

Eksperimentalni modeli multiple skleroze

Perhat, Adrian

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:854758>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-23**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Adrian Perhat

Eksperimentalni modeli multiple skleroze

Završni rad

Rijeka, 2022. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Adrian Perhat

Eksperimentalni modeli multiple skleroze

Završni rad

Rijeka, 2022. godina

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Ivana Munitić

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate university study
„Biotechnology and drug research“

Adrian Perhat
Experimental models for multiple sclerosis
Final work

Rijeka, 2022

Završni rad je obranjen dana _____

Pred povjerenstvom:

1. izv.prof.dr.sc. Igor Jurak, predsjednik povjerenstva
2. prof.dr.sc. Hrvoje Jakovac
3. izv.prof.dr.sc Ivana Munić

Rad ima 39 stranica, 7 slika, 2 tablice i 50 literaturnih navoda

Sažetak

Multipla skleroza (MS) je autoimuna bolest koja uzrokuje demijelinizaciju aksona središnjeg živčanog sustava (SŽS). Na razvoj bolesti utječu različiti genetički i okolišni čimbenici, stoga MS spada u multifaktorijalne složene bolesti. Autoreaktivne stanice imunosnog sustava uzrokuju autoimuni odgovor u SŽS-u koji rezultira razaranjem mijelinske ovojnice te je prijenos akcijskog potencijala niz neuron usporen. Uz demijelinizaciju, glavne značajke bolesti su i neurodegeneracija aksona koja nastupa u kasnijim fazama bolesti, gliozna te upala u SŽS-u. Simptomi bolesti uključuju gubitak motoričkih, senzoričkih i autonomnih funkcija. Bolest se po intenzitetu simptoma i njihovom razvoju u vremenu dijeli na: klinički izolirani sindrom (CIS), relapsno-remitirajuću multiplu sklerozu (RRMS), primarno-progresivnu multiplu sklerozu (PPMS) i sekundarno-progresivnu multiplu sklerozu (SPMS). RRMS je najčešći oblik MS-a.

Za istraživanje složene bolesti poput MS-a potrebni su odgovarajući *in vivo* animalni modeli. Glavni animalni model istraživanja MS-a je eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE). Kao i MS, karakterizira ga autoimuni odgovor te demijelinizacija i oštećenja aksona u SŽS-u. Najčešće životinje u kojima je induciran EAE jesu miševi i štakori. Postoji nekoliko različitih metoda indukcije EAE-a, no najčešće su aktivna i pasivna imunizacija životinja. Za razliku od CD8⁺ citotoksičnih T limfocita u MS-u, glavni nositelji patogeneze EAE-a su CD4⁺ pomagački T limfociti. To čini EAE model vrlo korisnim u istraživanju njihovih efektorskih funkcija te regulacijskih T limfocita. Nadalje, EAE modeli važni su u detekciji potencijalnih antigena koji sudjeluju u autoimunome odgovoru te mehanizmima kojima dolazi do upale i demijelinizacije. Najveći nedostaci EAE-a u istraživanju MS-a su lokalizacija lezija u kralježničnoj moždini, za razliku od dominantnih moždanih lezija u pacijentima koji boluju od MS-a. te nedostatak progresivnosti simptoma. EAE je glavni animalni model MS-a koji je zaslužan za dobivanje velike većina saznanja o patofiziologiji bolesti te razvoju terapije za pacijente koji boluju od MS-a.

Ključne riječi: Multipla skleroza, Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis, upala, demijelinizacija, neurodegeneracija

Summary

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease, which causes demyelination of axons in central nervous system (CNS). Many different genetic and environmental factors affect disease development, hence MS belongs to multifactorial, complex diseases. Autoreactive immune cells cause autoimmune response in CNS which results in myelin sheath destruction and this slows down action potential conduction along neurons. Beside demyelination, another elements of MS are neuroaxonal degeneration which occurs in later stages of the disease, gliosis and CNS inflammation. Disease symptoms include loss of motor, sensory and autonomic functions. Disease is divided, by its symptoms intensity and development through the time, to: clinically isolated syndrome (CIS), relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), primary progressive multiple sclerosis (PPMS) and secondary progressive multiple sclerosis (SPMS). RRMS is most common type of MS.

For the research of complex diseases, like MS, animal *in vivo* models are required. The main animal model for MS research is experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Just like MS, it is characterised by autoimmune response, demyelination and axonal damage in CNS. Most used animals in EAE research are mice and rats. There are several different methods of EAE induction, but the most common are active and passive immunisation of animals. Unlike CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in MS, main carriers of the EAE pathogenesis are CD4⁺ T helper lymphocytes. That makes EAE very useful in their effector functions and regulatory T cells research. Furthermore, EAE models are important in detection of potential antigens, which participate in autoimmune response and mechanisms which induce inflammation, and demyelination. Main disadvantages of EAE as a

model of MS research are localization of lesions in spinal cord, unlike dominant brain lesions in MS patients, and lack of symptoms progression. EAE is the main animal model of MS which is responsible for the vast majority of pathophysiologic knowledge about the disease and for development of MS therapy.

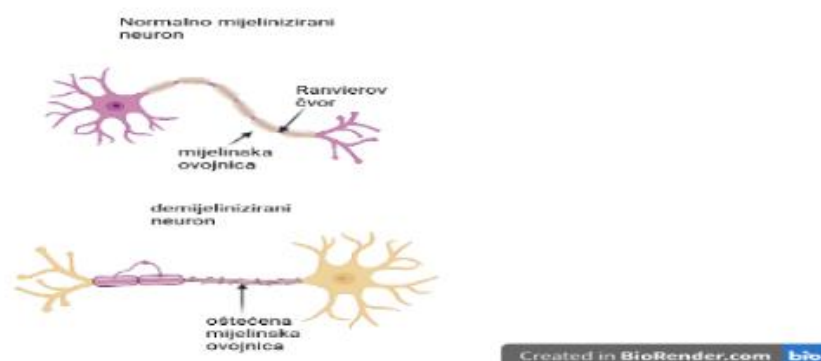
Key words: Multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, inflammation, demyelination, neurodegeneration

Sadržaj

1. Uvod.....	1.
2. Svrha rada.....	7.
3. Patogeneza i pregled općih saznanja MS-a.....	8.
3.1. Genetski i okolišni čimbenici patogeneze bolesti.....	10.
3.2. Imunosni sustav i autoimuno djelovanje.....	13.
3.3. Immunopatogeneza MS-a.....	16.
4. Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE).....	19.
4.1. Modeli EAE-a.....	19.
4.1.1. Model aktivne imunizacije.....	20.
4.1.2. Model pasivne imunizacije.....	21.
4.1.3. Humanizirani i spontani modeli EAE-a.....	23.
4.2. Relevantnost EAE-a kao modela MS-a.....	24.
5. Patološke karakteristike EAE-a.....	27.
5.1. Uloga T limfocita u patogenezi EAE-a.....	27.
5.2. Uloga B limfocita u patogenezi EAE-a.....	31.
6. EAE u istraživanjima terapija za MS.....	33.
7. Zaključak.....	35.
8. Literatura.....	36.

1.Uvod

MS je bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS), koja zahvaća mozak te kralježničnu moždinu. Neuroni su glavne stanice živčanog sustava, čije je normalno funkcioniranje narušeno u MS-u. Neuroni se sastoje od staničnog tijela, dendrita te aksona, a međusobno su povezani sinapsama. Sinapsa je funkcijska veza između neurona (presinaptičkog) koji prenosi informaciju na naredni neuron u nizu (postsinaptički). Aksoni prenose akcijski potencijal presinaptičkog neurona do mjesta sinapse, dok dendriti primaju informaciju te provode potencijal do staničnog tijela postsinaptičkog neurona. Takav sklop je nužan za provođenje senzoričkih i motoričkih informacija u živčanome sustavu. Kako bi aksoni bili očuvani te električni impuls putovao brže, nužno je da su isti mijelinizirani (1). Mijelinizacija je proces proizvodnje mijelinske ovojnice oko aksona. Mijelin se sastoji od lipida i proteina membrane tijela oligodendrocita koji u debelim slojevima okružuju akson te čine mijelinsku ovojnicu. Za mijelinizaciju aksona zaduženi su oligodendrociti. Uz astrocite i mikroglijalne stanice, oni spadaju u glijalne, odnosno potporne stanice u živčanom sustavu (2). Između mijelinskih snopova na aksonu nalaze se praznine-Ranvierovi čvorovi. Oni su zaslužni za brže provođenje električnog impulsa niz neuron (3). Primarna karakteristika bolesti je demijelinizacija aksona SŽS-a, uslijed oštećenja mijelinske ovojnice, zbog autoimune reakcije potaknute mijelinskim antigenima(slika 1.).



slika 1.- prikaz normalno mijeliniziranog neurona (gore) nasuprot neurona s demijeliniziranim aksonom (dolje)

Demijelinizacija može biti primarnog i sekundarnog tipa. Primarnoj demijelinizaciji glavni je uzrok djelovanje imunskih stanica na mijelinsku ovojnicu, dok je sekundarna demijelinizacija posljedica nekog drugog patološkog stanja, koje je najčešće povezano s oštećenjem samog aksona. Snopovi aksona čine bijelu tvar mozga i kralježnične moždine. Bijela tvar je dobila taj naziv upravo zbog mijelinskog sloja koji tom dijelu mozga i kralježničke moždine daje naočigled vidljivu bijelu boju. Demijelinizacija u MS-u se očituje lezijama u bijeloj tvari SŽS (slika 2.). One nastaju zbog imunskih, upalnih procesa koji dovode do procesa uništenja mijelinske ovojnice.



slika 2.- prikaz MRI (engl. "Magnetic Resonance Imaging") fotografije mozga, lezije na bijeloj tvari označene su strelicom

Preuzeto i modificirano iz: Filippi M. i sur. Multiple sclerosis. Nat Rev Dis Primer. 2018 Aug 11;43:41–4.

Simptomi MS-a mogu se očitovati zbog oštećenja na senzoričkim, motoričkim i autonomnim neuronima. Mogu se zamijetiti različiti problemi povezani sa zahvaćenim dijelovima SŽS. Najčešće se bolest, u ranijim fazama, manifestira kroz probleme s vidom, obamrlošću udova, općom slabošću, poremećajima govora i sl. Ti su simptomi heterogeni te se u nekih pacijenata pojavljuju samo neki od njih, dok se u ostalima ne mora pojaviti niti jedan od navedenih najčešćih simptoma. U kliničkom smislu je najvažnija heterogenost bolesti po njezinom intenzitetu te trajanju. S obzirom na to se MS dijeli na nekoliko podtipova: klinički izolirani sindrom (engl. „clinically isolated syndrome“, CIS), relapsno-remisijski MS (RRMS), primarno progresivni MS (PPMS) te sekundarno progresivni MS (SPMS).

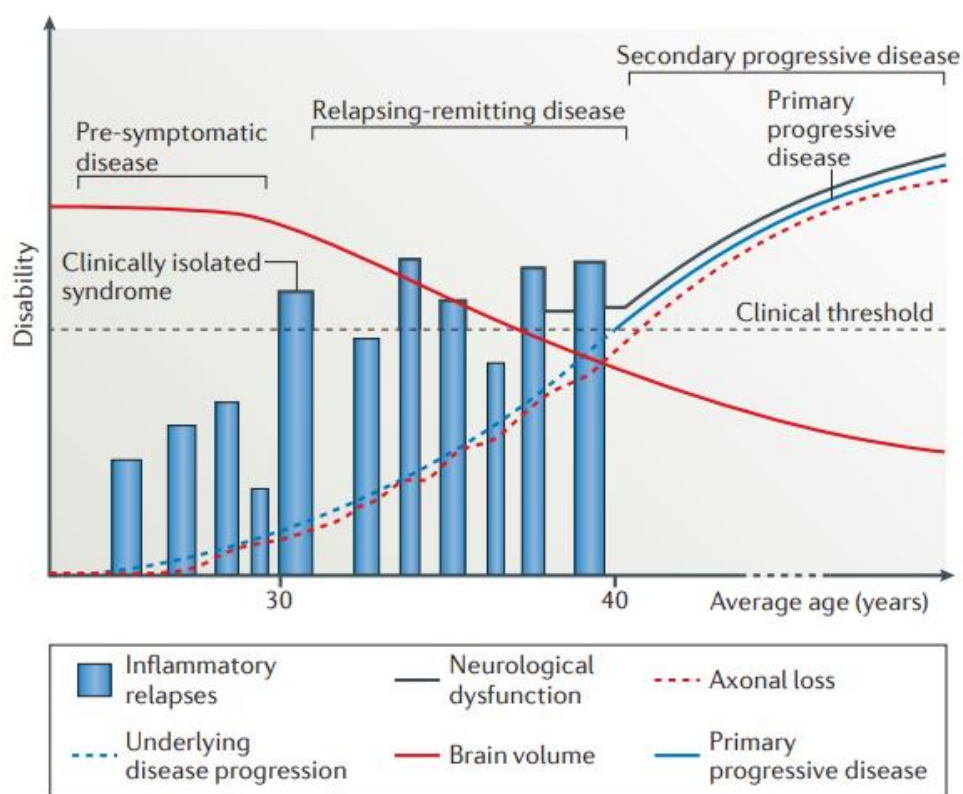
Jednokratni simptomi MS-a, odnosno epizoda neuronalne disfunkcije koja karakterizira MS, nazivaju se klinički izoliranim sindromom (engl. „clinically isolated syndrome“, CIS). Takve epizode moraju trajati minimalno 24 sata (4). CIS može biti monofokalni i multifokalni. Monofokalni tip karakterizira jedan simptom koji se najčešće očituje jednom lezijom unutar SŽS-a. Multifokalni tip karakterizira veći broj različitih simptoma, koji su uzrokovani većim brojem različitih lezija u SŽS-u.

RRMS je najčešći tip MS-a. Čak 85% pacijenata pripada tom tipu bolesti. Karakteriziraju ga početne epizode neuronalne disfunkcije, nakon koje slijedi faza remisije te izostanka simptoma ili njihovog ublažavanja. Nakon faze remisije (izostanka kliničke manifestacije bolesti) dolazi do relapsa te ponovnog pogoršanja kliničke slike oboljele osobe. MRI snimke tada pokazuju lezije u području bijele tvari SŽS-a, koje su nastale zbog upalnog procesa i demijelinizacije aksona tog područja. U velikom broju slučajeva neće doći do potpunog nestanka kliničkih simptoma te će bolest postati progresivnog tipa.

SPMS nastaje uslijed akumulacije oštećenja i progresivnih lezija u SŽS. Taj oblik nastaje u 80% pacijenata s RRMS, nakon opetovanih relapsa (5). Tada

se događa atrofija SŽS-a te dolazi do stalne progresije bolesti, obično između 10 i 20 godina nakon postavljanja dijagnoze.

U 10% slučajeva javlja se PPMS, koja dovodi do stalne progresije bolesti, od pojave prvih simptoma u pacijenta. Simptomi su vrlo prepoznatljivi i karakteristični (poput poteškoća pri hodanju) te se s vremenom pogoršavaju (5,6). Najčešće se dijagnosticiraju u pacijenata koji su navršili 40 ili više godina.



Slika 3.- prikaz različitih tipova MS-a po jačini njihovih simptoma te njihovom razdoblju trajanja

Preuzeto i modificirano iz: Dendrou C.A., Fugger L., Friese M.A., Immunopathology of Multiple Sclerosis, Nature Reviews Immunology, 2015.;15:545-558

Zbog raznovrsnosti simptoma dijagnostika MS-a nije jednostavna. Nužne su brojne pretrage koje zajedno daju sveobuhvatnu sliku o oštećenju SŽS-a te tipu bolesti. Najčešća pretraga na koju se pacijent upućuje je magnetska rezonanca (MR). Preko te pretrage dobiva se kompletna slika mozga te kralježnične moždine. Na njoj se može utvrditi postoje li lezije na bijeloj tvari, karakteristične za MS (7). Potreban je oprez pri određivanju lezija, posebno kod osoba koje imaju atipične simptome MS-a, starije su od 40 godina i imaju određene komorbiditete (hipertenzija, migrene i sl.) (7). Ostale metode koje se koriste u dijagnozi MS-a su mjerenje električnog impulsa te analiza likvora. Najčešće se u likvoru određuje prisutnost antitijela, posebno imunoglobulina G (IgG). Na taj se način indirektno ukazuje na prisutnost upalnog procesa u SŽS-u, što može biti znak demijelinizacije i neurodegeneracije. Također u likvoru se može odrediti i prisustvo proupalnih citokina i imunosnih stanica. Usprkos tome, analiza likvora ne može biti jedina metoda dijagnostike MS-a, jer pozitivni rezultati mogu biti uzrokovani i nekim drugim upalnim stanjima SŽS-a, poput sifilisa, lajmske bolesti i sl.

MS je bolest koja ima snažan utjecaj na suvremeni svijet, zbog sve veće prevalencije. Sve je više zastupljena u gotovo svim regijama svijeta, uz globalnu prevalenciju od 36 na 100000 osoba (8). Prevalencija je različita u prostoru te postoje žarišta s povećanom prevalencijom MS-a. Općenito, bolest je rasprostranjenija u stanovništvu Sjeverne Amerike, sjeverne i zapadne Europe te Australije (9). Razlog tome je nepoznat, no pretpostavlja se da je razlog tome utjecaj raznih genetskih i okolišnih faktora. MS se češće javlja u žena te je najčešća dob otkrivanja bolesti između 20. i 40. godine života (iako se bolest može pojaviti i u ranijoj i kasnijoj dobi), s prosječnom pojavnosti u dobi od 30 godina. Naposljetku, MS se smatra najčešćim uzrokom invalidnosti u mlađoj odrasloj dobi. Kako suvremeno doba donosi porast prevalencije mnogih MS-a, nužno je što bolje razumijevanje patogeneze te mehanizma nastanka bolesti u cilju pronalaska najuspješnijih metoda prevencije i/ili liječenja (10).

Jedan od glavnih ciljeva ovog rada je pokazati ulogu animalnih modela u istraživanjima MS-a. Za istraživanje fizioloških i patofizioloških procesa ljudskoga organizma, najpogodniji su sisavci kao animalni modeli. Zbog praktičnosti i lakšeg rukovanja u istraživanjima, ali i dovoljne sličnosti između vrsta, najčešće se koriste mišiji modeli. Struktura i funkcija neurona te povezanost s glijalnim stanicama vrlo je slična u miša i čovjeka, usprkos tome što su očite razlike u razvijenosti i manjka genetske podudarnosti između vrsta (8). Struktura mozga slična je u miša i čovjeka (11). Glavna metoda istraživanja MS-a na animalnim modelima je indukcija eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE). U primjeni su različiti modeli EAE-a, koji pokušavaju predložiti imunosnu patogenezu MS-a u čovjeka. To se postiže na razini različitih stanica urođene i stečene imunosti. Uz to, postoje modeli u kojima je demijelinizacija potaknuta virusnom infekcijom ili određenim toksinima (12).

MS, usprkos nekoliko linija dostupnih terapija, još uvijek predstavlja izazov u razvoju novih lijekova koji bi u značajnijoj mjeri smanjili njene simptome, oštećenja SŽS te olakšali život pacijentima. Istraživanje na animalnim modelima već je dovelo do rasta broja imunomodulatornih i imunosupresivnih lijekova na tržištu te taj broj i dalje raste. Njihova se djelovanja oslanjaju na ublažavanje autoimunog odgovora. Uz daljnji razvoj metoda istraživanja, očekuje se veći broj lijekova koji će se koristiti u terapiji bolesti. Stoga se patogenza MS-a nastoji što bolje razumijeti, posebno njen imunosni aspekt te su za to najvažniji animalni modeli kao glavna metoda njezinog istraživanja. Cilj ovoga rada je objasniti ulogu animalnih modela u razumijevanju patogeneze bolesti te primjene tog znanja u razvoju novih terapija ili dijagnostike. Posebno će biti istaknuta važnost i nezamjenjivost animalnih modela u pristupu imunosnoj patogenezi MS-a.

2.Svrha rada

Usprkos nastojanjima da se dio istraživanja patogeneze bolesti obavi na *in vitro* te računalnim modelima, animalni modeli ostaju glavni alat za istraživanje MS-a (13). Istraživanja je potrebno odraditi *in vivo* zbog uključenosti više organskih sustava te kompleksnosti svih mehanizama koji se događaju u organizmu pri razvoju MS-a. Zbog ograničenosti istraživanja u (stanicama i/ili tkivima) čovjeka, animalni modeli su najpogodniji za *in vivo* istraživanja MS-a. Koristi animalnih modela posebno su izražene u praćenju specifičnih staničnih tipova te njihovog međudjelovanja u organizmu (13,15). U radu će se prikazati sveobuhvatnost bolesti te utjecaj različitih čimbenika na njen razvoj, preko usporedbe različitih modela s bolesti u čovjeka. Vrlo je važno prikazati sve prednosti i mane animalnih modela koje se moraju uzeti u obzir pri istraživanju. Bolje razumijevanje animalnih modela može poboljšati točnost u interpretaciji rezultata istraživanja. To može značiti i veću razinu točnosti u određivanju mehanizma bolesti te kasnije povezanosti s primjenom u terapiji. Istraživanja se usredotočuju na razvoj lijekova koji mogu prevenirati i izliječiti bolest ili barem smanjiti njene simptome u većoj mjeri, te će se u radu biti spomenuti neki od njih (14,15).

Uzevši sve u obzir, u radu će biti obrađen cjelokupni utjecaj animalnih modela na dobivanje saznanja o MS-u, s istaknutim prednostima i manama svih čestih modela koji se koriste u istraživanjima, uz isticanje njihove važnosti.

3. Patogeneza i pregled općih saznanja MS-a

MS ubrajamo u multifaktorske, složene bolesti (16). To znači da mnogo različitih čimbenika utječe na nastajanje bolesti te njen karakter i penetrabilnost. Razni genetički čimbenici (*HLA DRB15:01*, *HLA -A*02-01...*) i okolišni čimbenici (nedostatak vitamina D, Epstein-Barr virus...) doprinose nastanku bolesti ili njenom pogoršanju. MS je autoimuna bolest, što ukazuje na ključnu ulogu imunskog sustava u patogenezi bolesti. MS je prvi put opisana kao bolest u drugoj polovici 19. stoljeća, kada se desio strelovit razvoj u razumijevanju anatomije i fiziologije živčanog sustava, dok su se mnogobrojna nova saznanja o bolesti dobila u 20. stoljeću (Tablica 1.).

Povijesni događaji važni za opća saznanja o MS-u	
19. stoljeće	20. stoljeće
1822.-1848. godine- prvi jasno zabilježeni simptomi MS-a, u člana britanske kraljevske obitelji (zamućenje vida u relapsu i remisiji, dvoslike itd.)(17)	1916. godine-Dr James Dawson opisuje ulogu upale u oštećenju mijelinske ovojnice (17)
1841. godine- Jean Cruveilhier povezuje vidljive lezije na mozgu i kralježničnoj moždini sa simptomima poput tremora i poteškoća u hodu (17)	1930-1966. godine- Russell Brain opširno opisuje MS kao bolest te njene simptome i prve znakove u više izdanja knjige „ <i>Diseases of the Nervous System</i> “ (17)
1868. godine- Jean Martin Charcot daje prvu dijagnozu bolesti te ju naziva „multipla skleroza“	1930.-ih godina- povezanost imunskog sustava s MS-om, 1960.-ih godina- MS okarakteriziran kao autoimuna bolest(17)

Tablica 1.- prikaz bitnih događaja u povijesti istraživanja MS-a

Upala koja se dešava u SŽS-u, početni je događaj u nastajanju bolesti. U induciranju upalnoga procesa sudjeluju stanice koje infiltriraju u SŽS prelazeći krvno-moždanu barijeru (engl.- „blood brain barrier“, BBB), poput makrofaga diferenciranih iz monocita ili stanica koje su stacionirane u SŽS-u, poput mikroglija stanica (5). Nakon njihove aktivacije, dolazi i do aktivacije stanica stečene imunosti. Važnu ulogu upale u patogenezi bolesti pokazuje učinkovitost imunomodulatornih terapija koje snižavaju intenzitet i frekvenciju relapsa tako da smanjuju aktivnost imunskih stanica i njihovu infiltraciju u SŽS. Glavna je značajka MS-a demijelinizacija koja rezultira vidljivim lezijama na bijeloj tvari u SŽS. Razna istraživanja su pokazala i lezije koje se nalaze na sivoj tvari moždane kore (18,19). Preko njih je moguće utvrditi i razinu progresije bolesti. Oštećenjem mijelina slabi se prijenos akcijskog potencijala niz neuron te posljedično slabi i veza između neurona te međusobni prijenos informacija. Daljnjom demijelinizacijom dolazi do otkrivanja novih epitopa te do pojave širenja epitopa, što dovodi do pogoršanja autoimunog odgovora. Širenje epitopa označava imunsku reakciju usmjerenu na epitope različite od onih koji su inducirali autoimunu bolest (20). Akson nakon uništenja mijelinske ovojnice postaje izloženiji napadima imunskih stanica te može doći do neurodegeneracije, zbog njihovog oštećenja. To se događa posebno u kasnijim fazama bolesti. Jedna od mogućnosti uzroka odumiranja aksona je niska razina adenozin trifosfata (ATP) zbog veće potrošnje energije kako bi se prenijeo akcijski potencijal niz demijelinizirani neuron (47). Također, mogući su uzroci i mitohondrijska disfunkcija te proizvodnja reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala (47). Promjene se tijekom bolesti događaju i na glijalnim stanicama, zbog nastalih oštećenja u SŽS. Tada dolazi do aktivacije i proliferacije glijalnih stanica. Taj se histološki proces naziva glijoza (7). Uslijed oštećenja mijelina i aksona dolazi do glijoze u MS-u, koja se očituje u aktivnim lezijama (21). Svi spomenuti elementi određuju patogenezu bolesti. O čimbenicima koji dovode do pojave i progresije bolesti biti će govora u daljnjem tekstu.

3.1. Genetski i okolišni čimbenici patogeneze bolesti

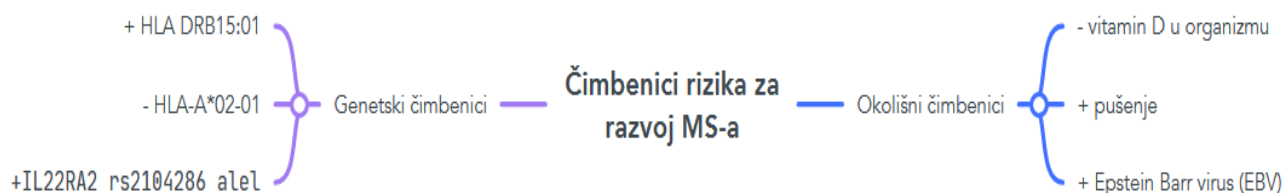
MS ovisi o velikom broju različitih faktora, koji mogu biti genetski ili okolišni. Važno je napomenuti da niti jedna od tih skupina faktora nema presudan utjecaj na nastanak bolesti te da svi u manjoj mjeri doprinose riziku nastanka bolesti. Izračunato je da nešto veći dio čimbenika koji doprinose razvoju bolesti spada na genetske faktore (22). Epidemiološke studije pokazale su najveći rizik razvijanja MS-a u jednojajčanih blizanaca koja iznosi 20% (16). U ostalih srodnika taj se rizik smanjivao, no i dalje je postojao (oko 2% za dijete ukoliko jedan roditelj ima razvijen MS).

Istraživanjem je pokazano da nešto više od 200 gena kandidata manjim dijelom doprinosi nastanku MS-a (9). Najveći broj gena koji su se pokazali genima kandidatima u istraživanjima bili su oni koji su kodirali za proteine važne za imunosti sustav. To čvrsto podupire tvrdnju da je MS bolest autoimunog karaktera, posebno jer je određeni broj istih gena kandidata pronađen i u drugim autoimunim bolestima. Glavna skupina gena koji pridonose razvoju bolesti je haplotip HLA gena *HLA DRB15:01*. Ova je varijanta zastupljena u približno 1/4 populacije sjeverne Europe te SAD-a. Upravo je ta populacija najpodložnija razvoju MS-a po epidemiološkim podacima (7). Na molekularnoj razini smatra se da prisutnost ove varijante pruža optimalnu prezentaciju autoantigena SŽS CD4+ pomagačkim T limfocitima. Također, T limfociti osoba koje sadrže spomenuti haplotip podložni su *in vitro* autoproliferaciji (23). Autoproliferacija označava spontanu *in vitro* proliferaciju određene stanične populacije. Jedan članak je pokazao da su T limfociti koji autoproliferiraju specifični za *RASGRP* (engl.- „RAS guanyl-releasing protein“) antigen, koji prezentiraju memorijski B limfociti, a izražen je i u neuronima (23). U CD4+ pomagačkim T stanicama primijećena je metilacija *HLA DRB15:01* haplotipa, posebno u RRMS, što pokazuje i možebitnu ulogu epigenetičkih procesa u nastanku MS-a. Nedostatak *HLA-A*02-01* haplotipa također pokazuje određen stupanj doprinosa nastanku MS-a. Mehanizam utjecaja na bolest također je nepoznat, no smatra se da taj gen ima protektivnu ulogu u nastanku bolesti

(24). Od ostalih genskih varijanti koji utječu na nastanak bolesti ističu se geni koji kodiraju za α -lanac receptora za interleukin 2 (IL-2) i interleukin 7 (IL-7).

Okolišni faktori, za koje se smatra da potiču nastanak MS-a te pogoršanje bolesti, vrlo su raznoliki. Smatra se kako određeni okolišni faktori mijenjaju prag aktivnosti imunskih stanica, posebno nastanak autoreaktivnih T stanica. Pokazano je kako osobe rođene u proljeće imaju veću šansu oboljenja od osoba rođenih u jesen (25). Također, spoznate su poveznice između određenih bolesti u majke ili oca koje nose veći rizik za oboljenje potomka od MS-a. Uočena je i povezanost u nastanku MS-a u osoba s niskom razinom vitamina D u organizmu (26). Niska razina vitamina D u organizmu najčešće je posljedica nedovoljnog unosa hranom. Na razini imunskih stanica, metabolit vitamina D smanjuje T- staničnu produkciju proinflammatornih citokina (IL-2, IL-17, IFN- γ) i njihovu proliferaciju (26). Isti metabolit reducira i proliferaciju te diferencijaciju B stanica i plazma stanica, uz smanjenje proizvodnje protutijela (26). Također, vitamin D preko aktivnog metabolita dovodi do snižavanja razine imunskog odgovora induciranjem regulacijskih T stanica te proizvodnje IL-10 (26). Razrađen je i štetan učinak pušenja na razvoj MS-a. Pušenje može dovesti do indukcije bolesti te pogoršati njen tijek, ukoliko je ona već nastala. Vjeruje se kako okolišni faktori imaju najveći utjecaj na pojedinca prije 15. godine života, što pokazuje važnost čimbenika u razdoblju djetinjstva. Zadnjih se godina sve više spominje virusna infekcija kao indirektni pokretač MS-a, posebice infekcija Epstein-Barrovim virusom (EBV). Postoji više teorija o tome kako EBV potiče razvoj bolesti, no najpoznatija je teorija molekularne mimikrije. Ona sugerira da određeni protein virusa sadrži sekvencu epitopa sličnu sekvenci jednog od proteina koji grade mijelinsku ovojnicu(27). Glavni antigen EBV-a, za koji se smatra da inducira molekularnu mimikriju, je *EBNA1* („Epstein-Barr nuclear antigen 1“). Naime, pokazano je kako protutijela usmjerena na epitope tog antigena mogu biti usmjerena i na mijelin bazični protein (MBP), prisutan na mijelinskoj ovojnici. Istraživanja

ukazuju i na generalnu ulogu EBV u poticanju i drugih autoimunih bolesti, poput sistemskog eritemskog lupusa (7). Usprkos nastojanjima da se odredi točan okolišni faktor koji ima utjecaj na nastajanje bolesti, i dalje nema preciznih rezultata koji bi to faktori bili. Postoje mnoge korelacije, no potrebno ih je u budućnosti bolje razraditi i odrediti njihovu točnu ulogu u patogenezi bolesti.



Slika 4.- prikaz genetičkih i okolišnih čimbenika za koje se smatra da imaju učinak na razvoj MS-a;

+ : prisutnost čimbenika potiče nastanak bolesti

- : nedostatak čimbenika potiče nastanak bolesti

3.2. Imunosni sustav i autoimuno djelovanje

Imunosni sustav temeljni je obrambeni sustav organizma od patogena. Omogućuje zaštitu od patogena i njihovu eliminaciju iz inficiranog organizma. Urođena je imunost prva linija obrane protiv patogena. Glavne sastavnice urođene imunosti su komplement te imunosne stanice: granulociti (neutrofili, eozinofili i bazofili), monociti (koji se u tkivima diferenciraju u makrofage), mastociti, NK stanice i $\gamma\delta$ T stanice. Također, u samom SŽS-u nalaze se mikroglijalne stanice, koje održavaju homeostazu mozga i kralježnične moždine, čišćenjem odumrlih stanica te odgovorom na lokalne ozljede i infekcije (28). One se naseljavaju u SŽS još u ranom embrionalnom razvoju te pripadaju skupini tkivnih makrofaga. Stoga različite stanice urođene imunosti, uključujući stanice iz periferije i mikrogliju, sudjeluju u patogenezi bolesti. Njihova fenotipska obilježja i lučenje proupalnih citokina često su izmijenjeni, što može dovesti do pojačane aktivacije stečene imunosti (29). Stečena imunost posredovana je T i B limfocitima. T limfociti dijele se na pomagačke (CD4+), citotoksične (CD8+) te regulacijske (CD4+, Treg). S obzirom na efektorske funkcije, pomagački CD4+ T limfociti dijele se na: Th1, Th2 i Th17 stanice. Oni se razlikuju po citokinima koje luče te posljedično njihovog djelovanja na različite aspekte imunosnog sustava. Th1 limfociti nastaju pod utjecajem interleukina 12 (IL-12), dok je za izvršavanje njihove efektorske funkcije nužno lučenje interferona gama (IFN- γ). Oni su važni za eliminaciju unutarstaničnih patogena. Th2 limfociti T nastaju pod utjecajem citokina interleukina 4 (IL-4). Njihova je efektorska funkcija posredovana IL-4 te IL-5 i IL-13. Imaju važnu ulogu u obrani od parazita te zacjeljivanju tkiva nakon upale. Th17 stanice nastaju pod utjecajem interleukina 23 (IL-23). Glavni citokini koje luče su IL-17 te IL-22. Svaka od navedenih efektorskih skupina pomagačkih CD4+ T limfocita ima ulogu u patogenezi MS-a. Regulacijski T limfociti sudjeluju u suprimiranju imunosnog odgovora te smanjenju upale. Njihov glavni markeri su CD25 receptor te FOXP3 transkripcijski faktor. B limfociti vrlo su važni u humoralnoj imunosti, zbog

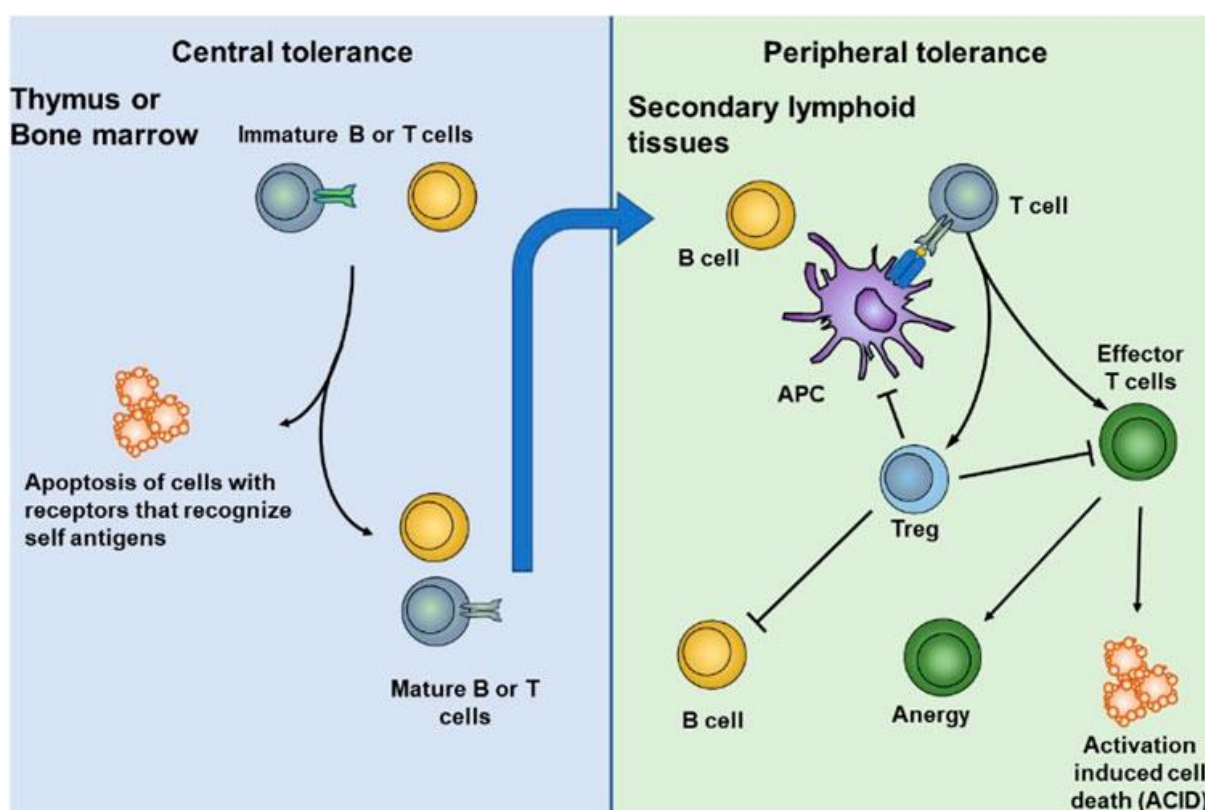
diferencijacije u plazma-stanice koje proizvode antitijela, specifična za pojedini antigen. Također, B limfociti imaju ulogu antigen-prezentirajućih stanica pomagačkim CD4+ limfocitima T.

Usprkos izuzetnome značaju imunosnog sustava u obrani od patogena, može doći i do nepravilnosti u njegovom funkcioniranju. Jedno od njih je nastanak autoimunih bolesti. Autoimuna reakcija je imunosna reakcija na vlastite antigene, što rezultira razaranjem vlastitoga tkiva (30). Ona nastaje zbog sloma centralne i periferne imunosne tolerancije. Centralna tolerancija zbiva se u primarnim limfnim organima (koštana srž i timus), na antigene prisutne u njima. Periferna tolerancija zbiva se u sekundarnim limfnim organima (limfni čvorovi i slezena), na antigene koji nisu bili prisutni u primarnim limfnim tkivima, no prisutni su u perifernom tkivu. Centralna tolerancija T limfocita odvija se u timusu i uključuje apoptozu nezrelih autoreaktivnih T stanica te stvaranje CD4+ Treg stanica (31). Centralna tolerancija B stanica zbiva se u koštanoj srži apoptozom nezrelih stanica koje nisu uspješno izmijenile autoreaktivni receptor ili njihovim zadržavanjem ukoliko je proces promjene receptora bio uspješan (32). Periferna tolerancija T stanica uključuje stvaranje anergičnih T stanica (stanice prepoznaju vlastite antigene na periferiji, ali ne reagiraju na njih), supresiju Treg stanicama te smrt stanice (31). B stanice također mogu biti suprimirane anergijom, apoptozom ili inhibicijskim receptorima (FcγRII, CD22, PD-1...) (32). Ukoliko je jedan od navedenih mehanizama narušen, može doći do pojave autoimunosti te posljedičnog uništenja vlastitog tkiva.

Jedna od glavnih značajki MS-a je sudjelovanje više komponenti imunosnog sustava u patogenezi bolesti. Njihovu povezanost indirektno pokazuje i veća učinkovitost lijekova koji suprimiraju djelovanje više različitih imunosnih stanica, u odnosu na lijekove koji djeluju na samo jedan tip stanica. Primjer tome su imunosupresivni i imunomodulatorni lijekovi koji djeluju na T i B limfocite zajedno, u odnosu na one koji djeluju samo na određeni tip T limfocita (12). Također, imunosni se procesi mogu mijenjati tijekom trajanja bolesti pa su određeni tipovi stanica zastupljeniji u kasnijim fazama

patogeneze bolesti, u odnosu na početnu fazu. Stoga je izrazito važno utvrditi povezanost između različitih stanica i komponenti imunskog sustava, u pojedinim fazama bolesti.

Autoreaktivni limfociti T i B iz periferije cirkulacijom dolaze do SŽS-a te ondje prepoznaju prezentirane antigene. Uz njih, u SŽS ulaze i monociti te ostale stanice urođene imunosti. Do prelaska imunskih stanica u SŽS dolazi vezanjem $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) integrina na T limfocitima i monocitima za endotel krvne žile. Tada dolazi do dijapedeze (migracije stanica kroz endotel krvne žile) u SŽS (8). Prepoznavanjem vlastitog antigena u SŽS, limfociti T i B dovode do uništenja mijelinske ovojnice.



Slika 5.- prikaz mehanizma nastajanja centralne i periferne tolerancije T i B limfocita, važnih za sprječavanje autoimunosti

Preuzeto iz: Li H., Yang Y.G., Sun T. Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Induction of Tolerance and Treatment of Autoimmune diseases. Front Bioeng. Biotechnol. 2022; 889291 (49)

3.3. Imunopatogeneza MS-a

Autoimuni procesi unutar SŽS-a, nositelji su patogeneze MS-a. U MS-u su podjednako zahvaćeni motorički, senzorički i autonomni neuroni, što se odražava i u simptomima bolesti. Naime, dolazi do poremećaja senzoričkih funkcija (npr. poremećaja vida), motoričkih funkcija (npr. nemogućnosti kretanja) i autonomnih funkcija (npr. nemogućnost zadržavanja mokraće). Simptomi se očituju s obzirom na mjesto lezije u SŽS-u. Lezije odražavaju upalu, demijelinizaciju i neurodegeneraciju SŽS-a te su brojnije u mozgu u odnosu na kralježničnu moždinu pacijenta (5). U prvim fazama bolesti upalni proces dovodi do pojave primarne demijelinizacije, dok u kasnijim fazama dolazi do aksonalne neurodegeneracije te do pojave sekundarne demijelinizacije (12). To se posebno pokazuje u progresivnim tipovima bolesti. Općenito je upala prisutna tokom cijelog tijeka bolesti, no ipak je jača u njenim ranijim fazama, kada nastaju aktivne lezije. One se sastoje od limfocitnih infiltrata, marofaga i mikroglija stanica te uvećanih astrocita (16). Mehanizam nastajanja akutne i kronične upale SŽS-a u MS-u nije do kraja razjašnjen te je posebno važno odrediti antigene na koje su usmjereni autoreaktivni T i B limfociti. Mijelin bazični protein (engl. „myelin basic protein“, MBP), proteolipidni protein (engl. „proteolipid protein“, PLP) te mijelinski oligodendrocitni protein (engl. „myelin oligodendrocyte protein“, MOG) su antigeni mijelinske ovojnice koje prepoznaju cirkulirajući CD4+ pomagački T limfociti pacijenata oboljelih od MS-a (5). Ti su limfociti zastupljeniji u MS pacijenata u odnosu na zdrave pojedince, što pokazuje kako spomenuti antigeni imaju ulogu u imunopatogenezi bolesti. Ipak, niti za jedan od navedenih antigena ne može se reći da je glavni u induciranju MS-a. Važno je usporediti uloge različitih vrsta pomagačkih CD4+ T limfocita u patogenezi bolesti. Za Th1 i Th17 stanice smatra se da imaju važnu ulogu u upali te demijelinizaciji SŽS-a, no s dvosmislenim rezultatima koja je od njih najvažnija (5). Mnogi pomagački CD4+ T limfociti zastupljeni u lezijama istodobno izlučuju IFN- γ te IL-17, što daje nejasnu sliku koji od spomenuta dva tipa pomagačkih CD4+ T stanica ima veću ulogu u

patogenezi bolesti (33). Također, pokazana je i pozitivna uloga Th2 stanica u poticanju protuupalnog odgovora (5). Sve navedene uloge pomagačkih CD4+ T limfocita sugeriraju njegovu ključnu ulogu u patogenezi MS-a.

Usprkos tome, imunohistološka analiza mozga pacijenata koji su patili od MS-a, pokazale su najvišu razinu prisutnosti CD8+ citotoksičnih T limfocita od svih limfocita u lezijama, dok su limfociti B i CD4+ pomagački T limfociti prisutni u mnogo manjoj mjeri (34). Terapija koja suprimira samo djelovanje pomagačkih CD4+ T limfocita pokazuju vrlo mali efekt na smanjenje razine upale, što pokazuje njihovu sporednu ulogu u upalnome procesu SŽS-a, u odnosu na citotoksične CD8+ limfocite T (12). Citotoksični CD8+ T limfociti direktno uništavaju mijelinsku ovojnicu te oligodendrocite, što dovodi do nemogućnosti remijelinizacije aksona (16). Također luče određene proupalne citokine poput IL-17 te tada imaju funkciju sličnu pomagačkim CD4+ T limfocitima (5,16). Usprkos tome, uloga citotoksičnih CD8+ T limfocita u patogenezi MS-a još nije u potpunosti razjašnjena.

Regulacijski T limfociti (Treg) imaju ulogu u supresiji proupalnih T limfocita, što pokazuje njihovu važnu ulogu u sprječavanju autoimunosti. Treg stanice prisutne su u vrlo maloj mjeri u lezijama MS pacijenata, no njihova je funkcija izmijenjena te ne djeluju supresivno u dovoljnoj mjeri na autoreaktivne T limfocite. To pokazuje prisutnost autoreaktivnih T limfocita u SŽS-u zdravih pojedinaca, no koje su suprimirane od strane Treg stanica (40).

B limfociti imaju važnu ulogu u pojačavanju bolesti. Najčešće je to proizvodnjom antitijela te prezentacijom antigena CD4+ pomagačkim T limfocitima. Njihova razina varira tijekom progresije bolesti, stoga osobe s PPMS i SPMS imaju veću razinu B limfocita i plazma stanica u CSF-u te moždanim ovojnicama (5,44). B limfociti kao antigen prezentirajuće stanice mogu imati ulogu i u aktivaciji Th2 stanica te tako omogućiti zacjeljivanje oštećenog tkiva te protuupalni odgovor (39).

Najzastupljenije imunosne stanice aktivnih lezija SŽS-a su makrofagi koji su aktivni tijekom čitavog tijeka bolesti. Upalu potiču mikroglijalne stanice koje imaju funkcije makrofaga, isto kao i makrofagi diferencirani iz monocita. U aktivnim lezijama MS pacijenata pokazana je velika aktivnost makrofaga i mikroglija stanica (16). U inaktivnim lezijama u pacijenata s PPMS i SPMS veća je aktivnost mikroglije od makrofaga diferenciranih iz monocita. Pokazano je kako mikroglijalne stanice potiču astrocite na lučenje CC- kemokinskog liganda 2 (engl.- „CC chemokine ligand 2“) i granulocitno-makrofagni faktor stimulacije kolonije (engl.- „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), što dovodi do regrutacije makrofaga iz periferije te njihove aktivacije u SŽS-u (5). Astroцити također inhibiraju diferencijaciju oligodendrocitnih progenitorskih stanica u zrele stanice te se sprječava remijelinizacija oštećenih aksona.

4. Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE)

Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE) je autoimuna bolest SŽS, inducirana u eksperimentalnih životinja, najčešće miševa i štakora. Najčešći je model *in vivo* proučavanja patogeneze MS-a te je glavni izvor dobivenih informacija o bolesti, što je rezultiralo i razvojem lijekova danas dostupnih na tržištu (35). EAE se posebno često koristi u istraživanjima imunopatogeneze bolesti i upalnog procesa u SŽS-u (12). Postoji više različitih manifestacija bolesti, koje ovise o tipu induciranih stanica te lokaciji autoimune reakcije, koja je određena antigenom koji je administriran u životinju. Na temelju toga, određene su različite kliničke manifestacije u različitim modelima EAE-a. Varijabilnost bolesti te mogućnost indukcije različitih simptoma, vrlo su važni u istraživanju različitih stadija MS-a te njenih različitih patofizioloških obilježja (upala, infiltracija imunskih stanica, demijelinizacija i sl.). Usprkos varijabilnostima, svi EAE modeli sadrže osnovni obrazac patofizioloških obilježja, a to su: demijelinizacija aksona, poremećen prijenos akcijskog potencijala niz neuron i sinapse te paraliza stražnjih udova u životinja (36). Sve bitne prednosti i mane modela EAE-a biti će obrađene u idućim poglavljima.

4.1. Modeli EAE-a

Tijekom prošlosti, postojali su mnogi pokušaji induciranja simptoma MS-a u ljudi i životinja. Isprva se bolest inducirala homogenatima kralježnične moždine. Primijećeno je da cjepivo protiv bjesnoće, uzgojeno u zečjoj kralježničnoj moždini, uzrokuje simptome paralize kao nuspojavu (12). Razlog tome bila je poticanje autoimune reakcije na MBP antigen, zbog nedovoljne purifikacije cjepiva. Usprkos tome, u pokušajima indukcije MS-a, homogenatima SŽS-a, bilo je nemoguće inducirati točne simptome MS-a te su nastali simptomi imali drugačije patološke karakteristike u odnosu na

MS (48). U idućim će poglavljima biti obrađeni suvremeni pristupi istraživanja MS-a te indukcije bliskih simptoma

4.1.1. Model aktivne imunizacije

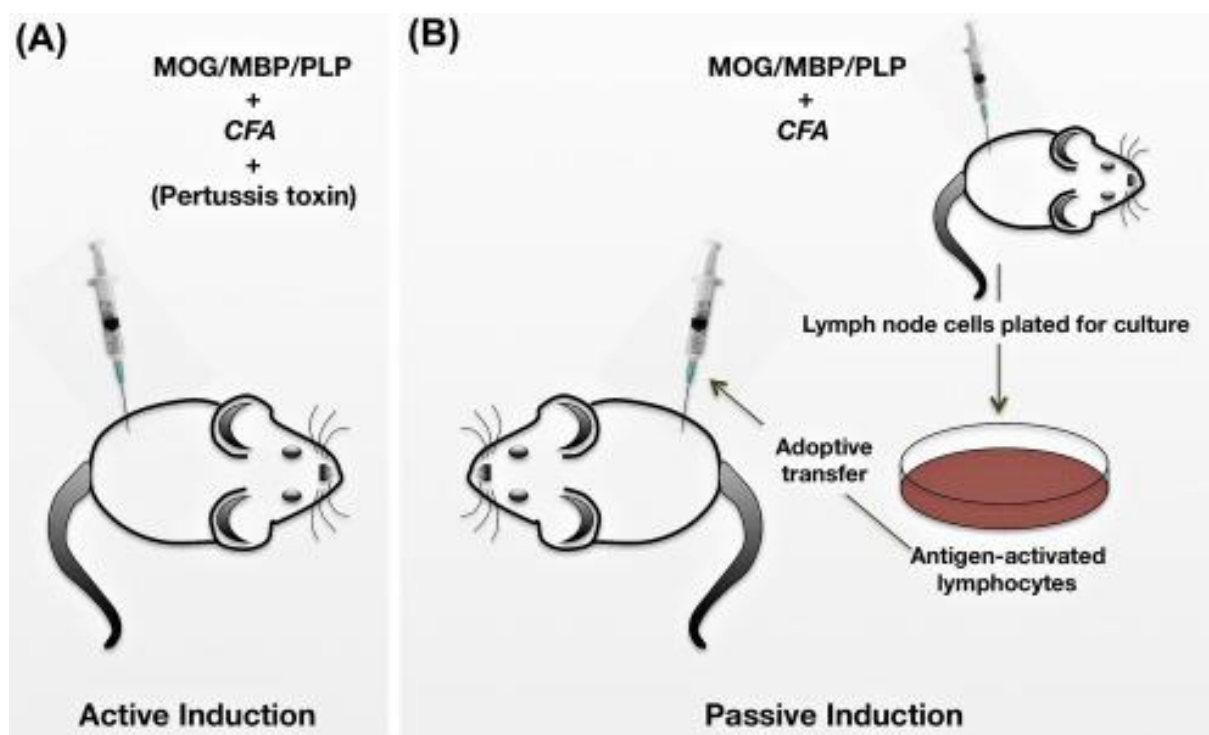
Produbljenjem znanja o stečenoj imunosti, počeli su se administrirati ciljani antigeni. Antigeni koji se imunizacijom često koriste za poticanje autoimune reakcije su: proteolipidni protein (PLP), bazični mijelinski protein (MBP) i mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (MOG) (12,35). MOG₃₅₋₅₅ je najčešće korišten epitop za aktivnu indukciju EAE-a. Kako bi se potaknula upala i inducirao odgovor imunskih stanica, potrebno je korištenje adjuvansa. Adjuvansi su spojevi koji pojačavaju imunski odgovor, najčešće djelovanjem na stanice urođene imunosti, vezanjem za njihove receptore koji prepoznaju obrasce patogena ili oštećenih stanica (engl. „pattern recognition receptors“, PRR) (34). Stoga se koriste u mnogim cjepivima zbog povećanja efikasnosti imunskog odgovora. Glavni adjuvans koji se koristi u induciranju EAE-a je kompletni Freundov adjuvans (engl.- „complete Freund's adjuvant“, CFA). CFA se sastoji od mrtvih bakterija *mycobacterium tuberculosis*, koje aktiviraju urođeni sustav, pripremljenih u smjesi parafinskog ulja i vode (12,38). CFA potiče prezentaciju antigena pomagačkim CD4+ T limfocitima, što posljedično dovodi do njihove aktivacije i proliferacije (12). Jedna od neželjenih karakteristika CFA jest mogućnost uzrokovanja veće propusnosti BBB, što može dovesti do prevelike infiltracije imunskih stanica, što može dovesti do pojave sustavne upale (36). Upotrebljavanje samo smjese CFA s antigenom često ne daje željeni autoimuni odgovor pa se za povećanje imunogeničnosti često koristi i pertusis toksin (12,38,41). Njegov mehanizam djelovanja na povećanje upale i imunskog odgovora još nije do kraja razjašnjen, no istraživanja su pokazala da inhibira T staničnu anergiju i djelovanje Treg stanica na periferiji te povećava propusnost BBB (36). Model aktivne imunizacije životinja antigenima mijelinske ovojnice najlakša je laboratorijska metoda induciranja EAE-a, što daje prednost u brzini dobivanja rezultata istraživanja. Glavna prednost modela aktivne

imunizacije je mogućnost istraživanja mehanizama indukcije autoimunog odgovora te upale. Također, moguća je identifikacija antigena koji sudjeluju u kasnijoj patogenezi bolesti, što čini aktivni model imunizacije pogodnim za istraživanje širenja epitopa. Naime, tada će se u lezijama nalaziti T i B limfociti, različiti od limfocita specifičnih za antigen kojim je inducirana početna autoimuna reakcija. Ti će limfociti biti specifični za antigen koji je postao izložen nakon oštećenja mijelinske ovojnice i oligodendrocita (35,46). Jedna od glavnih negativnih strana je nedostatak progresivne demijelinizacije te pogoršanja simptoma u miševa, usprkos prisustvu primarne demijelinizacije te aksonalne neurodegeneracije (12). Također, upotreba adjuvansa može dati lažno pozitivne rezultate u istraživanjima, zbog umjetno pojačane upale.

4.1.2. Model pasivne imunizacije

Model pasivne imunizacije također se koristi u indukciji EAE-a. Pasivna imunizacija je proces transfera stvorenih antitijela ili imunosnih stanica iz organizma donora u organizam primatelja. Takva antitijela ili imunosne stanice omogućuju imunosnu reakciju u organizmu primatelja. Miša donora potrebno je aktivno imunizirati smjesom CFA i mijelinskog aloantigena te nakon određenog vremena izolirati autoreaktivne T limfocite. Nakon njihove izolacije, limfociti T se *in vitro* stimuliraju s autoantigenom mijelinske ovojnice ili oligodendrocita, najčešće MOG antigenom (41). Tada se događa dodatna aktivacija limfocita T. Miš primatelj autoreaktivnih T limfocita uglavnom je naivan, odnosno prethodno nije bio izložen nikakvim eksperimentima niti manipulacijama. Stanice se administriraju intravenozno ili intraperitonealno u miša primatelja (35). Prednost pasivne imunizacije je mogućnost obilježavanja autoreaktivnih T limfocita, najčešće fluorescentnim proteinom ili bojom (36). To omogućuje praćenje stanica *in vivo*, pritom pomažući u točnoj lokalizaciji stanica unutar organizma i SŽS-a. Također, prednost je ovoga modela i ciljana diferencijacija T limfocita, što pridonosi preciznosti rezultata dobivenih u istraživanjima. Upalni proces

induciran pasivnom imunizacijom pomagačkih T stanica uglavnom nije precizno lokaliziran unutar SŽS-a, što otežava oponašanje uvjeta iz MS-a. Modeli pasivne indukcije EAE-a također ne prikazuju progresivnu demijelinizaciju i pogoršanja simptoma (poput invaliditeta), što ga čini neprikladnim u istraživanjima PPMS i SPMS.



Slika 6.- prikaz aktivne i pasivne imunizacije miša, pri čemu se inducira EAE

Preuzeto s članka: Denic A. i sur., Patophysiology of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Mult Scler. 2016;10:249-280.

4.1.3. Humanizirani i spontani modeli EAE-a

Razvojem genetičkog inženjerstva postali su dostupni razni sojevi miševa, koji izražavaju željeni gen koji kodira za protein od interesa u istraživanju određene bolesti. To je proširilo mogućnosti istraživanja patogeneze MS-a, posebno dostupnošću humaniziranih miševa dobivenih genetičkim modifikacijama. Oni mogu izražavati ljudske MHC molekule. Uz to, aleli za koje se smatra da pridonose razvoju MS-a, poput *HLA DRB15:01*, mogu biti umetnuti su u genetski kod istog transgeničnog miša (23,38). Takvo istraživanje omogućuje veću relevantnost imitacije patogeneze bolesti te je moguće uočiti sličnosti i razlike između mišijih i ljudskih imunskih komponenti koje sudjeluju u autoimunoj reakciji. Ipak, rezultati istraživanja ne mogu biti primjenjivi na sve osobe, pošto su MHC molekule izrazito različite između pojedinaca, no u osoba s MHC alelima koji su pokazani da imaju utjecaj na nastanak bolesti rezultati su vrlo primjenjivi. Istraživanja na humaniziranim EAE modelima omogućuju predodžbu utjecaja T limfocita, usmjerenih na specifičan antigen, na razvoj autoimune reakcije i demijelinizacije u SŽS-u. Spontani modeli EAE-a uključuju transgenične miševe koji sadrže T stanične receptore (engl.- „T cell receptor“, TCR) specifične za određeni antigen mijelinske ovojnice. Najčešće se koristi TCR usmjeren na MOG antigen (12). Također, oni mogu biti križani s miševima koji sadrže autoreaktivne B limfocite te proizvode autoreaktivna antitijela. Nekoliko mjeseci nakon okota miševi razvijaju spontanu upalu te demijelinizaciju. Spontani model posebno je koristan u istraživanjima povezanosti imunskog odgovora T i B limfocita unutar SŽS-a, u smislu B-stanične prerade i prezentacije antigena T limfocitima. Također je moguće utvrditi zasebnu razinu sudjelovanja B i T limfocita u patogenezi bolesti te indukciji autoimune reakcije. Spontani model također pokazuje znakove sekundarne demijelinizacije i aksonalnog oštećenja, uz manju aktivaciju komplementa (12).

4.2 Relevantnost EAE-a kao modela MS-a

Brojne su prednosti EAE-a kao modela MS-a. U istraživanjima primarne i sekundarne demijelinizacije te aksonalnog oštećenja, korisni su svi dostupni modeli EAE-a (5). Praćenje stanica u lezijama te određivanje njihovog efektorskog tipa daje odgovor na nastanak mehanizma upale. Zbog njihove velike zastupljenosti u lezijama, uloga CD4+ T limfocita u patogenezi bolesti može biti istražena u velikoj mjeri. EAE modeli su prikladni u istraživanju mogućeg antigena na kojeg su usmjereni T i B limfociti na početku upale te u njenom kroničnom stadiju (35). Stoga su svi pogodni za proučavanje širenja epitopa. Mehanizmi nastanka aksonalne neurodegeneracije čest su predmet istraživanja u EAE modelima. Usprkos mogućnosti praćenja oksidativnih mehanizama i mitohondrijske disfunkcije, EAE modeli nisu pokazali karakteristično mitohondrijsko oštećenje u MS-u (12). Također, mikroglijalne stanice ne proizvode veliku količinu kisikovih radikala, za razliku od istih stanica u čovjeka. Lezije nastaju dominantno u kralježničnoj moždini, za razliku od MS-a, gdje lezije nastaju dominantno u mozgu (5,35). To može dovesti do poteškoća u relevantnosti istraživanja, zbog mnogo veće složenosti moždanog tkiva u odnosu na kralježničnu moždinu. Također, lezije se dominantno sastoje od CD4+ pomagačkih T limfocita, što je u suprotnosti sa saznanjima o MS-u (CD8 + limfociti T dominantni u lezijama MS pacijenata) (35).

Nadalje, životinje s EAE-om uglavnom razvijaju akutne ili kronične simptome koji nemaju karakteristiku progresivnosti. Kronični se simptomi EAE-a uglavnom očituju u pojavi invaliditeta u miševa, koji traje nekoliko mjeseci. Ti su simptomi jednake jačine te se ne mijenjaju u vremenu, za razliku od progresivnosti bolesti u PPMS i SPMS. Zbog istraživanja patoloških karakteristika PPMS i SPMS, potrebni su EAE modeli koji bi oponašali njihove simptome te veće, progresivne ozlijede aksona i sive tvari. Induciranje autoimunog odgovora usmjerenog na neurofilament-L (sastavni dio aksonskog citoskeleta) pokazalo se kao dobar model za proučavanje povećane aksonalne ozlijede te većih lezija u SŽS-u (35).

Jedan od potencijalnih modela induciranja progresivnog EAE-a bio je u miševa genetički podložnih jakom imunosnom odgovoru stanica urođene imunosti (12). Model se temelji na povezanosti povećane aktivnosti mikroglije s progresivnom demijelinizacijom i neurodegeneracijom u SŽS-u MS pacijenata. Usprkos velikim lezijama i progresivnim simptomima, ovaj model nije bio potpuno prikladan, zbog dominantnog nastajanja u kralježničnoj moždini te izostanku primarne demijelinizacije. Različiti pokušaji induciranja upale moždane ovojnice, koja je karakteristična za PPMS, također nisu bili uspješni u EAE miševima. U daljnjim istraživanjima biti će potrebno odrediti prikladne modele progresivnog EAE-a koji bi približili patofiziološke karakteristike PPMS i SPMS. Također, u efektorskim funkcijama imunosnih stanica miševa i ljudi postoje određene razlike koje mogu utjecati na implementaciju rezultata EAE-a na pacijente s MS-om, te će o njima biti riječ u idućem poglavlju. Stoga je tijekom istraživanja potrebno uzeti u obzir pozitivne i negativne strane EAE-a te u skladu s time interpretirati rezultate.

Budućnost istraživanja na EAE modelima ponajprije zahtjeva osmišljavanje uspješnih modela progresivnog pogoršanja simptoma te jače demijelinizacije i neuroaksonalne degeneracije. Razvoj genetičkog inženjerstva doprinosi sve boljem uklapanju čimbenika ljudskog organizma u animalne modele. Modificiranjem modela mogli bi se stvoriti i humani kemokini, citokini te adhezijske molekule, koji također imaju ulogu u ostvarivanju autoimunog potencijala. Stoga je u budućnosti potreban razvoj EAE modela u smjeru što veće relevantnosti složenome ljudskome organizmu.

EAE kao eksperimentalni model MS-a	
Pozitivne strane	Negativne strane
-vrlo dobra predodžba aksonalnih oštećenja te sekundarne demijelinizacije	-lokalizacija lezija najviše u kralježničnoj moždini, za razliku od MS pacijenata, gdje su lezije najzastupljenije u moždanome tkivu
-visok stupanj mogućnosti istraživanja pomagačkih T stanica i Treg stanica u procesima upale i demijelinizacije	-dominacija CD4+ T limfocita u lezijama EAE životinja, za razliku od lezija MS pacijenata koje se sastoje najviše od CD8+ T limfocita
-mogućnost istraživanja pojave „širenja epitopa“	-malo modela koji imaju mogućnost induciranja progresivne demijelinizacije i pogoršanja simptoma
-mogućnost istraživanja antigena mijelinske ovojnice koji dovode do induciranja autoimunog odgovora	-genetičke i fenotipske razlike u funkcijama imunskih stanica
-pogodan za istraživanje autoimunih mehanizama koji dovode do demijelinizacije	-korištenje adjuvansa pri aktivnoj imunizaciji može dovesti do prevelike upale i potencijalno netočnih rezultata

Tablica 2.- prikaz pozitivnih i negativnih čimbenika EAE-a kao eksperimentalnog modela MS-a

5. Patološke karakteristike EAE-a

EAE je pogodan za istraživanje akutnih i kroničnih simptoma MS-a, povezanih s imunopatogenezi bolesti. Glavne imunosne stanice uključene u patogenezu EAE-a su pomagački T limfociti, koje su najzaslužniji za induciranje upale u SŽS (35). Uz njih, citotoksični T limfociti i B limfociti također sudjeluju u induciranju simptoma, no u nešto manjoj mjeri (12). Uloga antigen-prezentirajućih stanica u razvoju bolesti također je prisutna, posebno makrofaga i dendritičkih stanica (12). Njihovom infiltracijom u SŽS dolazi do aktivacije proupalnih T limfocita koji su nositelji imunopatogeneze EAE-a. Proupalne stanice također su prisutne u lezijama MS pacijenata, posebno makrofazi (5). Pokazano je kako makrofagi diferencirani iz monocita imaju ulogu u indukciji demijelinizacije u EAE modelima, dok mikroglija uklanja ostatke razorene mijelinske ovojnice. To pokazuje možebitnu ulogu makrofaga u inicijaciji upale nakon koje slijedi demijelinizacija, s obzirom da su makrofagi diferencirani iz monocita najzastupljenije stanice u SŽS lezijama MS pacijenata. Glavni medijatori demijelinizacije i kasnije neurodegeneracije u MS pacijenata su citotoksični CD8+ T limfociti.

5.1. Uloga T limfocita u patogenezi EAE-a

Pomažajući T limfociti (Th1, Th2, Th17) razlikuju se po svojim efektorskim funkcijama na temelju citokina koji luče te transkripcijskih faktora koji omogućuju njihovu diferencijaciju. U patogenezi EAE-a Th1 stanice bile su označene glavnim stanicama odgovornim za autoimunu reakciju SŽS-a. Uklanjanjem T-bet transkripcijskog faktora, odgovornog za diferencijaciju u Th1 efektorsku vrstu, miševi su postajali rezistentni na razvoj EAE-a (35).

Nakon otkrića Th17 stanica, krenula su mnogobrojna istraživanja o njihovoj ulozi u patogenezi različitih autoimunih bolesti. Istraživanja su pokazala patogeni učinak Th17 stanica na autoimune bolesti poput psorijaze i reumatoidnog artritisa (41). Isto tako, njihov patogeni učinak pokazan je u EAE-u. Miševi koji ne mogu sintetizirati cjelokupni IL-23, potpuno su

rezistentni na pojavu bolesti. Također, CD4⁺ stanice koje su *in vitro* tretirane s IL-23 u velikoj mjeri ulaze u SŽS te ondje imaju izraženiji patogenični učinak od stanica tretiranih s IL-12 (35). IL-23 je strukturno vrlo sličan IL-12, stoga je moguće da su prijašnja istraživanja mogla zamijeniti rezultate Th1 i Th17 stanica te označiti Th1 stanice kao glavne pridonositelje patogenezi (40). Istraživanja sugeriraju da Th1 i Th17 stanice zajedno pridonose patogenezi bolesti, tako što Th1 omogućuju inicijaciju bolesti, dok Th17 pridonose demijelinizaciji i daljnjoj patogenezi bolesti. Isto tako, određena istraživanja pokazuju kako Th1 stanice mogu infiltrirati u neupaljeno tkivo SŽS-a, dok Th17 stanice infiltriraju kasnije, u već upaljene dijelove SŽS-a (42). Stoga se pokazuje kako je njihovo djelovanje povezano te da oba tipa imaju uloge u demijelinizaciji i upali u SŽS-u. Ta su saznanja dobivena iz EAE modela, u skladu s patogenezi MS-a. Naime, u lezijama MS pacijenata podjednako su zastupljene Th1 i Th17 stanice te je u istim lezijama prisutna podjednaka razina IFN- γ i IL-17 (5). To pokazuje podjednaku ulogu Th1 i Th17 stanica u inicijaciji i održavanju upale i demijelinizaciji. Usprkos tome postoje razlike u efektorskim funkcijama tih stanica između miševa i ljudi. Naime, Th17 stanice u miševa proizvode GM-CSF, što dovodi do povećane infiltracije i diferencijacije proupalnih makrofaga i dendritičkih stanica u SŽS. Istu funkciju u ljudi imaju Th1 stanice, što može sugerirati njihovu važniju ulogu u indukciji i promociji upale u SŽS-u.

Uloga Th2 stanica u patogenezi bolesti je protuupalna te djeluju na ublažavanje kliničke slike bolesti (40). Jedan od mehanizama djelovanja Th2 stanica na smanjenje upale je i poticanje diferencijacije makrofaga u M2 tip, koji potiče zacjeljivanje tkiva i smanjenje upale (29). Stoga kod ublažavanja EAE-a poželjan utjecaj Th2 stanica koje bi potaknule zacjeljivanje tkiva SŽS-a. Postojeći koncepti liječenja preusmjeravanja diferencijacije pomagačkih CD4⁺ T stanica s Th1 i Th17 odgovora na Th2 odgovor, poput interferona β i glatiramer acetata, učinkoviti su u reduciranju RRMS (8). To korelira s rezultatima iz EAE modela. Također je

potrebno znati i razlike u efektorskim funkcijama Th2 stanica između miša i čovjeka. U miševa su Th1 i Th2 efektorske funkcije strogo razdijeljene, dok se u ljudi one više preklapaju. Primjer tome je lučenje protuupalnog citokina IL-10 od strane obiju vrsta stanica u ljudi (35). To pokazuje moguću ulogu na smanjenje upale od strane i Th1 i Th2 stanica.

Citotoksični CD8+ T limfociti imaju vrlo važnu ulogu u patogenezi MS-a, s obzirom na broj stanica u lezijama (12,35,40). Indukcija citotoksičnog autoimunog odgovora CD8+ T limfocita vrlo je zahtjevna, no moguća je pasivnim transferom CD8+ T limfocita specifičnih za MOG antigen u C57BL/6 miševa (12). Primijećen je njihov samostalan utjecaj na upalni proces u moždanome tkivu. Nakon pasivne imunizacije imunodeficientnog miša autoreaktivnim CD8+ citotoksičnim T limfocitima, primijećeni su simptomi demijelinizacije te kliničke pojave EAE-a, uz nastajanje upale u moždanome tkivu (43). Nadalje, transgenični miševi s citotoksičnim CD8+ limfocitima T koji sadrže humanizirani TCR protiv PLP-a, mogu inducirati upalni proces u SŽS-u, ponajprije u mozgu (12). Također, citotoksični CD8+ T limfociti imaju sposobnost prepoznavanja antigena na membrani oligodendrocita, što dovodi do njihovog direktnog oštećenja i razaranja (12). Posljedično dolazi do primarne demijelinizacije te nemogućnosti remijelinizacije, što je pokazano i u MS pacijenata. CD8+ citotoksični T limfociti u EAE modelima pokazuju diferencijaciju u tzv. mukozne invarijantne T stanice (engl.- „mucosa-associated invariant T cells, MAIT), koje imaju efektorsku ulogu sličnu stanicama urođene imunosti (16). One luče IL-17, isto kao i Th17 stanice, što pokazuje njihovu proupalnu ulogu. Četvrtina svih citotoksični CD8+ T limfocita izoliranih iz aktivnih lezija MS pacijenata ima sposobnost lučenja IL-17, što je veliki broj ukoliko se uzme u obzir zastupljenost CD8+ T limfocita u lezijama MS pacijenata (5). Zbog nedostatka prikladnijih modela, autoreaktivni CD8+ T limfociti manje su istraženi od autoreaktivnih pomagačkih CD4+ T limfocita te je broj podataka vezanih za njihovu ulogu u patogenezi EAE-a manji.

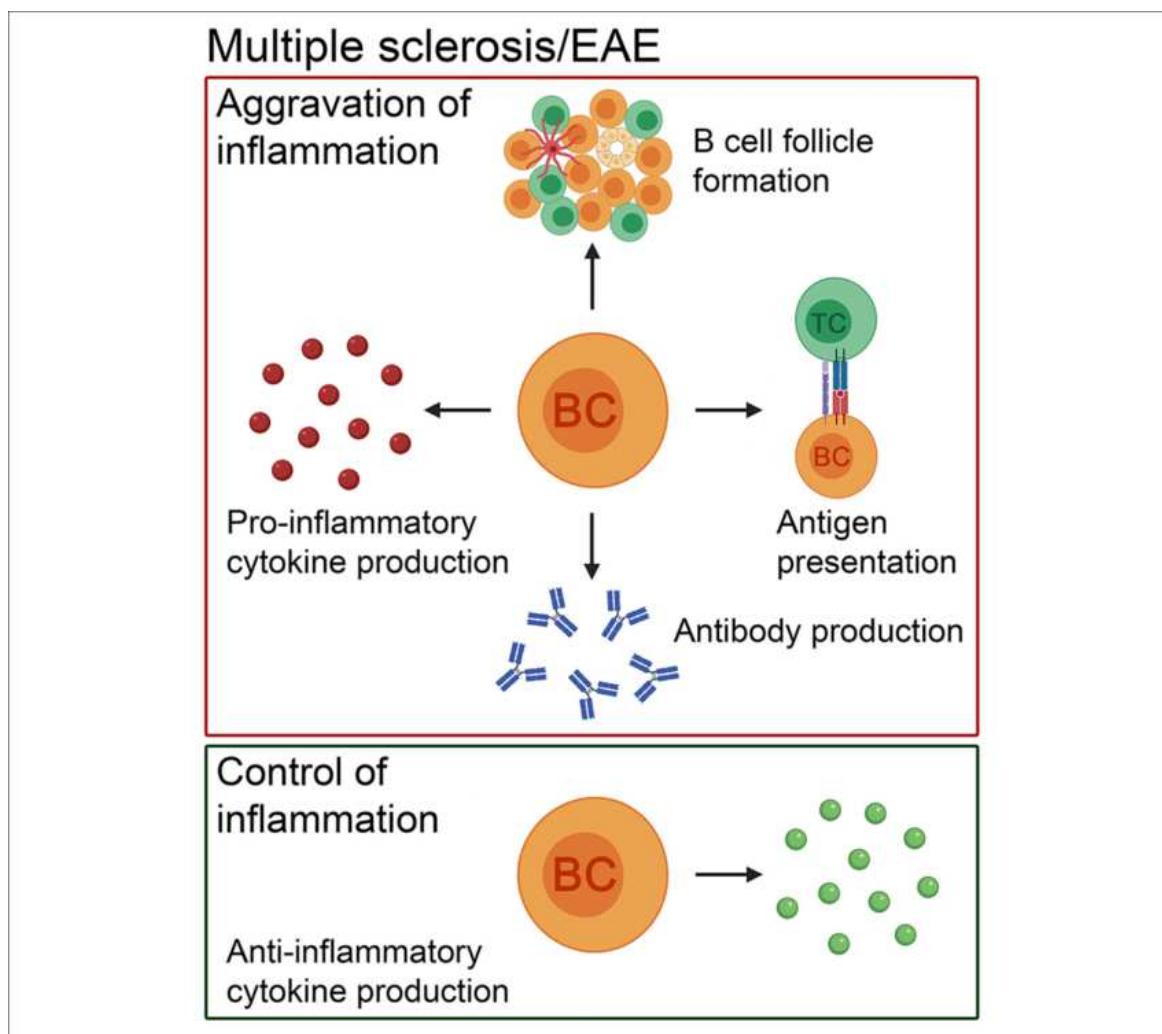
Regulacijski T limfociti (Treg) imaju važnu ulogu u sprječavanju prevelike aktivnosti ostalih T limfocita. Različiti modeli pokazali su da Treg imaju sposobnost kontrole nastanka i razvoja EAE-a. Adoptivni transfer CD4⁺ Treg stanica, specifičnih za MOG antigen, pokazuje smanjenje jačine bolesti. *In vitro* istraživanja pokazuju imunosnu supresiju MOG autoreaktivnih T limfocita od strane Treg stanica (40). Djelovanje Treg stanica temelji se na lučenju interleukina 10 (IL-10), koji pripada protuupalnim citokinima. To pokazuju istraživanjima na miševima koji ga ne mogu sintetizirati, zbog delecije gena koji kodiraju za komponente njegove sinteze. Takvi miševi nisu razvili zaštitu te su razvili težu bolest. Smatra se kako Treg stanice djeluju i lokalnim lučenjem protuupalnog citokina - transformirajućeg faktora rasta beta (engl.- „Transformed growth factor“, TGF- β) (35). Nadalje, Treg eksprimiraju velik broj inhibicijskih CTLA-4 receptora na kojeg se vežu B7-1 i B7-2 kostimulacijske molekule eksprimirane na antigen-prezentirajućim stanicama. Na taj način sprječavaju kostimulaciju efektorskih T limfocita te posljedično njihovu aktivaciju u SŽS-u miševa (35,40). Tijekom faze oporavka od EAE-a, u SŽS-u životinja nalazi se velik broj Treg stanica te njihovo uništenje usporava proces oporavka (35). MOG-specifične Treg stanice pokazuju manji stupanj supresije Th17 stanica u odnosu na Th1 stanice. Jedna je od teorija da je supresivni učinak Treg stanica na Th17 stanice slabo vidljiv, zbog lučenja IL-17. Stoga je njihov učinak sličan. Buduća istraživanja Treg stanica preko EAE modela biti će od izuzetne važnosti u definiranju njihovih točnih mehanizama djelovanja te u mogućoj primjeni u razvoju novih terapija. Istraživanja Treg stanica iz MS pacijenata sugeriraju da one imaju smanjenu sposobnost supresije proliferacije MOG i MBP autoreaktivnih T limfocita, što je pokazano i u EAE modelima (35). Također je potrebno i dodatno razjašnjenje značaja antigen-prezentirajućih stanica u induciranju i progresiji bolesti, kako bi se točno odredilo dolazi li do *de novo* nastanka novih autoreaktivnih T stanica ili dolazi do supresije Treg stanica. Uloga T limfocita od izuzetnog je značaja u patogenezi EAE-a i MS-a. Razumijevanje njihove uloge u patogenezi MS-

a bit će izrazito važno u razvoju lijekova. Ključnu ulogu u njihovome istraživanju imat će EAE modeli.

5.2. Uloga B limfocita u patogenezi EAE-a

B limfociti također pridonose patogenezi EAE-a, iako u nešto manjoj mjeri od T limfocita. Najveći doprinos daju proizvodnjom autoreaktivnih antitijela te prezentacijom antigena pomagačkim CD4⁺ T limfocitima. Istraživanja su pokazala da su B limfociti najzastupljenije MHC II⁺ stanice u SŽS-u miša nakon indukcije EAE-a (44). Također je pokazano da su B stanice odgovorne za reaktivaciju infiltriranih T limfocita u SŽS-u, posebno Th1 stanica. To čine posebice preko prerade i prezentacije antigena MOG₃₅₋₅₅. Jedna od očekivanih metoda patogeneze B limfocita u EAE-u je i proizvodnja autoantitijela, specifičnih za antigen prisutan na mijelinskoj ovojnici. MOG-specifična antitijela, posebno 8-18C5 klon, (koji cilja vanstaničnu V domenu MOG proteina) pojačavaju bolest u miševa s prethodno induciranim EAE-om, što potvrđuje patogenetsku ulogu autoantitijela u SŽS-u (35). Spontani modeli s transgeničnim TCR-om specifičnim za MOG, pokazali su visoku razinu proizvodnje anti-MOG antitijela u SŽS-u (35,39). Naposljetku B limfociti imaju sposobnost stvaranja ektopičnih germinalnih centara u SŽS-u, koji sadrže folikularne dendritičke stanice (FDS). One su nužne za diferencijaciju i afinitetnu maturaciju aktiviranih B limfocita (35). Takva tercijarna limfna tkiva nastaju uglavnom kada je upalni proces dugotrajan. Ista takva tercijarna limfna tkiva nađena su i u meningama pacijenata koji boluju od SPMS-a, no nisu nađena u pacijenata s PPMS-om (5,16). To ukazuje na vrlo dugotrajnu upalu u SPMS. Ektopični germinalni centri SŽS-a omogućuju stvaranje plazma stanica i memorijskih B limfocita unutar njega. Usprkos navedenim patološkim utjecajima B limfocita na razvoj EAE-a, neka su istraživanja pokazala njihov pozitivan utjecaj na supresiju bolesti. Taj je učinak postignut lučenjem IL-10, kojega luče regulacijske B10 stanice. Miševi kojima su uklonjeni svi B limfociti prije indukcije EAE-a, imali su vrlo teške simptome, za razliku od onih kojima su B10 stanice adoptivno

transferirane (45). To pokazuje dodatnu mogućnost korištenja specifičnih B limfocita u terapijske svrhe.



Slika 7.- prikaz proupalnih i protuupalnih učinaka B limfocita na tijek EAE-a i MS-a

Preuzeto iz: Chunder R. i sur., B Cells in Multiple Sclerosis and Virus Induced Neuroinflammation. *Frontiers in Neurology*.2020;11:591894 (50)

6. EAE u istraživanjima terapija za MS

Saznanja dobivena animalnim EAE modelima upotrebljavaju se u razvoju lijekova koji se koriste u terapiji MS-a. Najčešće korištena terapija protiv RRMS-a je IFN- β . Njegovi učinci potvrđeni su na EAE modelima. Naime, on potiče smanjenje koncentracije proupalnih čimbenika te povećanje koncentracije protuupalnih čimbenika (16). Glatiramer acetat (GA) također se koristi u smanjenju simptoma RRMS-a. Prije toga primijećen je pozitivan učinak na smanjenje tegoba u EAE miševa (35). GA je polipeptid koji se sastoji od različitih kombinacija četiri aminokiseline (alanin, lizin, glutamat i tirozin), koji je najprije bio zamišljen kao peptid oponašatelj MBP antigena koji će inducirati autoimuni odgovor, no ispostavilo se da ublažava simptome EAE-a. GA se natječe s raznim mijelinskim antigenima za mjesto na MHC molekulama, što smanjuje prezentaciju tih antigena autoreaktivnim T i B limfocitima. Nadalje, GA specifični T limfociti imaju izmijenjenu sekreciju proupalnih citokina te povećan Th2 odgovor. IFN- β i GA su danas najčešće korištene terapije za RRMS, zbog njihove sigurnosti te niže cijene od novijih lijekova. U terapiji RRMS-a koristi se i dimetil fumarat (DF), čija je efikasnost testirana na EAE modelima. DF djeluje protuupalno uglavnom putem pomagačkih CD4+ T limfocita. Pod utjecajem DF-a, Th1 stanice proizvode manje IFN- γ te više IL-10, što pokazuje protuupalni učinak DF-a (35). Često ometaju i diferencijaciju Th1 stanica, smanjujući proizvodnju IL-12. Isto tako, pokazan je i njegov učinak na inhibiciju infiltracije monocita u SŽS. Također, jedan od najuspješnijih terapeutika koji se koristi u liječenju MS-a, fingolimod, razvijen je nakon istraživanja na EAE modelima. Fingolimod je imunosupresivni lijek koji sprječava izlazak T limfocita iz limfnog čvora, internalizirajući receptor za sfingozin-1-fosfat (S1P). Zbog toga limfociti T ne mogu krenuti prema većoj koncentraciji S1P, i time izaći iz limfnoga čvora. U tretmanu MS-a sve se više koriste monoklonalna antitijela koja ciljaju na određeni epitop antigena koji se nalazi na imunosnim stanicama. Najpoznatiji je primjer Natalizumab, za čije su pokazivanje učinkovitosti zaslužna istraživanja na EAE modelima (5).

Natalizumab je usmjeren na $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) integrin koji je eksprimiran na velikom broju imunosnih stanica. Inhibicijom tog integrina sprječava se ulazak imunosnih stanica kroz endotel krvnih žila u SŽS. Također se koristi u tretmanu RRMS-a. EAE modeli od izuzetnog su značaja u istraživanju patogeneze demijelinizacije, upale i aksonalnog oštećenja, stoga su prikladni i u istraživanjima lijekova koji djeluju na smanjenje patogenih učinaka bolesti. U budućim razvojima terapija, EAE modeli biti će i dalje neophodni za pretklinička in vivo testiranja terapija, prije direktnog istraživanja u ljudskom organizmu.

7. Zaključak

Animalni modeli najreprezentativniji su načini istraživanja složenih fizioloških i patofizioloških procesa u ljudskome organizmu. Posebno je važno istaknuti prednosti i mane tih modela kako bi se relevantno prezentirali i interpretirali rezultati. EAE modeli u velikoj mjeri pridonose pozitivnim pomacima u razumijevanju MS patogeneze te razvoju terapije koja omogućuje olakšani život MS pacijentima. Svaki model EAE-a ima primjenu za određen element patogeneze bolesti, poput upale, demijelinizacije i infiltracije imunosnih stanica u SŽS. Stoga se prije željenog istraživanja model mora prilagoditi glavnoj njegovoj glavnoj hipotezi te cilju. Uz to, potrebno je uzeti u obzir i negativne strane EAE modela, posebno pri istraživanjima uloge citotoksičnih CD8⁺ T ili B limfocita. Glavni ciljevi istraživanja MS-a u budućnosti je spoznavanje veze između početne upale te pojave neurodegeneracije, posebno u pogoršanju simptoma. Imunosne stanice imaju ključnu ulogu u tijeku bolesti, stoga će biti ključno razumjeti njihovo djelovanje u inicijaciji te pogoršanju bolesti.

Razvoj novih tehnologija može doprinijeti utvrđivanju čitave imunopatogeneze bolesti, vizualizacijom i označavanjem komponenti koje sudjeluju u imunosnom odgovoru. Usprkos *in silico* te *in vitro* metodama, *in vivo* istraživanja približavaju složenost bolesti te povezanost raznih čimbenika potrebnih za njeno nastajanje. Stoga je EAE najvažniji model u proučavanju patoloških čimbenika MS-a.

8.Literatura

1. Williamson J.M., Lyons D. Myelin Dynamics Throughout Life: An Ever-Changing Landscape? *Front Cell Neurosci.* 2018 Nov 19;12(424):doi: 10.3389/fncel.2018.00424.
2. Jessen K.R. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(10):1861–7.
3. Laura Fontenas, Sarah Kucenas. Glial Cell Development. *Ref Module Life Sci Elsevier.* 2017;10(1016):0–12.
4. Efendi Hüsnü. Clinically Isolated Syndromes: Clinical Characteristics, Differential Diagnosis, and Management. *Noro Psikiyatr Ars.* 2015;52:1–11.
5. Dendrou C. A. , Fugger L. , Friese M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:545–58.
6. Primary progressive MS (PPMS). *MS Soc.* 2019;
7. Traboulsee A. i sur. Revised Recommendations of the Consortium of MS Centers Task Force for a Standardized MRI Protocol and Clinical Guidelines for the Diagnosis and Follow-Up of Multiple Sclerosis. *Neuroradiol.* 2016;37(3):394–401.
8. Walton C. i sur. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler.* 2020 Dec 26;26(14):1816–21.
9. Mitchell T Wallin et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18(3):269–85.
10. Coetzee T, Thompson AJ. Atlas of MS 2020: Informing global policy change. *Mult Scler.* 2020 Dec;26(14):1807–8.
11. Hodge R.D. i sur. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature.* 2019;573:61–8.
12. Lassmann H., Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133:223–44.
13. Pernice S. i sur. Computational modeling of the immune response in multiple sclerosis using epimod framework. *BMC Bioinformatics.* 21:550–4.
14. Hart B.A. i sur. Multiple sclerosis and drug discovery: A work of translation. *Lancet Discov Sci.* 2021;68.
15. How MS research works? Multiple Sclerosis Trust. 2022;

16. Filippi M. i sur. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primer*. 2018 Aug 11;43:41–4.
17. History of MS. Multiple Sclerosis Trust. 2018;
18. Popescu BF. i sur. Pathology of Multiple Sclerosis: Where Do We Stand? *Contin Mineap Minn*. 2013;19(4):901–21.
19. Calabrese M., Filippi M., Gallo P. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2010 Jun 8;6(8):438–44.
20. Powell A.M., Black M.M. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity?. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2001;26(5):427–433
21. Messam C.A. i sur. Glial Cell Types. *Acad Press Encycl Hum Brain*. 2002;10:369–87.
22. Risk of developing MS [Internet]. Multiple Sclerosis Trust; Available from: <https://mstrust.org.uk/a-z/risk-developing-ms>
23. Jelcic I. i sur. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell*. 2018;175(1):85–100
24. Silva A.M. i sur. Protective role of the HLA-A*02 allele in Portuguese patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009;15(6):771–4.
25. Grytten N. i sur. Month of birth as a latitude-dependent risk factor for multiple sclerosis in Norway. *Mult Scler*. 2012;19(8):1028–34.
26. Sintzel M.B. i sur. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol Ther*. 2018;7(1):59–85.
27. Neelakshi R.J. i sur. Epstein Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1) peptides recognized by adult multiple sclerosis patient sera induce neurologic symptoms in a murine model. *J Autoimmun*. 2020;106:102332
28. Tsirka S.E. TKK. The Diverse Roles of Microglia in the Neurodegenerative Aspects of Central Nervous System (CNS) Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):504.
29. Gandhi R. i sur. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2010;15:7–14.
30. Smith D.A. , Germolec D.R. Introduction to immunology and autoimmunity. *Env Health Perspect*. 1999;107:661–5.
31. Xing Y., Hogquist K.A. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6).

32. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:281–94.
33. Cao Y. i sur. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med.* 2015; 7(287):287ra74
34. Booss J. i sur. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1983; 62(1-3):219-32.
35. Robinson A.P. i sur. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:173–89.
36. Denic A. i sur. Pathophysiology of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mult Scler.* 2016;11:249–80.
37. What is an adjuvant and why is it added to a vaccine? Centers for Disease Control and Prevention. 2020;
38. Tanaka Y. i sur. EAE Induction by Passive Transfer of MOG-specific CD4+ T Cells. *Bio Protoc.* 2017;7(13).
39. Huizinga R. i sur. Immunization with neurofilament light protein induces spastic paresis and axonal degeneration in Biozzi ABH mice. *J Neuropath Exp Neurol.* 2007;66:295–304.
40. Fletcher J.m. i sur. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(1):1–11.
41. Tesmer L.A. i sur. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223:87–113.
42. O Connor R.A. i sur. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008;181(6):3750–4.
43. Huesby ES i sur. A pathogenic role for myelin specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2001;194:669–76.
44. Goverman J.M., Stromnes I.M. PEM. B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the CNS. *J Immunol.* 2015;192(3):929–39.
45. Matsushita T. i sur. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 118.

46. Constantinescu C.S. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Be J Pharmacol.* 2011;164(4):1079–106.
47. Levin M.C. i sur. Neurodegeneration in multiple sclerosis involves multiple pathogenic mechanisms. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease.*2014;4:49-63.
48. Hoeftberger R. i sur. Autoimmune encephalitis in humans: how closely does it reflect multiple sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 2015;3:80
49. Li H., Yang Y.G., Sun T. Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Induction of Tolerance and Treatment of Autoimmune diseases. *Front Bioeng. Biotechnol.* 2022; 889291
50. Chunder R. i sur., B Cells in Multiple Sclerosis and Virus Induced Neuroinflammation. *Frontiers in Neurology.*2020;11:591894

Životopis

Osobne informacije:

Ime i prezime: Adrian Perhat

Spol: M

Datum rođenja: 19.09.2000.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Sušik 8, 51243 Tribalj

Broj mobitela: +385 994741415

email adresa: adrianperhat2000@gmail.com

Radno iskustvo:

Obvezna stručna praksa-

Ljekarna Matejčić, Boras Devčić, Trg Stjepana Radića 1

-Rad u laboratoriju, slaganje lijekova i kozmetike

Obrazovanje i osposobljavanje:

2019. do danas:

Sveučilište u Rijeci- Odjel za biotehnologiju, Preddiplomski studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

2015.-2019.:

Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci

-odličan uspjeh u svim razredima, dodijeljene pohvalnice od učiteljskoga
vijeća za odličan uspjeh i uzorno vladanje u svim razredima

-6. mjesto na županijskom natjecanju iz biologije

- 9.mjesto na županijskom natjecanju iz hrvatskoga jezika
- 11.mjesto na županijskom natjecanju iz latinskoga jezika
- sudjelovanje na natjecanju iz latinskoga jezika: „ECCL Euroclassica Latin Examination“

2007.-2015.:

Osnovna škola Jurja Klovića Tribalj

- odličan uspjeh u svim razredima
- 4.mjesto na županijskom natjecanju iz povijesti

Osobne vještine i kompetencije:

Materinji jezik: Hrvatski jezik

Ostali jezici:

	Razumijevanje		Govor		Pisanje
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski jezik	A2	A2	B1	B1	B1
Talijanski jezik	C2	C2	C2	C2	C2
Njemački jezik	C1	C2	C1	C1	C2

Digitalne vještine:

- vješto rukovanje programima dostupnim na Windows operacijskim sustavima (MS Word, MS Powerpoint, MS Excel)
- vješto korištenje društvenih mreža (Facebook, Twitter)
- vješto korištenje programa za sastanke (MS teams, Zoom, Skype)
- vješto korištenje programa za kemijsku analizu i istraživanja: Chimera, MacMolPlt, Avogadro, PyMOL, Marvin, Gamess
- snalaženje u pretraživanju znanstvenih radova i baza podataka

Vozačka dozvola: Vozačka dozvola B kategorije