens P, Van Waesberghe JHTM, Ravid R, Valk J i sur. Histopathologic correlate of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology.* 1998;50:1282–8.
90. Smith ME, Stone LA, Albert PS, Frank JA, Martin R, Armstrong M i sur. Clinical worsening in multiple sclerosis is associated with increased frequency and area of gadopentetate dimeglumine-enhancing magnetic resonance imaging lesions. *Ann Neurol.* 1993;33:480–9.
91. Fazekas F, Barkhof F, Filippi M, Grossman RI, Li DKB, McDonald WI i sur. The contribution of magnetic resonance imaging to the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology.* 1999;53:448–448.
92. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M i sur. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69:292–302.
93. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84:909–14.
94. Leocani L, Comi G. Clinical neurophysiology of multiple sclerosis. U: Goodin DS, urednici. *Handbook of Clinical Neurology.* Treće izdanje. Elsevier; 2014. str. 671-679.
95. Comi G, Filippi M, Martinelli V, Sirabian G, Visciani A, Campi A i sur. Brain magnetic resonance imaging correlates of cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1993;115:66–73.
96. D'Ambrosio A, Pontecorvo S, Colasanti T, Zamboni S, Francia A, Margutti P. Peripheral blood biomarkers in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2015;14:1097–110.

97. DeMarshall C, Goldwaser EL, Sarkar A, Godsey GA, Acharya NK, Thayasivam U i sur. Autoantibodies as diagnostic biomarkers for the detection and subtyping of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2017;309:51–7.
98. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33:1444–1444.
99. Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2014;14:58.
100. Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med.* 2016;16:53–9.
101. D’hooghe M, Nagels G, Bissay V, De Keyser J. Modifiable factors influencing relapses and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2010;16:773–85.
102. Smets I, Van Deun L, Bohyn C, Van Pesch V, Vanopdenbosch L i sur. Corticosteroids in the management of acute multiple sclerosis exacerbations. *Acta Neurol Belg.* 2017;117:623–33.
103. Sloka JS, Stefanelli M. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2005;11:425–32.
104. Deva R, Rajendran P. Recent advances in the management of multiple sclerosis. *Int J Basic Clin Pharmacol.* 2022;11:520.
105. Comi G, Radaelli M, Soelberg Sørensen P. Evolving concepts in the treatment of relapsing multiple sclerosis. *The Lancet.* 2017;389:1347–56.
106. Ontaneda D, Tallantyre E, Kalincik T, Planchon SM, Evangelou N. Early highly effective versus escalation treatment approaches in relapsing multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2019;18:973–80.
107. Habek M, Adamec I, Barun B, Bašić Kes V, Bogoje Raspopović A, Duka Glavor K i sur. Treatment of relapsing multiple sclerosis – recommendations of the Croatian Neurological Society. *Croat Med J.* 2022;63:379–88.
108. Río J, Castelló J, Rovira A, Tintoré M, Sastre-Garriga J, Horga A i sur. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon β in MS. *Mult Scler J.* 2009;15:848–53.
109. Sormani M, Río J, Tintoré M, Signori A, Li D, Cornelisse P i sur. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2013;19:605–12.
110. Río J, Rovira A, Tintoré M, Sastre-Garriga J, Castelló J, Auger C i sur. Evaluating the response to glatiramer acetate in relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS) patients. *Mult Scler J.* 2014;20:1602–8.
111. Sormani MP, Gasperini C, Romeo M, Río J, Calabrese M, Cocco E i sur. Assessing response to interferon- β in a multicenter dataset of patients with MS. *Neurology.* 2016;87:134–40.

112. Sormani MP, Truffinet P, Thangavelu K, Ruffi P, Simonson C, De Stefano N. Predicting long-term disability outcomes in patients with MS treated with teriflunomide in TEMSO. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2017;4:379.
113. Brinar V i sur. *Multipla skleroza. Neurologija za medicinare. Drugo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 324–338.*
114. Leocani L, Rocca MA, Comi G. MRI and neurophysiological measures to predict course, disability and treatment response in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2016;29:243–53.
115. Callegari I, Derfuss T, Galli E. Update on treatment in multiple sclerosis. *Presse Médicale*. 2021;50:104068.
116. Merkel B, Butzkueven H, Traboulsee AL, Havrdova E, Kalincik T. Timing of high-efficacy therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis: A systematic review. *Autoimmun Rev*. 2017;16:658–65.
117. Brown JW, Coles A, Horakova D, Havrdova E, Izquierdo G, Prat A i sur. Association of initial disease-modifying therapy with later conversion to secondary progressive multiple sclerosis. *JAMA*. 2019;321:175.
118. Iaffaldano P, Lucisano G, Caputo F, Paolicelli D, Patti F, Zaffaroni M i sur. Long-term disability trajectories in relapsing multiple sclerosis patients treated with early intensive or escalation treatment strategies. *Ther Adv Neurol Disord*. 2021;14:175628642110195.
119. Gabelić T, Barun B, Adamec I, Krbot Skorić M, Habek M. Product review on MAbs (alemtuzumab and ocrelizumab) for the treatment of multiple sclerosis. *Hum Vaccines Immunother*. 2021;17:4345–62.
120. Thomas PW, Thomas S, Hillier C, Galvin K, Baker R. Psychological interventions for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006. doi: 0.1002/14651858.CD004431.pub2.
121. Veauthier C. Sleep disorders in multiple sclerosis. Review. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015;15:21.
122. Nair KPS, Marsden J. The management of spasticity in adults. *BMJ*. 2014;349:4737–4737.
123. Ferreira APS, Pegorare ABGDS, Salgado PR, Casafus FS, Christofolletti G. Impact of a pelvic floor training program among women with multiple sclerosis: a controlled clinical trial. *Am J Phys Med Rehabil*. 2016;95:1–8.
124. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis: *CNS Drugs*. 2011;25:491–502.
125. Tremlett HL, Oger J. Elevated aminotransferases during treatment with interferon-beta for multiple sclerosis: actions and outcomes. *Mult Scler J*. 2004;10:298–301.
126. Arnon R, Aharoni R. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:14593–8.

127. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, Kaplan J, Wiendl H. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs*. 2014;74:659–74.
128. Rommer PS, Zettl UK, Kieseier B, Hartung HP, Menge T, Frohman E i sur. Requirement for safety monitoring for approved multiple sclerosis therapies: an overview. *Clin Exp Immunol*. 2014;175:397–407.
129. Fischer-Barnicol B, Oechtering J, Kuhle J, Lorscheider J, Kappos L, Derfuss T. Combination of teriflunomide and interferon as follow-up therapy after fingolimod-associated PML. *Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2021;8:927.
130. Lamb YN. Ocrelizumab: A review in multiple sclerosis. *Drugs*. 2022;82:323–34.
131. Sipe J. Cladribine in treatment of chronic progressive multiple sclerosis. *The Lancet*. 1994;344:9–13.
132. Zwadlo G, Voegeli R, Osthoff KS, Sorg C. A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Pathobiology*. 1987;55:295–304.
133. Liu S, Zhang C, Maimela NR, Yang L, Zhang Z, Ping Y i sur. Molecular and clinical characterization of CD163 expression via large-scale analysis in glioma. *OncoImmunology*. 2019;8:1601478.
134. Fabriek BO, Van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K i sur. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*. 2009;113:887–92.
135. Anders HJ, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int*. 2011;80:915–25.
136. Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol*. 2010;47:1650–60.
137. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA i sur. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409:198–201.
138. Fabriek BO, Polfliet MMJ, Vloet RPM, Van Der Schors RC, Ligtenberg AJM, Weaver LK i sur. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood*. 2007;109:5223–9.
139. Polfliet MMJ, Fabriek BO, Daniëls WP, Dijkstra CD, Van Den Berg TK. The rat macrophage scavenger receptor CD163: Expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology*. 2006;211:419–25.
140. Møller HJ, Nielsen MJ, Maniecki MB, Madsen M, Moestrup SK. Soluble macrophage-derived CD163: A homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin–hemoglobin binding. *Immunobiology*. 2010;215:406–12.
141. Møller HJ. Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012;72:1–13.

142. Galea J, Cruickshank G, Teeling JL, Boche D, Garland P, Perry VH i sur. The intrathecal CD163-haptoglobin–hemoglobin scavenging system in subarachnoid hemorrhage. *J Neurochem.* 2012;121:785–92.
143. Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmarch HA i sur. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions: Macrophages in MS. *Ann Neurol.* 1995;38:788–96.
144. Lassmann H, Van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011;585:3715–23.
145. Stilund M, Reuschlein AK, Christensen T, Møller HJ, Rasmussen PV, Petersen T. Soluble CD163 as a marker of macrophage activity in newly diagnosed patients with multiple sclerosis. Nataf S, editor. *PLoS ONE.* 2014;9:98588.
146. De Fino C, Lucchini M, Lucchetti D, Nociti V, Losavio FA, Bianco A i sur. The predictive value of CSF multiple assay in multiple sclerosis: a single center experience. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;35:176–81.
147. Farrokhi M, Saadatpour Z, Fadaee E, Saadatpour L, Rezaei A, Moeini P i sur. A novel approach to discriminate subgroups in multiple sclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2016;15:536–46.
148. Rafik MM, Hassan E, Steit A. Serum soluble CD163 as a marker of activity in MS patients. *Med J Cairo Univ.* 2022;90:1039–45.
149. 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;96:160–74.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Prikazati i usporediti razliku u koncentraciji CD163 proteina između oboljelih od multiple skleroze i zdrave populacije. Utvrditi povezanost između koncentracije CD163 i kliničke procjene stanja onesposobljenosti pacijenata s RRMS-om te usporediti razliku u koncentraciji CD163 proteina s obzirom na spol oboljelih od MS-a.

Ispitanici i postupci: Uključeno je dvadeset i tri bolesnika s RRMS-om koji su primali teriflunomid, prosječne dobi od $41,65 \pm 8,89$ i deset zdravih kontrolnih osoba s prosječnom dobi od $37 \pm 13,9$. Prosječno trajanje bolesti bilo je $9,39 \pm 5,73$ godine, a medijan EDSS rezultata bio je 2,5 (3,0). Od 23 pacijenta s MS-om, 57,8% je primilo kortikosteroidnu terapiju tri ili više od tri puta tijekom cijelog liječenja. Nitko od pacijenata nije doživio recidiv 3 mjeseca prije sudjelovanja u ovoj studiji. Najprije je obavljena radiološka MRI procjena mozga i leđne moždine. Nakon tog koraka, serum je prikupljen za jedan ili dva dana, a potom je izvršen neurološki pregled. Kvantitativno mjerenje CD163 u serumu izvršilo se korištenjem Human CD163 ELISA Kit (M130) (ab155428). Uspoređene su koncentracije CD163 u serumu između bolesnika i zdravih kontrola te između spolova oboljelih od RRMS-a te se pokušala utvrditi povezanost koncentracije CD163 i EDSS-a. Statistička značajnost postavljena je na $P < 0,05$.

Rezultati: Od ukupno 23 ispitanika oboljela od MS-a, 14 je ženskog (60,87%), a 9 muškog spola (39,13%), stoga je omjer žene:muškarci 1,56:1. 15 ih je imalo teži klinički oblik (65,22%), a 8 blaži klinički oblik (34,78%). Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji CD163 proteina u serumu između sudionika s različitom težinom kliničkih oblika RRMS-a, kao ni razlika između sudionika s RRMS-om i zdrave kontrolne skupine ($P > 0,05$). Rezultati sCD163 u bolesnika s težom kliničkom slikom iznosili su $834,57 \pm 335,29$ ng/ml, u bolesnika s lakšom kliničkim oblikom $720,31 \pm 156,98$ ng/ml, a u zdravoj kontroli $591,75 \pm 225,10$ ng/ml. Nije utvrđena statistički značajna korelacija između serumske koncentracije CD163 i EDSS-a. Medijan EDSS bolesnika s težim oblikom iznosio je 3,50 (2-3,50), a u onih s lakšim oblikom 1,00 (0,0-2,0). Muškarci imaju značajno višu koncentraciju CD163 u odnosu na žene ($P < 0,05$). Prosječna koncentracija CD163 za muškarce iznosili su 947 ± 227 ng/ml, a za žene 697 ± 285 ng/ml.

Zaključak: Koncentracija CD163 proteina u serumu se između bolesnika s različitom težinom kliničkih oblika RRMS-a međusobno, ali i u odnosu na zdravu populaciju ne razlikuje značajno. Ne postoji povezanost između razine CD163 i kliničke procjene stanja onesposobljenosti pacijenata s RRMS-om. Muškarci imaju višu koncentraciju CD163 u odnosu na žene.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Measurement of CD163 protein in patients with relapse-remitting multiple sclerosis.

Objectives: To show and compare the difference in CD163 protein concentration between patients with multiple sclerosis and the healthy population. To determine the relationship between the concentration of CD163 and the clinical assessment of the condition of patients with RRMS and to compare the difference in the concentration of the CD163 protein with regard to the gender of patients with MS.

Subjects and methods: Twenty-three patients with RRMS receiving teriflunomide, mean age of $41,65 \pm 8,89$, and ten healthy controls with a mean age of $37 \pm 13,9$ were included. The average duration of the disease was $9,39 \pm 5,73$ years, and the median EDSS score was 2,5 (3,0). Of the 23 patients with MS, 57,8% received corticosteroid therapy three or more times during the entire treatment. None of the patients experienced a relapse 3 months prior to participation in this study. First, a radiological MRI assessment of the brain and spinal cord was performed. After this step, the serum was collected for one or two days, and then a neurological examination was performed. Quantitative measurement of CD163 in serum was performed using the Human CD163 ELISA Kit (M130) (ab155428). Serum CD163 concentrations were compared between patients and healthy controls and between genders of RRMS patients, and an attempt was made to determine the relationship between CD163 concentration and EDSS. Statistical significance was set at $P < 0,05$.

Results: Out of a total of 23 subjects, 14 were female (60,87%), and 9 were male (39,13%), so the female:male ratio was 1,56:1. 15 of them had a severe clinical form (65,22%), and 8 had a mild clinical form (34,78%). There were no statistically significant differences in serum CD163 protein concentration between participants with different severity of clinical forms of RRMS, nor differences between participants with RRMS and healthy controls ($P > 0,05$). The results of sCD163 in patients with a severe clinical picture were $834,57 \pm 335,29$ ng/ml, in patients with a mild clinical form $720,31 \pm 156,98$ ng/ml, and in healthy controls $591,75 \pm 225,10$ ng/ml. No statistically significant correlation was found between serum CD163 concentration and EDSS. The median EDSS of patients with a severe form was 3,50 (2-3,50), and for those with a milder form it was 1,00 (0,0-2,0). Men have a significantly higher concentration of CD163 compared to women ($P < 0,05$). The average concentration of CD163 for men was 947 ± 227 ng/ml, and for women 697 ± 285 ng/ml.

Conclusion: The concentration of CD163 protein in the serum between patients with different severity of clinical forms of RRMS does not differ significantly from each other, but also in relation to the healthy population. There is no association between CD163 levels and clinical

assessment of disability status in patients with RRMS. Men have a higher concentration of CD163 than women.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Mario Jerčić

Datum rođenja: x

Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: x

E-mail: x

Obrazovanje:

2005.–2013. Osnovna škola „Mejaši“ Split

2013.–2017. Prirodoslovno-matematička gimnazija Split

2017.–2023. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program medicina

Strani jezici:

-engleski jezik