

# **Multipla skleroza: temeljne značajke i mehanizam nastanka**

---

**Nižić, Petra**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2011**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:545802>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATI KI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**MULTIPLA SKLEROZA: TEMELJNE ZNA AJKE I  
MEHANIZAM NASTANKA**

**MULTIPLE SCLEROSIS: BASIC FEATURES AND  
UNDERLYING DISEASE MECHANISM**

**SEMINARSKI RAD**

Petra Niži

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršoli

Zagreb, 2011.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	2
2. KLINIČKE I BIOLOŠKE ZNAČAJKE MULTIPLE SKLEROZE .....	3
2.1. Oblici multiple skleroze i simptomi bolesti .....	5
3. ETIOLOGIJA MULTIPLE SKLEROZE.....	6
3.1. Genetske predispozicije.....	8
4. MEHANIZAM OŠTEĆENJA CNS-a (MIJELINA, OLIGODENDROCITA I AKSONA) U MULTIPLOJ SKLEROZI.....	10
4.1. Indukcijska i efektorska faza autoimune reakcije u EAE/MS.....	12
4.1.1. Probijanje krvno-moždane barijere .....	14
4.2. Mehanizam ozljede neurona i aksona u MS.....	17
5. ZAKLJUČAK .....	18
6. LITERATURA.....	19
7. SAŽETAK.....	21
8. SUMMARY .....	22

## 1. UVOD

Multipla skleroza (lat. *Sclerosis multiplex, Encephalomyelitis disseminata*, MS) je upalna demijelinizacijska bolest središnjeg živ anog sustava (CNS-a) ija je glavna manifestacija nastanak skleroza (lezija, plakova) u CNS-u koje su rezultat gubitka mijelinske ovojnice oko aksona neurona, ali i ošte enja samih demijeliniziranih aksona. Javlja se s prili nom u estaloš u (1/1000 ljudi), dvaput eš e u žena nego muškaraca i to uglavnom izme u dvadesete i etrdesetpete godine života.

Ve ina oboljelih od MS-e živi još nekoliko desetlje a (tridesetak godina i više) nakon dijagnoze s uglavnom normalnom radnom sposobnoš u, a procjenjuje se da bolest skra uje o ekivanu životnu dob za oko deset godina. Razvoj simptoma razlikuje se u oboljelih; simptomi se javljaju povremeno i s razvojem bolesti mogu se mijenjati u jakosti i trajanju. Prema tijeku bolesti razlikuju se etiri oblika MS-e.

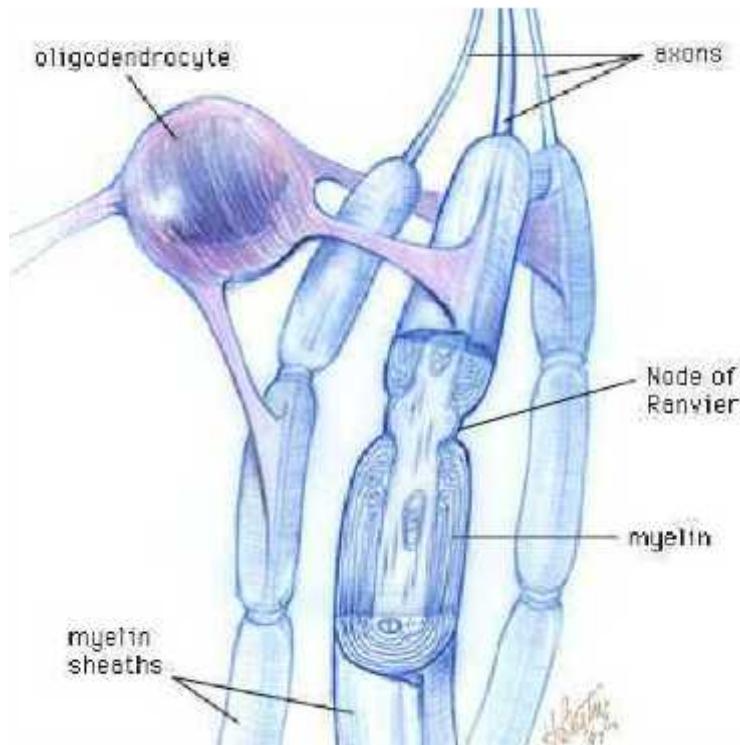
Lezije koje nastaju u MS-i posljedica su djelovanja autoreaktivnih imunosnih stanica koje se infiltriraju u mozak prelaze i krvno moždanu barijeru, zbog ega se MS smatra autoimunosnom boleš u, no nije dokazano je li infekcija specifi nim virusom okida takve autoreaktivnosti ili se ona javlja zbog drugih uzroka.

Dakle, uzrok multiple skleroze još uvijek nije poznat, no pretežno se smatra da je bolest uzrokovana udruženim djelovanjem više imbenika: genetskom predispozicijom, izloženoš u virusu/ima u djetinjstvu (sporo djeluju i virus koji ostaje mnogo godina latentan u organizmu uz povremene manifestacije) i okolinom (alergijska zbivanja u organizmu). Zanimljivo je da je bolest eš a u zemljama koje su smještene izme u 40. i 65. stupnja sjeverne geografske širine, a na Dalekom istoku i tropima je vrlo rijetka te da se više javlja u sterilnim zemljama. Oboje govori u prilog pretpostavci da je infekcija nekim virusom jedan od glavnih pokreta a ove bolesti, uz injenicu da se u krvi oboljelih esto na u povišene razine antivirusnih protutijela, no do danas još uvijek nije otkriven specifi an virus povezan s razvojem MS-e (Demarin i sur., 2000).

Cilj ovog rada je ukratko prikazati temeljne klini ke i biološke zna ajke multiple skleroze, dati pregled pretpostavljene etiologije bolesti te trenuta nih uvida o mehanizmu demijelinizacije i ošte enja aksona neurona središnjeg živ anog sustava.

## 2. KLINIKE I BIOLOŠKE ZNAJKE MULTIPLE SKLEROZE

Mnogi aksoni neurona mozga i leđne moždine su mijelinizirani, odnosno obavijeni mijelinskom ovojnicom koju oko aksona tvore stanice oligodendrociti, stvarajući segmente ovojnica, pri čemu jedan oligodendrocyt sudjeluje u stvaranju više mijelinskih ovojnica različitih aksona (Slika 1).



**Slika 1.** Oligodendrociti u CNS-u grade mijeliniku ovojnicu oko aksona. (Preuzeto iz Johnston i Joy, 2003)

Mijelinska ovojica oko aksona ima funkciju izolatora koji omogućuje vrlo brzo provođenje akcijskog potencijala. Naime, natrijski kanali regulirani naponom koji se otvaraju kada je neuron podražen (uzrokujući depolarizaciju) postoje samo na golim području jima aksona između segmenta mijelinske ovojnica (tzv. Ranvierovi vorovi, suženja), dok su na području jima aksona obavijenim mijelinom pretežno prisutni kalijevi kanali (koji se otvaraju izazivajući repolarizaciju) što ima posljedicu brzog skokovitog prijenosa akcijskog potencijala od jednog Ranvierovog suženja do drugog kroz mijelinizirani akson.

U multiploj sklerozi dolazi do demijelinizacije aksona, ali i oštećenja samih demijeliniziranih aksona, tijela neurona i samih oligodendrocytova što je rezultat napada od strane autoreaktivnih imunokompetentnih stanica, a ima kao posljedicu usporenje ili potpuni

prestanak provo enja akcijskih potencijala kroz aksone, ime se gubi poslana informacija te se o ituje kao klini ki deficit, odnosno javljaju se razli iti simptomi bolesti. Simptomi se javljaju povremeno i nisu predvidljivi, ali su povezani s mjestom nastanka demijelinizirane lezije u CNS-u, iako postoje i "tihe" lezije koje ne daju simptome. U podru jima ošte enog mijelina se pove ava broj i veli ina astrocita, stanica koje normalno podupiru i hrane neurone u mozgu. Takav obimni rast astrocita na mjestu ošte enja naziva se gliosa i odgovoran je za nastanak ožiljka (plaka). U mozgu oboljele osobe postoje dva tipa lezija; stabilne lezije koje ne pokazuju znakove upalnog procesa (nastale vremenski ranije) te aktivne ili kroni ne lezije koje su trenutna žarišta upalnog procesa demijelinizacije i ošte enja aksona (Johnston i Joy, 2003).

Za sigurnu potvrdu dijagnoze ove bolesti koristi se skeniranje mozga tehnikom magnetske rezonance koja otkriva nastale plakove na mozgu, a tako er se analizira i cerebrospinalna teku ina (CSF) uzeta punkcijom iz le ne moždine. Brojni razli iti biljezi bolesti u tijeku razdoblja aktivne demijelinizacije se javljaju u CSF, iako ne svi u svih oboljelih, primjerice antiviralna antitijela, razli iti citokini i citokinski receptori, adhezijske i kostimulatorne molekule, IgG i IgM, T limfociti, mijelinski bazi ni protein (MBP, komponenta mijelina), metaloproteinaze (bitne za prodom stanica kroz krvno moždanu barijeru), gilitoksin (citotoksi an za oligodendrocyte i astrocite) i mnogi drugi (Johnston i Joy, 2003).

Kad se proteini cerebrospinalne teku ine oboljelih razdvoje gel elektroforezom, javljaju se pojedini bendovi konstantni tijekom bolesti za odre enu oboljelu osobu; takvi se bendovi nazivaju oligoklonski, a predstavljaju jedan tip protutijela proizveden od strane odre enog klena limfocita B što potvr uje sudjelovanje i humoralne imunosti (u jednom dijelu pacijenata humoralna imunost igra klju nu ulogu, o emu e rije i biti kasnije). Pomo u metode *phage display library* pokušava se otkriti antigen na koji nastaju takva specifi na protutijela u oboljelih osoba, no dosad bez jednozna nih rezultata (Govarts i sur., 2007).

Na ovom primjeru možemo se zapitati: da li na ena protutijela predstavljaju imunosni odgovor na infektivni agent poput virusa koji se povremeno manifestira i uzrok je MS-e, ili se jednostavno radi o proizvodu autoreaktivnih B limfocita; odnosno postavlja se pitanje uzroka ove bolesti.

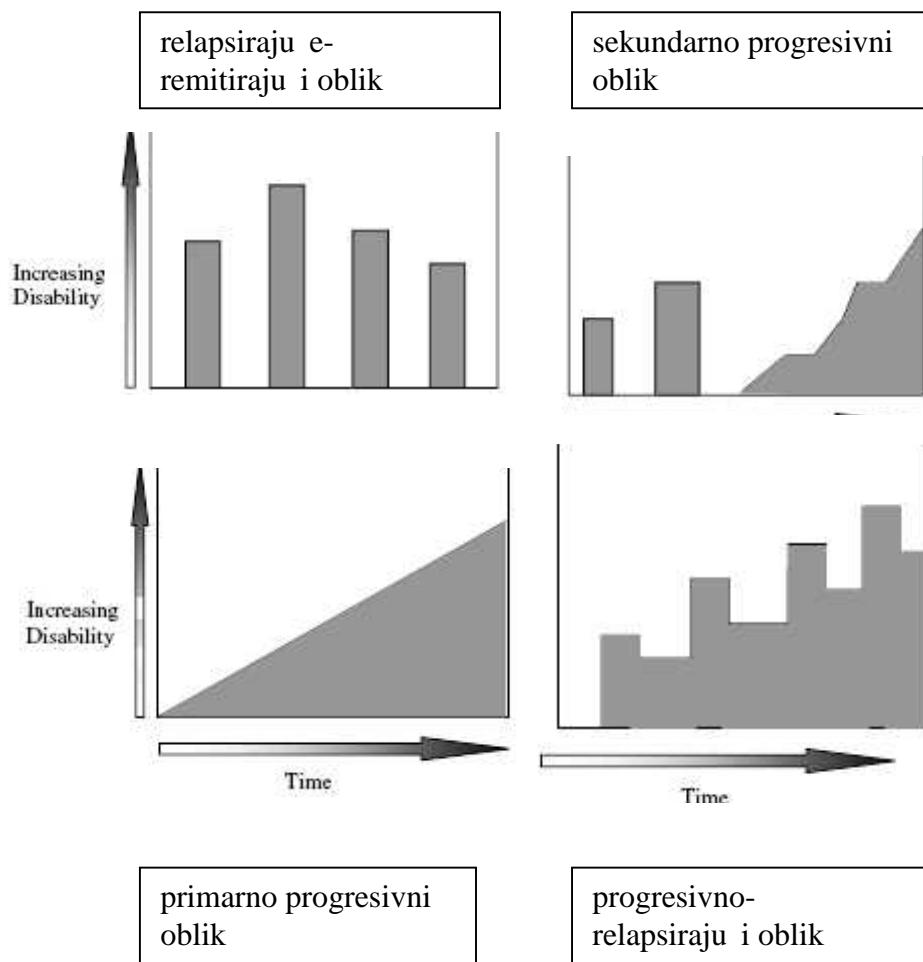
## 2.1. Oblici multiple skleroze i simptomi bolesti

U većine bolesnika (85%) bolest započinje kao relapsirajuća remitterajuća oblik, pri čemu dolazi do faza pogoršanja (relapsa, šubova, akutnih napada) od izloženih pojavnih nekih od simptoma bolesti, ovisnih o mjestu demijelinizacije u CNS-u (mučenje vida jednog oka, obamrlost ili trnci u nekom dijelu tijela, gubitak koordinacije, motoričko slabljenje dijela tijela, poteškoće u hodanju, nemogućnost kontrole mokra noge sfinktera, kognitivne poteškoće, bol i drugi). Razdoblja relapsa traju jedan do tri mjeseca i pravilno su razdobljenim remisijama u kojima se stanje bolesnika vraća na ono koje je postojalo prije pogoršanja bolesti ili može zaostati određeno manje oštećenje (Demarin i sur., 2000).

Molekularna osnova remisije, odnosno oporavka nakon relapsa je remijelinizacija aksona do koje dolazi stvaranjem nove mijelinske ovojnica od strane novih oligodendročita nastalih iz progenitorskih matičnih stanica oligodendročita što daje mogućnost remijeliniziranim aksonima da ponovo provode akcijske potencijale. Uloga različitih stanica u mozgu u procesu remijelinizacije je trenutni predmet istraživanja načinu biće svakako trebalo intenzivnije poraditi zbog mogućeg razvoja potencijalne strategije za liječenje bolesti. Ukoliko dođe do oštećenja samih aksona i izraženog smanjenja broja i veličine oligodendročita, više nema remisija nakon relapsa već se bolest razvija u sekundarno progresivni oblik (oko 50% bolesnika s relapsirajućim oblikom ga razvije). U takvom obliku postoji kontinuirana progresija bolesti s kratkim razdobljima stabilizacije.

Rijetko, javlja se primarno progresivni oblik sa stalnom progresijom od početka bolesti što je popravljeno gubitkom određenih sposobnosti i progresivno-relapsirajuća oblik kad se bolest progresivno pogoršava od samog početka uz vremena akutna pogoršanja s ili bez oporavka na stupanj prije relapsa (Demarin i sur., 2000). Shematski prikaz oblika multiple skleroze prikazan je Slikom 2.

Postojanje više oblika multiple skleroze, s obzirom na tijek razvoja bolesti i razlike u simptomima koji su različiti ovisno o poglavju oboljele, govore o utjecaju genetskih predispozicija CNS-a same osobe za podložnost napadu autoimunih stanica. Tako se postavlja pitanje o mogućnosti postojanja različitih uzroka bolesti budući da je i sam mehanizam upalne demijelinizacije drugačiji u skupini ljudi oboljelih od MS. U jednoj analizi blizanaca oboljelih od MS tijek bolesti može biti izrazito različit što svjedoči o ulozi okolišnih imunih faktora u njenom razvitku (Johnston i Joy, 2003; Lassmann, 2005).



**Slika 2.** Oblici multiple skleroze s obzirom na progresiju bolesti u vremenu. (Preuzeto i prilagođeno iz Johnston i Joy, 2003)

### 3. ETIOLOGIJA MULTIPLE SKLEROZE

Multipla skleroza se smatra autoimunosnom upalnom bolešću u koja je uzrokovana s više međusobno neisključivih imbenika, kao što su okolišni i infektivni imbenici u genetski predisponiranim pojedincima. Većina ljudi ima u krvotoku i perifernom limfnom sustavu potencijalno autoreaktivne limfocite s receptorima specifičnim za vlastite antigene koji su normalno zaštićeni od kontakta s limfocitima (kao što su antigeni CNS-a), ali su takvi limfociti u zdrave osobe "obuzdani" nekim od mehanizama njihove supresije, primjerice pomoći u regulatornih T limfocita (Gold i sur., 2006). Tako je pokazano da autoreaktivni, zabranjeni pomagaju ki limfociti T<sub>H</sub> s receptorom specifičnim za potencijalni autoantigen u MS, mijelinski bazi ni protein, postoje podjednako u zdravim osobama i osobama oboljelim od multiple skleroze, ali je razlika u tome što su kod oboljelih ti limfociti senzibilizirani na autoantigen i mogu prodrijeti kroz krvno moždanu barijeru (Donati i Jacobson, 2002). Ne zna

se to no na koji su autoantigen senzibilizirani autoreaktivni limfociti T<sub>H</sub>1 (glavni posrednici napada na mijelin), no potencijalni kandidati za autoantigen su ve spomenuti mijelinski bazi ni protein (MBP) i drugi proteini mijelina – proteolipidni protein (PLP), glikoprotein mijelina (MAG) i mijelinski oligodendrocitski glikoprotein (MOG).

Pitanje uzroka multiple skleroze je zapravo pitanje na ina aktivacije autoreaktivnih limfocita, naravno uzimaju i u obzir da je osoba genetski predisponirana. Predloženo je nekoliko mogu ih mehanizama koji okidaju autoimunu reakciju na mijelin: molekularna mimikrija, aktivacija promatra a (engl. *bystander activation*) i širenje epitopa, te prisustvo superantigena (Johnston i Joy, 2003). Molekularna mimikrija je mehanizam kojim bi neki infektivni agent (virus ili bakterija) mogao uzrokovati imunosnu križnu reakciju s mijelinskim proteinima. Naime, do molekularne mimikrije dolazi ukoliko je neki bakterijski ili virusni epitop sli an nekom vlastitome epitopu; nakon infekcije takvim patogenom do e do razvoja specifi ne imunoreakcije, odnosno do nastanka senzibiliziranih limfocita specifi nih za epitop patogena, ali i za vlastiti epitop koji mu nalikuje. U prilog molekularnoj mimikriji govori pokazana reaktivnost klonova limfocita T specifi nih za mijelinski bazi ni protein prema nekim peptidima karakteristi nim za grupu herpesvirusa (*Epstein-Barrov virus*, *Herpes simplex virus*, citomegalovirus, virus gripe, papilomavirus) (Lassmann, 2005). Drugi mogu i na in na koji bi infekcija patogenom bila okida autoimunosti u MS je tzv. aktivacija promatra a. Nakon infekcije virusom dolazi do pokretanja specifi ne imunoreakcije koja uklju uje proizvodnju brojnih citokina i kemokina, mogu e ošte enje normalnog tkiva pri upalnoj reakciji s posljedicom otkrivanja ina e skrivenih autoantigena (kao što su antigeni CNS-a) ili pak može do i do ekspresije doma inskih ina e utišanih gena. Ovakvi doga aji zatim mogu izazvati aktivaciju "promatra kih" limfocita specifi nih za izloženi autoantigen što vodi upalnoj autoimunoj reakciji na mijelin uz posljedi no neprestano otkrivanje novih epitopa autoantigena rezultiraju i aktivacijom i drugih limfocita i progresijom bolesti (takožvano širenje epitopa). Ovakav mehanizam predložen je za nastanak brojnih autoimunih bolesti. U literaturi se spominje i prisustvo superantigena kao mogu eg okida a MS-e koji nespecifi no aktivira oko 15% svih prisutnih pomaga kih T limfocita, a time i potencijalne autoreaktivne klonove (Johnston i Joy, 2003; Lassmann, 2005).

Uzimaju i u obzir heterogenost oblika multiple skleroze javio se i koncept multiple skleroze kao bolesti s heterogenim etiološkim mehanizmima koji predlaže da razli iti procesi – ili autoimunost ili povremeno manifestirana virusna infekcija - mogu biti njenim uzrokom u pojedinih osoba. Ovakvom konceptu u prilog ide istraživanje koje je pokazalo da su mehanizam demijelinizacije i cilj ošte enja (mijelinska ovojnica ili oligodendrociti) razli iti u

oboljelih (Lucchinetti i sur., 2000). Naime, na eno je da postoje etiri razli ita uzorka demijelinizacije (iako sa zajedni kom karakteristikom infiltriranih T limfocita, makrofaga i aktiviranih mikroglija stanica). Pregled karakteristika ova etiri razli ita uzorka demijelinizacije su u Tablici 1. Uzorak demijelinizacije bio je isti za sve aktivne lezije oboljele osobe, no ispitivani oboljeni nisu bili u istom stupnju progresije bolesti. Uzorak 2 govori o ulozi humoralne imunosti u dijela oboljelih.

**Tablica 1.** Karakteristike etiri uzorka demijelinizacije aktivnih lezija u MS.

uzorak demijelinizacije	karakteristike aktivne lezije
Uzorak 1	perivenска distribucija lezija, cilj ošte enja : mijelin, infiltrirani T limfociti i aktivirani makrofagi, aktivirane mikroglija stanice
Uzorak 2	perivenска distribucija lezija, cilj ošte enja : mijelin, infiltrirani T limfociti i makrofagi, aktivirane mikroglija stanice, depozit IgG i C9 komponente komplementa
Uzorak 3	djelomi no o uvani mijelin uz upaljenu žilu; ošte enje na rubovima lezije, cilj ošte enja : oligodendrociti (znakovi apoptoze) i mijelin, osobiti gubitak MAG (glikoprotein mijelina), a ne drugih mijelinskih proteina, infiltrirani T limfociti i makrofagi, aktivirane mikroglija stanice
Uzorak 4	perivenска distribucija lezija, cilj ošte enja : mijelin i oligodendrociti, gubitak više mijelinskih proteina (MAG, MBP, PLP, MOG), infiltrirani T limfociti i makrofagi, aktivirane mikroglija stanice

(Prilago eno iz Lucchinetti i sur., 2000.)

Zaklju ak ovih saznanja je da terapija koja bi lije ila bolest u jedne osobe, ne mora nužno pomo i drugoj oboljeloj osobi te da uspješnost terapije ovisi i o stupnju progresije bolesti. Dakle, potrebno je prilaziti istraživanjima terapijskih strategija s naglaskom na individualnost oboljelog, odnosno razli itost kojom se bolest manifestira što dakako dodatno komplikira pronalazak zadovoljavaju e terapije za lije enje.

### 3.1. Genetske predispozicije

Multipla skleroza nije nasljedna bolest u klasi nom smislu budu i da se ne prenosi s jedne generacije na drugu, ali postoji odre ena nasljedna sklonost razvijanju bolesti. Pove ani

rizik za razvoj bolesti imaju lani obitelji oboljele osobe, iako 80% oboljelih nema bližeg ili daljeg lana obitelji pogo enog multiplom sklerozom. Vjerojatnost pojavnosti MS u jednoj anih blizanaca je 25-30% što svjedo i o kompleksnoj ulozi gena u javljanju bolesti (Demarin i sur., 2000). Dosadašnja geneti ka istraživanja su pokazala da geneti koj podložnosti pojedinca za MS pridonosi više gena (nisu još svi utvr eni), svaki umjerenim efektom, s time da se ne radi o mutiranim, defektnim genima, ve normalnim varijantama odre enih gena (odre enim alelima) (Hafler i sur., 2007). U više istraživanja pretraživanja genoma obitelji sjevernoeuropejske pripadnosti pogo enih MS pokazano je da je genetska regija povezana s podložnoš u za razvoj bolesti HLA-II (engl. *human leukocyte antigen*) lokus koji se nalazi na kra em kraku kromosoma 6. Pokazano je da je najvažniji gen toga lokusa koji pridonosi podložnosti za multiplu sklerozu HLA-DR2 gen. Taj gen je jedna od varijanti gena za lanac HLA-DR molekule (MHC-II molekule) prisutan u dijelu ljudske populacije, a vjerojatnost razvika multiple skleroze u osobe koja ga posjeduje je 1/250. Budu i da taj gen kodira za molekul koja je antigen prezentiraju a, napravljene su kristalografske studije kako bi se utvrdilo mogu e postojanje nekovalentne biokemijske me ureakcije potencijalnog autoantigena, mijelinskog bazi nog proteina, s antigen-vezuju om domenom HLA-DR2. Istraživanja su pokazale da aminokiseline 89-98 mijelinskog bazi nog peptida "sjedaju" u hidrofobni džep antigen-vezuju e domene HLA-DR2, omogu avaju i predo avanje ovog antiga limfocitima T u ovako genetski predisponiranoj osobi (Johnston i Joy, 2003). Ovdje postoji geneti ki prilog konceptu multiple skleroze kao bolesti s heterogenom patologijom, budu i da postoje istraživanja koja pokazuju odsustvo HLA-DR2 alela u nekih oboljelih, i štoviše, u oboljelih koji pripadaju odre enim etni kim grupama (takozvana "azijska" multipla sklerozu nije povezana s HLA-DR2 alemom).

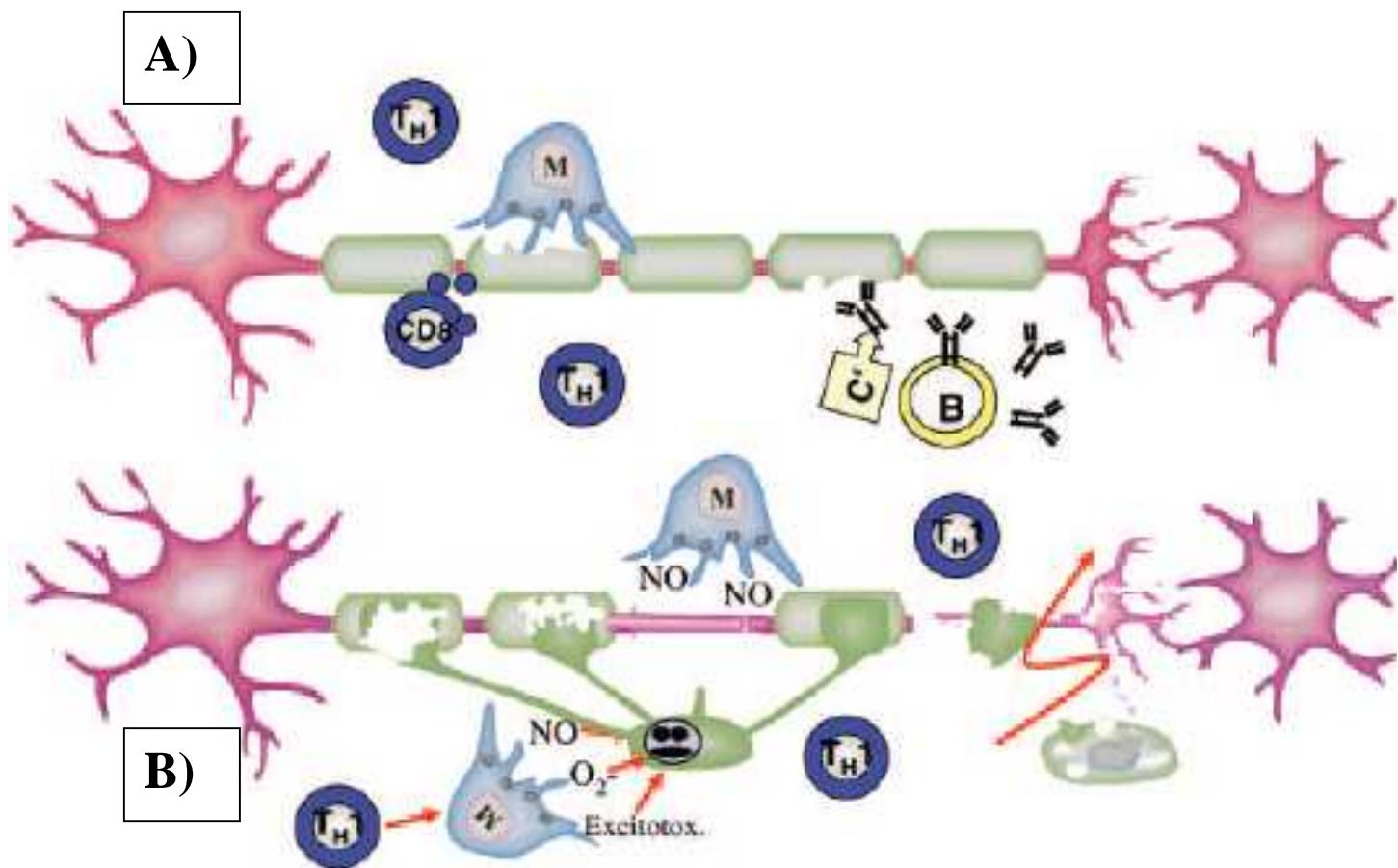
U novijim istraživanjima pokazano je da su i odre ene alelne forme gena za  $\alpha$  lanac receptora za interleukin 2 (IL-2RA) i receptora za interleukin 7 (IL-7RA) tako er povezane s podložnoš u pojedinca za razvoj multiple skleroze, iako s manjim u inkom u odnosu na HLA-DR2 gen (Hafler i sur., 2007). Uloge ovih alelnih formi u razvoju bolesti još moraju biti istražene.

Prou avaju i literaturu, jasno je da je nedovoljno istražena veza izme u razli itih klini kih oblika MS i gena za podložnost razvoju bolesti, kao i mogu a veza specifi nih gena koji bi ušli u me ureakciju s okida em multiple skleroze, što bi svakako trebao biti jedan od ciljeva dalnjih istraživanja.

#### 4. MEHANIZAM OŠTE ENJA CNS-a (MIJELINA, OLIGODENDROCITA I AKSONA) U MULTIPLOJ SKLEROZI

Mnoga saznanja o mehanizmu nastanka ošte enja CNS-a u multiploj sklerozi dolaze iz istraživanja na animalnom modelu izazvane autoimunosti - eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (kratica EAE), iako ta bolest ne odgovara patofiziološki u potpunosti multiploj sklerozi zbog velike heterogenosti pojavnosti MS-e, o emu je ve bilo rije i. Pokazano je da senzibilizacijom genetski podložnih miševa i štakora s nekim od mijelinskih proteina (MBP, MAG, MOG, PLP) u kompletном Freundovom adjuvansu dolazi do razvoja EAE s brojnim klini kim, neuropatološkim i imunološkim zna ajkama multiple skleroze. Mogu nost adoptivnog prijenosa bolesti iz EAE-životinje u zdravu životinju pokazala je da su glavni nosioci po etka i nastavka napada na mijelin u EAE autoreaktivni pomaga ki limfociti  $T_H$  (Gold i sur., 2006).

U multiploj sklerozi, svi uzorci (1-4) demijelinizacije u aktivnim lezijama sadržavali su infiltrirane T limfocite i makrofage (Lucchinetti i sur.), što je u sukladu s EAE modelom. U EAE modelu se prisustvo humoralne imunosti dobilo senzibilizacijom genetski podložne životinje s mijelinskim oligodendrocitskim glikoproteinom (MOG) koji je dakle, uz pojavu senzibiliziranih T stanica, izazvao i pojavu protutijela koja su pridonijela ozbiljnijoj demijelinizaciji u CNS-u senzibiliziranih životinja (Gold i sur., 2006). Doprinos demijelinizaciji od strane protutijela koja se vežu na oligodendrocite i mijelin u upalnoj akutnoj leziji daju uobi ajeni mehanizmi imunosnih reakcija posredovanih protutijelima: poja ana fagocitoza od strane infiltriranih aktiviranih makrofaga, poticanje stani ne citotoksi nosti posredovane protutijelima te aktivacija komplementa (što tako er doprinosi fagocitozi zbog nastanka opsoninskih ulomaka, osloba a kemotakti ke ulomke komplementa što privla i druge imunosne stanice, osloba a ulomke komplementa koji doprinose dalnjem razvoju upalne reakcije). Takav model EAE u sukladu je s uzorkom 2 demijelinizacije u MS (Lucchinetti i sur.), a dokazi iz imunopatoloških istraživanja pokazuju da su mehanizmi ovisni o protutijelima i komplementu uklju eni u oko 60% slu ajeva multiple skleroze. Tako er se u brojnim lezijama esto nalazi obimno prisustvo CD8+ citotoksi nih limfocita koji bi mogli doprinositi ošte enju citotoksi nom reakcijom ovisnoj o perforinima i granzimima u direktnoj me ureakciji s autoantigenom mijelina izloženim preko MHC - I molekule (Gold i sur., 2006). Slika 3 pokazuje mogu e izvršne mehanizme od strane infiltriranih imunokompetentnih stanica koji rezultiraju ošte enjem u CNS-u.



**Slika 3.** Mogući mehanizmi razaranja u aktivnoj leziji CNS-a. (Preuzeto i prilagođeno iz Gold i sur., 2006)

Kratice:  $T_{H1}$  - pomagaći autoreaktivni T limfocit, M – makrofag, CD8 – citotoksični autoreaktivni T limfocit, B - B limfocit, C – aktiviranje komplementa, NO - dušikov oksid (citotoksin)

A) Na slici je prikazan lijevo citotoksični napad autoreaktivnih CD8+ T limfocita na mijelin u reakciji ovisnoj o perforinima i granzimima (u direktnoj i ne direktnoj reakciji), fagocitoza mijelina od strane aktiviranih makrofaga, a desno na slici vezanje autoprotutijela na mijelin i posljedična aktivacija komplementa.

B) Na slici je prikazano oštećenje oligodendrocita, mijelina i aksona sa citotoksimnim proizvodima aktiviranih makrofaga (aktiviraju ih autoreaktivni pomagaći limfociti  $T_{H1}$ ); glavni kandidati za citotoksinne proizvode koji izazivaju oštećenje su reaktivni kisikovi i dušikovi radikali (superoksidni anion, dušikov oksid).

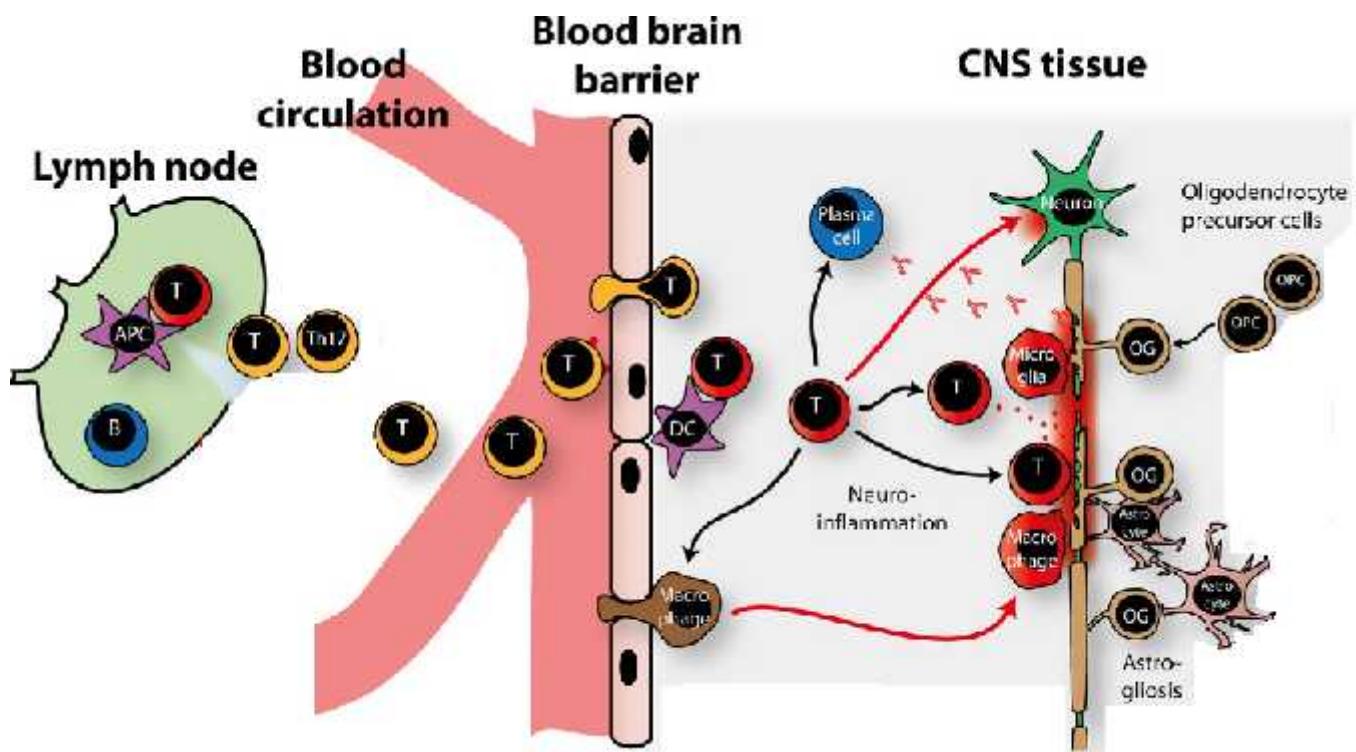
#### 4.1. Indukcijska i efektorska faza autoimune reakcije u EAE/MS

Uz već nabrojane načine moguće aktivacije autoreaktivnih limfocita T u poglavljima o etiologiji multiple skleroze, postoje indikacije da bi se aktivacija autoreaktivnih limfocita koji normalno postoje u ljudi mogla dogoditi u oboljelih zbog poremećene funkcije regulatornih limfocita koji više ne obuzdavaju postojeće autoreaktivne limfocite (Gold i sur., 2006). U EAE modelu je pomoć u razvijenih tehnikama za prvu enje migracije stanica otkriven daljnji tijek događaja nakon aktivacije autoreaktivnih  $T_H$  limfocita, a pretpostavlja se da je takav slijed događaja uvelike sličan i u multiploj sklerozi.

Nakon adoptivnog transfera T limfocita iz EAE životinje u zdravu životinju ili senzibilizacije životinje s nekim mijelinskim antigenom dolazi do indukcije bolesti u dvije faze, a to su inicijacijska i efektorska (izvršna) faza. U inicijacijskoj fazi dolazi do predavanja mijelinskih antigena specifičnim pomagkim limfocitima  $T_H$  pomoći u antigen preduzim stanicama u sekundarnim limfatičkim organima, s posljedičnom aktivacijom i ekspanzijom  $T_{H1}$  i / ili  $T_{H17}$  pomagkih limfocita (Zepp i sur., 2011). Uloga pomagkih  $T_{H1}$  limfocita u razvoju MS je poznata od za etaka istraživanja mehanizma ove bolesti, dok je uloga nove podskupine pomagkih limfocita  $T_{H17}$  u posljednje vrijeme privukla veliku pozornost zbog mogućnosti patogene uloge u autoimunim upalnim bolestima, među kojima je i MS. Prilog  $T_{H17}$  stanica razvoju upalne reakcije daju citokini koje te stanice izlazu, prvenstveno interleukin 17 (IL-17A), ali i IL-17F, IL-21, IL-22. Razine proučavnog citokina interleukina 17 povišene su u nizu autoimunih bolesti (kao što su MS, reumatoидни artritis, psorijaza), a njegov u inak je aktivacija različitih gena u fibroblastima, endotelijalnim stanicama, makrofagima, epitelnim stanicama i astrocitima koji genski proizvodi pridonose razvoju upale u efektorskoj fazi same bolesti, nakon što je već došlo do infiltracije aktiviranih limfocita  $T_{H17}$  u CNS. Tako je u moždanom deblu živog anesteziranog EAE miša pomoć u dvofotonske mikroskopije otkriven direktni kontakt neurona i  $T_{H17}$  limfocita u demijelinacijskim lezijama koje su imale izraženu ozljedu aksona. Takva međureakcija vodi do povrednog protoka unutarstanih nog kalcija u neuronima i posljedične neuronske štete (Zepp i sur., 2011). O mehanizmima oštete enja aksona bit će još riječi i kasnije.

Nakon ekspanzije autoreaktivnih  $T_H$  limfocita u sekundarnim limfnim organima, dolazi do njihovog probijanja krvno-moždane barijere što je detaljnije opisano u sljedećem potpoglavlju 4.1.1. Nakon prelaska krvno-moždane barijere zbiva se reaktivacija  $T_H$  limfocita u perivaskularnom prostoru pomoći u međureakcije s lokalnim antigenom predutim stanicama CNS-a, makrofagima i mikroglija stanicama. Ta reaktivacija  $T_H$  limfocita rezultira izlazu enjem

proupalnih citokina i posljedi nom aktivacijom makrofaga i mikroglija stanica (tako er izlu uju proupalne citokine poput TNF- $\alpha$ , kemokine, matriks metaloproteinaze, citotoksine, razli ite proteaze, reaktivne radikale dušika i kisika) što je jaki poticaj za dalnje ošte enje krvno-moždane barijere i nova enja drugih leukocita kroz ve probijenu barijeru (Gold i sur., 2006). Veliki broj aktiviranih  $T_H$  stanica i drugih proupalnih stanica migrira dublje u bijelu tvar mozga što rezultira nastankom upalne lezije, odnosno dolazi do demijelinizacije, ošte enja aksona i oligodendrocita od strane imunokompetentnih stanica. Shematski prikaz ovog slijeda doga aja prikazan je Slikom 4.



**Slika 4.** Model indukcijske i efektorske faze u EAE/ MS. (Preuzeto i prilago eno iz Ingwersen i sur., 2011)

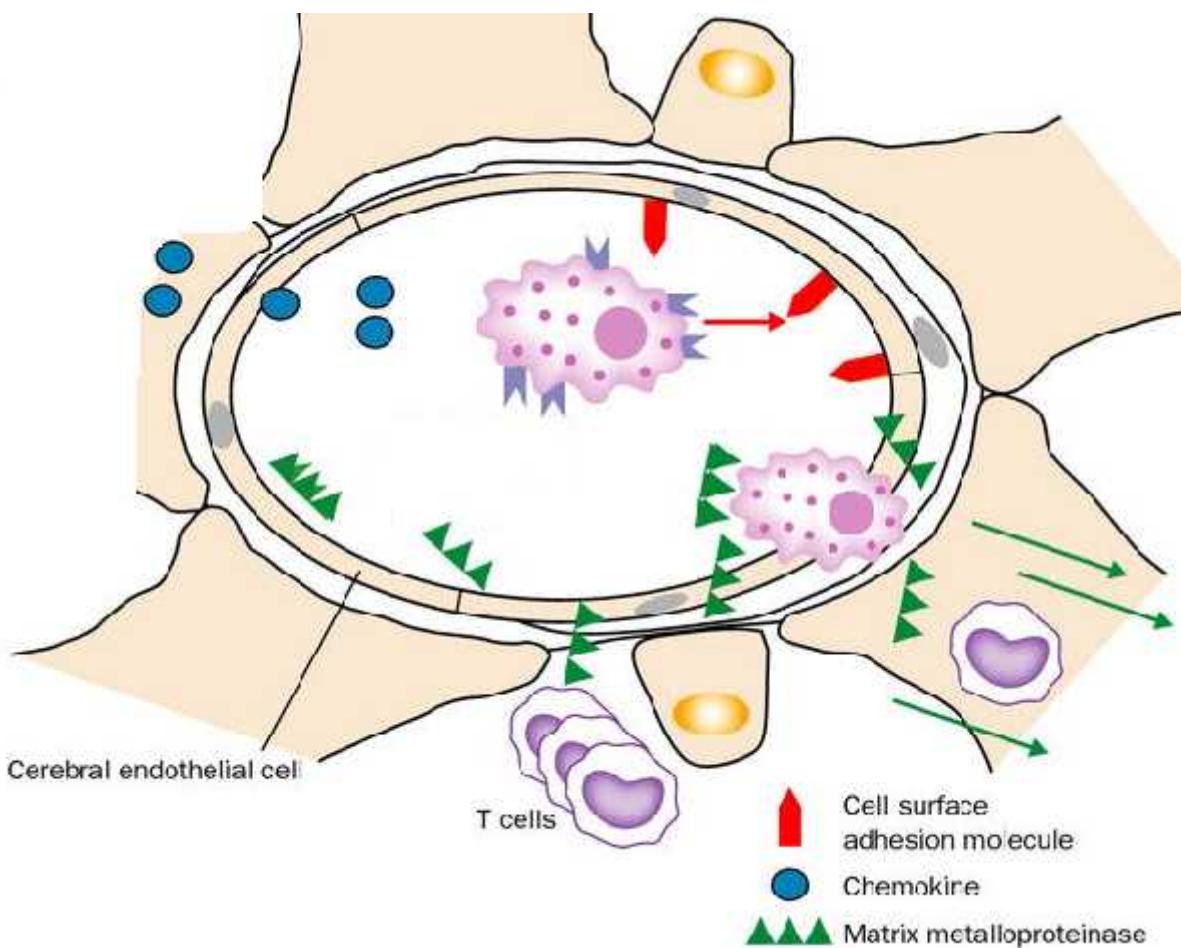
Kratice: APC – antigen predu na stanica, T – autoreaktivni pomaga ki limfocit T, DC - lokalna predu na stanica, OPC - prekursorska stanica oligodendrocita, OG – oligodendrocyt

#### 4.1.1. Probijanje krvno-moždane barijere

Budući da postoji restrikcija kretanja leukocita iz krvi u neka mesta u ljudskom organizmu, poput CNS-a, oka i testisa, takva se mesta smatraju imunoprivilegiranim. CNS je imunoprivilegirano mjesto zbog postojanja takozvane krvno-moždane barijere koju ine specijalno građene kapilare koje ograničavaju prijelaz krvnih stanica i razmjenu topljivih molekula između krvi i tkiva mozga. Topljive tvari prenose se iz krvi u mozak transportom pomoću transporteru na endotelnim stanicama krvno-moždane barijere. Endotelne stanice krvno-moždane barijere nisu fenestrirane, ne prenose tvari pinocitozom, a među usobno su vrsto povezane pomoću proteina vrstih spojeva (engl. *tight junctions proteins*, TJs) i proteina za adherenciju (engl. *adherens junctions proteins*, AJs) čime se uvelike smanjuje paracelularna propusnost. Proteine vrstih spojeva i makromolekularni kompleksi transmembranskih proteina koji povezuju bliskom međureakcijom dvije susjedne endotelne stanice. U te proteine spadaju kladini, okludini, spojne adhezijske molekule te adaptorne molekule koje ih usidruju u membranama stanica: zona okludens 1, 2 i 3, cingulin, serin-protein kinaza ovisna o kalciju. Endotelne stanice krvno-moždane barijere okružene su i poduprte stanicama pericitima te bazalnom membranom gdje vanstani matriks i laminin 8 i 10, kolagen tipa IV i drugi proteini. Iza ove bazalne membrane nalazi se maleni perivaskularni prostor, a zatim je prisutna bazalna membrana moždanog parenhima koja je obložena nožnim završecima stanica astrocita koje pomažu u održavanju cjelovitosti krvno-moždane barijere te sprječavaju prođor imunosnih stanica otpuštajući brojne topljive imbenike koji djeluju imunosupresivno, poput citokina TGF- $\beta$  (Larochelle i sur., 2011).

U MS, aktivirani leukociti (autoreaktivni limfociti T, monociti, makrofagi) "probijaju" krvno-moždanu barijeru izlučujući proupalni citokini i drugih topljivih imbenika poput matriks metaloproteaze i reaktivnih radikala kisika koji mogu narušiti vrste spojeve među stanicama, promjeniti proteine bazalnih membrana te direktno ili indirektno djelovati na endotelne stanice krvno-moždane barijere potiskujući ih na proizvodnju kemokina i adhezijskih molekula (engl. *cell adhesion molecules*, CAMs) koji omogućuju privlačenje, vezanje i dijapetelu aktiviranih leukocita iz krvi u parenhim mozga. Takođe, stanice mozga poput astrocita, mikroglia stanica i neurona aktivirane upalnim proizvodima infiltriraju ih leukociti takođe otpuštajući citokine koji utječu na ekspresiju gena za kemokine i stani ne adhezijske molekule (CAMs) u endotelnim stanicama krvno-moždane barijere što dodatno pridonosi novom uvođenju leukocita iz krvi i probijanju barijere (Larochelle i sur., 2011). Bitno je napomenuti da unatoč tome što se CNS smatra imunoprivilegiranim mjestom, infiltracija aktiviranih

leukocita u CNS se događa i za slučaj infekcije mozga nekim virusom, a i za popravak oštećenja u CNS-u što objašnjava navedenu sposobnu lokalnih stanica mozga da odgovore na citokinsku signalizaciju infiltriraju ih leukocita tako da potpomažu daljnje probijanje krvno-moždane barijere. Slika 5 prikazuje prijelaz imunosnih stanica preko krvno-moždane barijere. U Tablici 2 navedeni su istraženi učinci citokina i drugih topljivih molekula izlučenih od strane infiltriraju ih leukocita i stanica mozga koji utječu na probijanje krvno-moždane barijere u ljudi oboljelih od MS-e (razine navedenih molekula povišene su u serumu oboljelih, osobito tijekom relapsa).



**Slika 5.** Prijelaz imunosnih stanica preko krvno-moždane barijere. (Preuzeto i prilagođeno iz [www.mult-sclerosis.org](http://www.mult-sclerosis.org))

**Tablica 2.** U inak topljivih imbenika na probijanje krvno-moždane barijere.

topljivi faktor	izvor	cilj	u inak
<b>Citokin TNF-<math>\tau</math></b>	aktivirani leukociti, aktivirani mikroglija	endotelne stanice krvno-moždane barijere (BBB-ECs), periciti	indirektno smanjuje ekspresiju TJ proteina, poveava lu enje kemokina CCL2, CCL5, CXCL8, CKCL9, inducira ekspresiju CAMs (ICAM-1, VCAM-1, MCAM, E i P selektina), indukcija sinteze citokinskih receptora
<b>Citokin IFN-<math>\tilde{\alpha}</math></b>	aktivirani leukociti	BBB-ECs, periciti, astrociti	lu enje kemokina CCL2, CCL5, CXCL8, CKCL9, ekspresija CAMs, indukcija sinteze citokinskih receptora
<b>Citokin onkostatin M</b>	aktivirani leukociti, aktivirani mikroglija i astrociti	BBB-ECs	lu enje IL-6, kemokina CCL2, ekspresija ICAM-1
		mikroglija	lu enje TNF- $\alpha$ i inducibilna sinteza dušikovog oksida (NO)
<b>Citokin IL-17A</b>	aktivirani T <sub>H</sub> 17 limfociti	BBB-ECs	lu enje IL-6, kemokina CCL2, CXCL8, aktivacija NADPH oksidaze (sinteza ROS), smanjenje ekspresije TJ proteina
		mikroglija	lu enje IL-6, kemokina CCL2
		astrociti	lu enje IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-12, kemokina CCL2 i drugi, sinteza dušikova oksida
<b>Citokin IL-1<math>\alpha</math></b>	makrofagi	BBB-ECs	smanjenje ekspresije TJ proteina, proliferacija endotelnih stanica
<b>Reaktivni kisikovi i dušikovi radikali (ROS, RNS)</b>	aktivirani leukociti, aktivirani mikroglija i astrociti	BBB-ECs	ošte enje TJ proteina, inducira ekspresiju CAMs (ICAM-1, VCAM-1)
		oligodendrocyti	indukcija apoptoze i demijelinizacije
<b>Matriks metaloproteinaze</b>	aktivirani leukociti, aktivirani mikroglija	BBB-ECs	razgradnja TJ proteina, indukcija kemokina, citokina i CAMs

(Preuzeto iz Larochelle i sur., 2011)

#### 4.2. Mehanizam ozljede neurona i aksona u MS

U kompleksnoj bolesti kao što je MS više mehanizama djeluje, u manjoj ili većoj mjeri, na neurodegenerativno oštećenje. Iako je fokus stavljen na MS kao demijelinacijsku bolest, u svim demijelinacijskim lezijama - a i drugdje u neoštećenoj bijeloj i sivoj tvari mozga osobe s aktivnom upalom - prisutno je oštećenje aksona i tijela neurona. Upravo zbog aksonske ozljede dolazi do trajne kliničke nesposobnosti oboljelog, odnosno progresivnog oblika bolesti. Uzimajući u obzir razlike na one na koje bi imunosne stanice infiltrirane u mozak mogle prouzročiti aksonsku ozljedu (Slika 3), smatra se da ipak najveću ulogu u tome imaju aktivirani makrofagi i mikroglija stanice budući da se redovito mogu otkriti u neposrednoj blizini ozljećenih aksona (Lassmann, 2010). Aktivirani makrofagi i mikroglija luče brojne citotoksične molekule, među njima kisikove i dušikove radikale koji su odgovorni za intenzivnu oksidativnu štetu proteina, lipida i DNA u oligodendrocitima i neuronima (Haider i sur., 2011). Budući da je otkriven i poremećaj funkcije mitohondrija u lezijama, smatra se da bi mehanizam ozljede aksona mogao biti slijedeći: oksidacija osjetljivih mitohondrijskih proteina dovodi do mitohondrijske disfunkcije s posljedicom nedostatka ATP-a što uzrokuje nenormalnu raspodjelu iona izvan i unutar stanice koja se normalno održava pomoću pumpi za koji je rad potreban ATP. Stoga, dolazi do povišenja unutarstanih noga  $\text{Ca}^{2+}$  što aktivira proteaze ovisne o kalciju koje cijepaju mikrotubule i neurofilamente što napoljetku dovodi do ugradnje nekih ionskih kanala na kriva mjesta - na primjer,  $\text{Ca}^{2+}$  kanali regulirani naponom postaju ugrađeni lokalno na aksonsku membranu umjesto u sinapsu što dodatno povećava unutarstanih koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  s posljedicom propadanja aksona (Lassmann, 2010).

Ova saznanja govore o mogućem blagotvornom učinku liječenja MS antioksidansima, što bi svakako trebalo istražiti (podaci o takvoj terapiji još ne postoje).

## 5. ZAKLJU AK

Uzimaju i u obzir kompleksnost multiple skleroze - po pitanju uzroka, mehanizama ošte enja, posljedi nih simptoma i tijeka bolesti – mogu se razumjeti poteško e u istraživanju pronalaska odgovaraju e terapije za oboljele. Jasno je da istraživanju multiple skleroze treba pri i s naglaskom na razli itu manifestaciju bolesti u skupina oboljelih što bi pove alo vjerovatnost pronalaska uspješnog lije enja. Iako postoji lijek koji sprje avaju u nekih oboljelih daljnju progresiju bolesti, još uvijek ne postoji lijek koji bi je izlije io (zaustavio u progresivnoj fazi i vratio u stanje prije obolijevanja). Poteško e predstavlja i nepotpuna primjenjivost saznanja dobivenih na pokusnom animalnom modelu multiple skleroze, budu i da taj model ne odgovara u potpunosti ljudskoj multiploj sklerozi, ali je dosada ipak iznjedrio brojna korisna saznanja koja bi, uz daljnja istraživanja, mogla dovesti do primjenjivih neštetnih terapija. Strategija lije enja autoimunih bolesti nespecifi nom imunosupresivnom terapijom (npr. kortikosteroidima) je nezadovoljavaju a jer nije usmjerena na "problemati ne" stanice, ve suprimira cjelokupni imunološki sustav oboljelog. Dakle, meta lije enja bi svakako trebala biti neka to ka u slijedu doga aja od skretanja autoreaktivnih stanica na patogeni put što naglašava važnost znanja o mehanizmu tijeka bolesti, odnosno naglašava važnost znanstvenih istraživanja o ovoj temi.

## 6. LITERATURA

Demarin V, Podobnik Šarkanji S, Supanac V, Bašić V, Bosnar M, Blažinić B. (2000) Kako živjeti s multiplom sklerozom. 3. izdanje, Duga Print, Zagreb

Donati D, Jacobson S. (2002) Viruses and Multiple Sclerosis. U: Polymicrobial Diseases. Brogden KA, Guthmiller JM. (editors). ASM Press, Washington, D.C., pp. 99-120.

Gold R, Linington C, Lassmann H. (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* **129**, 1953-1971. Review.

Govarts C, Somers K, Hupperts, Stinissen P, Somers V. (2007) Exploring cDNA phage display for autoantibody profiling in serum of multiple sclerosis patients: Optimization of the selection procedure. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1109**, 372-384.

Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, De Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. (2007) Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *The New England Journal of Medicine* **357**, 851-862.

Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. (2011) Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*, Article in Press.

Ingwersen J, Aktas O, Kuery P, Kieseier B, Boyko A, Hartung HP. (2011) Fingolimod in multiple sclerosis: Mechanisms of action and clinical efficacy. *Clinical Immunology*, Article in Press. Review.

Johnston RB, Joy JE. (2003) Multiple sclerosis: Current status and strategies for the future. 1<sup>st</sup> ed. National academy press, Washington, D.C.

Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. (2011) How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *FEBS Letters*, Article in Press. Review.

Lassmann H. (2010) Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: What have we learnt from animal models. *Experimental Neurology* **225**, 2-8. Review.

Lassmann H. (2005) Mechanisms of multiple sclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* **2**, 447-452. Review.

Lucchinetti C, Bruck w, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. (2000) Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Annals of Neurology* **47**, 707-717.

Zepf J, Wu L, Li X. (2011) IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends in Immunology* **32**, 232-239. Review.

<http://www.mult-sclerosis.org>

## 7. SAŽETAK

Multipla skleroza je upalna demijelinizacijska bolest središnjeg živ anog sustava (CNS-a) ija je glavna manifestacija nastanak lezija koje su rezultat gubitka mijelinske ovojnice oko aksona neurona, ali i ošte enja samih demijeliniziranih aksona. Lezije koje nastaju posljedica su djelovanja autoreaktivnih imunosnih stanica koje se infiltriraju u mozak prelaze i krvno moždanu barijeru, zbog ega se multipla skleroza smatra autoimunosnom boleš u. Uzrok bolesti je nepoznat, no prevladava mišljenje da je uzrokovana s više me usobno neisklju ivih imbenika, kao što su okolišni i infektivni imbenici u genetski predisponiranim pojedincima u kojih dolazi do aktivacije postoje ih autoreaktivnih pomaga kih limfocita T i njihovog posljedi nog patogenog djelovanja. Mnoga saznanja o mehanizmu nastanka ošte enja CNS-a u multiploj sklerozi dolaze iz istraživanja na animalnom modelu izazvane autoimunosti - eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa - koji ima brojne klini ke, neuropatološke i imunološke zna ajke multiple skleroze. Tako je pomo u tog modela pokazano da nakon ekspanzije autoreaktivnih  $T_H1$  i / ili  $T_H17$  limfocita u sekundarnim limfnim organima dolazi do njihovog probijanja krvno-moždane barijere izlu enjem proučnih citokina i drugih topljivih imbenika poput matriks metaloproteaza i reaktivnih radikala kisika. Tako er, stanice mozga aktivirane upalnim proizvodima infiltriraju ih leukocita tako er otpuštaju citokine koji dodatno pridonose nova enju leukocita iz krvi i probijanju barijere. Veliki broj aktiviranih  $T_H$  stanica i drugih proučnih stanica migrira dublje u bijelu tvar mozga što rezultira nastankom upalne lezije, odnosno dolazi do demijelinizacije, ali i ošte enja aksona i oligodendrocita. Smatra se da najve u ulogu u ozljedi aksona, s posljedi nim trajnim klini kim deficitom, imaju aktivirani makrofagi i mikroglija stanice koje izlu uju kisikove i dušikove radikale koji su odgovorni za intenzivnu oksidativnu štetu u lezijama oboljelih. Još uvijek ne postoji zadovoljavaju a terapija oboljelih, a meta lije enja bi svakako trebala biti neka to ka u slijedu doga aja od skretanja autoreaktivnih stanica na patogeni put što naglašava važnost znanja o mehanizmu tijeka bolesti.

## 8. SUMMARY

Multiple sclerosis is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) whose main manifestation is the formation of lesions that result from the loss of myelin sheath around the axons of neurons and damage of axons themselves. Lesions arise as a result of action of autoreactive immune cells that infiltrate the brain crossing the blood brain barrier, which is why multiple sclerosis is considered an autoimmune disease. The cause of the disease is unknown but the prevailing opinion is that it is caused by a number of mutually non-exclusive factors, such as environmental and infectious factors in genetically predisposed individuals in whom an activation of existing autoreactive helper T lymphocytes happens with their subsequent pathogenic actions. Many insights about the mechanism of CNS damage in multiple sclerosis come from an animal model of induced autoimmunity - experimental autoimmune encephalomyelitis - which has many clinical, neuropathological and immunological features of multiple sclerosis. This model demonstrated that the activation and expansion of autoreactive  $T_{H}1$  and / or  $T_{H}17$  lymphocytes in secondary lymphoid organs leads to breaking of the blood-brain barrier by secretion of proinflammatory cytokines and other soluble factors such as matrix metalloproteinases and reactive oxygen species. Also, the brain cells activated by inflammatory products of the infiltrating white blood cells release cytokines that further contribute to the recruitment of leukocytes from the blood and breaking of the blood-brain barrier. A large number of activated  $T_H$  cells and other proinflammatory cells migrate deeper into the white matter of the brain, resulting in the appearance of inflammatory lesions in which demyelination and damage to axons and oligodendrocytes occur. It is believed that activated macrophages and microglia cells which secrete oxygen and nitrogen radicals have the greatest role in axonal injury, which results with permanent clinical deficit. There is still no satisfactory treatment of multiple sclerosis; the target for treatment should be a point in the sequence of events from the turn of autoreactive cells in the pathogenic way and that comprehension highlights the importance of knowledge about the underlying disease mechanism.