

# Uloga B-stanica u etiopatogenezi i liječenju multiple skleroze

---

**Magovac, Tena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:908171>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-07**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Tena Magovac**

**Uloga B-stanica u etiopatogenezi i  
liječenju multiple skleroze**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2020.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za neurologiju KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr.sc. Tereze Gabelić, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019/2020.

## POPIS KRATICA

- ADCC – citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. antibody dependent cell cytotoxicity)
- ADEM – akutni diseminirani encefalomijelitis
- APC – antigen-prezentirajuća stanica (engl. antigen presenting cell)
- ARR – godišnja stopa relapsa (engl. annualized relapse rate)
- BAFF – aktivirajući faktor B-limfocita (engl. B cell activating factor)
- BBB – krvno-moždana barijera (engl. naziva blood-brain barrier)
- BCR – B-stanični receptor (engl. B cell receptor)
- CIS – klinički izolirani sindrom (engl. clinically isolated syndrome)
- CLL – kronična limfatična leukemija
- CDP – potvrđena progresija onesposobljenosti (engl. confirmed disability progression)
- CDR – regija koja određuje komplementarnost (engl. complementarity determining region)
- CHO – ovarij kineskog hrčka (engl. chinese hamster ovary)
- CSF – cerebrospinalni likvor (engl. cerebrospinal fluid)
- EAE – eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis
- EBER – engl. Epstein–Barr virus-encoded RNA
- EBV – Epstein-Barr virus
- EDSS – proširena ljestvica statusa onesposobljenosti (engl. expanded disability status scale)
- EMA – engl. European Medicines Agency
- FDA – engl. Food and Drug Administration
- FNG – fingolimod
- GA – glatiramer acetat
- HACA – ljudska anti-kimerna protutijela (engl. human anti-chimeric antibody)
- HR - omjer rizika (hazard ratio)
- IFN- $\beta$  – interferon beta

iv. – intravenski

MIF – faktor inhibicije migracije makrofaga (engl. macrophage migration inhibitory factor)

MOG – mijelin-oligodendrocitni glikoprotein (engl. myelin oligodendrocyte glycoprotein)

MR – magnetska rezonancija

MS – multipla skleroza

NAWM – bijela tvar normalnog izgleda (engl. normal appearing white matter)

NEDA 3 – bez znakova aktivnosti bolesti (No Evidence of Disease Activity)

NFL – neurofilament

NK – prirodno ubilačke (engl. natural killer)

NMO – optički neuromijelitis (engl. neuromyelitis optica)

NTZ – natalizumab

OCB – oligoklonalne trake (engl. oligoclonal bands)

OCR – okrelizumab

OMB157 – ofatumumab

PPMS – primarno progresivna multipla skleroza

RA – reumatoidni artritis

RRMS – relapsno-remitirajuća multipla skleroza

RTX – rituksimab

sc. – supkutani

SPMS – sekundarno progresivna multipla skleroza

SŽS – središnji živčani sustav

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

TFM – teriflunomid

## SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD .....	1
2. B-STANICE .....	2
3. B-STANIČNA NIŠA.....	3
4. FUNKCIJE B-STANICA U AUTOIMUNOSNOJ BOLESTI .....	5
4.1 STVARANJE AUTOANTITIJELA I IDENTIFIKACIJA CILJNIH ANTIGENA .....	6
4.2 PREZENTACIJA ANTIGENA I REGULACIJA CITOKINSKE SEKRECIJE .....	8
4.3 FORMACIJA EKTOPIČNIH LIMFOIDNIH STRUKTURA.....	10
5. MENINGEALNA INFLAMACIJA U KORTIKALNOJ PATOLOGIJI SEKUNDARNO- PROGRESIVNE MULTIPLE SKLEROZE.....	11
4.2 ULOGA B-STANICA U RAZVOJU PATOLOGIJE KORTEKSA .....	12
4.2 DETEKCIJA STANICA INFICIRANIH EPSTEIN-BARR VIRUSOM .....	15
6. POREMEĆAJI PERIFERNE TOLERANCIJE B-STANICA.....	16
7. B-STANICA U EKSPERIMENTALNOM MODELU AUTOIMUNOSNOG ENCEFALOMIJELITISA .....	17
8. MONOKLONSKA PROTUTIJELA .....	18
8.1 VRSTE MONOKLONSKIH PROTUTIJELA .....	19
9. ANTI-CD20 MONOKLONSKA PROTUTIJELA.....	20
9.1 MEHANIZMI DJELOVANJA ANTI-CD20 MONOKLONSKIH PROTUTIJELA .....	21
10. PREDSTAVNICI ANTI-CD20 MONOKLONSKIH PROTUTIJELA.....	22
10.1 RITUKSIMAB .....	23
10.1.1 SIGURNOST I TOLERANCIJA .....	26
10.1.2 USPOREDBA S DRUGIM LIJEKOVIMA KOJI MODIFICIRAJU TIJEK BOLESTI .....	28
10.2 OKRELIZUMAB .....	29
10.2.1 SIGURNOST I TOLERANCIJA .....	32
10.3 OFATUMUMAB.....	33

10.4 UBLITUKSIMAB.....	35
<b>11. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>37</b>
<b>12. ZAHVALE.....</b>	<b>38</b>
<b>13. LITERATURA.....</b>	<b>39</b>
<b>14. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>43</b>

## **SAŽETAK**

Naslova rada: Uloga B stanica u etiopatogenezi i liječenju multiple skleroze

Autor: Tena Magovac

Multipla skleroza je tradicionalno bila smatrana bolešću posredovanoj T-stanicama. Imunomodulacijska terapija razvijena na ovoj osnovi utječe na smanjenje stope relapsa, ali ne može u potpunosti spriječiti pojavu relapsa i progresiju invalidnosti, te je uglavnom zanemarive djelotvornosti u primarno progresivnom obliku multiple skleroze.

B-stanice ključna su sastavnica u patogenezi autoimunih neuroloških poremećaja i imaju važnu ulogu u regulaciji procesa aktivacije T-stanica, sekrecije citokina i stvaranja ektopičnih germinalnih centara u središnjem živčanom sustavu. Meningealne B-stanične strukture koje nalikuju germinalnim centrima važno su mjesto aktivacije B-stanica i njihova širenja u kroničnoj bolesti.

Nakon prelaska krvno-moždane barijere, memorijske B-stanice podložne su stimulaciji antigenima, klonalnoj ekspanziji i diferencijaciji u plazma stanice koje izlučuju protutijela. Osim što je ciljni organ imunopatološkog procesa, središnji živčani sustav (SŽS) u bolesnika s neuroinflamacijom pruža jedinstvenu okolinu koja podržava dugotrajno preživljenje B-stanične linije, osobito dugoživućih plazma stanica te lokalno stvaranje protutijela.

Koncept deplecije B-stanica monoklonskim protutijelima koja prepoznaju specifični ciljni CD20 antigen predstavlja potentno terapijsko rješenje, sa snažnim učinkom na progresiju bolesti i dokazanom učinkovitošću u primarno progresivnom obliku bolesti za koji do sada nije nađena adekvatna terapije. Klinička istraživanja nedvojbeno su pokazala da anti-CD20 monoklonska protutijela dovode do brze i trajne supresije upalne aktivnosti bolesti čak i nakon rekonstitucije B-stanica. Zabilježeno je smanjenje broja i stvaranja novih lezija SŽS-a i pridruženih kliničkih relapsa te je smanjena progresija onesposobljenosti. Osim toga, ranije uvođenje terapije može odgoditi razvoj progresivnih oblika bolesti. Terapija dodatno pokazuje obećavajući učinak u bolesnika s primarno progresivnim oblikom bolesti u kojih se primjećuje značajno i produženo smanjenje progresije invalidnosti. Sigurnosni profil se s obzirom na dosadašnja ispitivanja čini povoljnim, međutim potrebno je dugotrajno praćenje kako bi se utvrdio rizik od neželjenih nuspojava, uključujući povećanu podložnost infekcijama ili povećan rizik obolijevanja od malignih bolesti.

Ključne riječi: multipla skleroza, B-stanice, anti-CD20 monoklonska protutijela

## **SUMMARY**



## **SUMMARY**

Title: B cells in etiopathogenesis and treatment of multiple sclerosis

Author: Tena Magovac

Multiple sclerosis has traditionally been considered a T-cell mediated disease.

Immunomodulatory therapy based on this theory reduces relapse rate but cannot completely prevent relapses or progression of disability and has generally negligible effect in the primary progressive form of the disease.

B cells are crucial components of the pathogenesis of various autoimmune neurological disorders and play an important role in regulation of T cell activation, cytokine secretion and formation of ectopic germinal centres in the central nervous system. B cell follicle-like structures in the cerebral meninges represent an important site of B cell activation and expansion in chronic disease. After crossing the blood-brain barrier, memory B cells are susceptible to stimulation by antigens, clonal expansion, and differentiation in plasma cells that secrete antibodies. Besides being the target of the immunopathological process, central nervous system in patients with inflammatory disease provides a unique environment that supports the long-term survival of B-lineage cells, notably long-lived plasma cells, and local antibody production.

Concept of B cell depletion by monoclonal antibodies that recognize specific target, CD20 antigen, represents potent therapeutic solution, with a strong influence on disease progression and proven efficacy in progressive form of multiple sclerosis, currently treated unsatisfactorily. Clinical trials have undoubtedly showed that anti-CD20 monoclonal antibodies elicit prompt and sustained suppression of inflammatory disease activity even after B cell reconstitution. The clinical impact was reflected in a substantial reduction in number and formation of new CNS lesion, and associated clinical relapses; also, a reduction of disability progression is reported. Transition to progressive phase of the disease can be reaped by an early therapy initiation. Additionally, promising effect on primary progressive multiple sclerosis was noted in terms of significant and sustained reduction of disability progression. Although the short-term safety profile appears favourable, long-term assessment of the safety profile of anti-CD20 monoclonal antibodies treatment is required in order to determine the risk of uncommon adverse effects, including PML or malignancies.

Key words: multiple sclerosis, B cells, anti-CD20 monoclonal antibodies

## 1. Uvod

Multipla skleroza (MS) je kronična autoimuna upalna bolest središnjeg živčanog sustava SŽS karakterizirana demijelinizacijom i aksonalnom degeneracijom, te predstavlja vodeći uzrok invalidnosti u mladoj odrasloj populaciji. [1][2] Zadnjih se godina bilježi postupni globalni porast incidencije i prevalencije bolesti. Primjerice, u norveškoj kohorti tijekom perioda od 53 godine (1961.– 2014. g.) prevalencija je s 20 porasla na 203/100 000, a incidencija s 1.9 na 8/100 000. [3] Prevalencija bolesti raste odmicanjem od ekvatora, a najviša je u Sjevernoj Americi i zapadno-europskom području. Etiologija MS-a je multifaktorijalna, a sastoji se od tri sastavnice: genetske predispozicije, okolišnih faktora i odgovora imunološkog sustava. Smatra se da je oko 30% rizika za razvoj MS-a genetski određeno. Identificirano je više od 230 rizičnih gena kao potencijalnih markera povećane sklonosti za razvoj bolesti koji su tipično povezani s upalnim, odnosno imunskim, a rjeđe s faktorima unutar SŽS-a. Međutim, povezanost s pronađenim genima nije univerzalna i varira s obzirom na etničku pripadnost, rasu i geografsku širinu. Druga komponenta etiologije MS-a obuhvaća izloženost različitim okolišnim čimbenicima, vjerojatno u kritičnim vremenskim točkama, osobito u najranijem periodu života pa do razdoblja adolescencije. Okolišni faktori uključuju nedostatak vitamina D, infekciju Epstein-Barr virusom (EBV), pušenje, adolescentnu pretilost i izloženost ultraljubičastom zračenju. Konačno, treći faktor koji oštećuje SŽS je vlastiti imunološki sustav oboljeloga koji uključuje prirodenu i stečenu imunost, fokalnu i difuznu upalu, promjene sastavnica SŽS-a i upalu leptomeningealnih ovojnica. Dva glavna patološka procesa u podlozi MS-a ograničena su na SŽS. Jedan od njih je fokalna upala koja dovodi do formiranja makroskopskih plakova koji su odraz većih prekida kontinuiteta krvno-moždane barijere (BBB), a središnje su obilježje relapsnog oblika bolesti. Druga patološka osnova je neurodegeneracija s mikroskopskim ozljedama neurona, aksona, sinapsi i dendrita, te značajnim gubitkom tkiva, a smatra se neuropatološkim supstratom progresivnoga oblika MS-a. [4]

Četiri su osnovna oblika manifestacije bolesti: klinički izolirani sindrom (CIS), relapsno-remitirajuća multipla skleroza (RRMS), sekundarno-progresivni oblik (SPMS), te multipla skleroza primarno-progresivnoga tijeka (PPMS). CIS označava prvu epizodu neuroloških simptoma indikativnih za MS koji traju barem 24 sata, a uzrokovani su inflamacijom koja vodi demijelinizaciji u SŽS-u. MS u približno 85% slučajeva počinje takvom akutnom kliničkom epizodom. Nakon određenog vremenskog razdoblja najčešće dolazi do razvoja drugog kliničkog demijelinizirajućeg događaja kada se dijagnosticira klinički definitivna MS. [5][6] Relapsno-remitirajući oblik je najčešći s 85 – 90% oboljelih. Karakteriziran je izmjenom kliničkih epizoda pogoršanja i periodima stabilnosti, a u 40 – 50% neliječenih bolesnika dolazi do progresije u SPMS unutar desetogodišnjeg razdoblja. Žene od RRMS-a oboljevaju

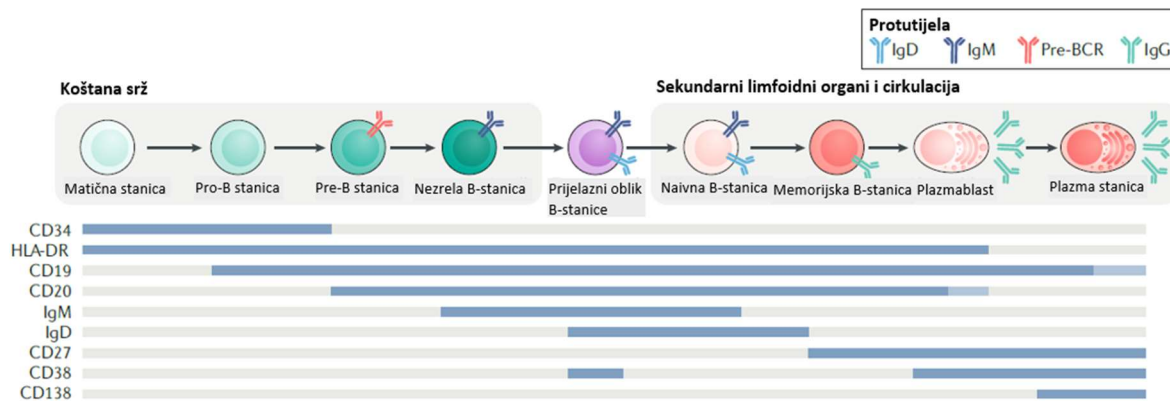
gotovo tri puta češće dok je teži ishod bolesti u muškaraca. [1] U otprilike 10% slučajeva bolest je primarno progresivnog karaktera, s postupnim napredovanjem neurološke disfunkcije i bez egzacerbacija. U usporedbi s RRMS-om, srednja dob pojavljivanja PPMS-a je gotovo 10 godina kasnije i ne nalazi se predominacije ženskoga spola. [7]

U početnim istraživanjima MS-a, a na osnovi modela eksperimentalnog autoimunskog encefalitisa (EAE), smatralo se da su T-stanice ključne u stvaranju demijelinizacijskih lezija, zanemarujući pritom ulogu B-stanica. Međutim, u zadnjih nekoliko godina bilježi se porast broja kliničkih studija koje upućuju na značajnu ulogu B-stanica u patofiziologiji bolesti. B-stanice su u patogenetsku podlogu MS-a uključene mehanizmima ovisnima o protutijelima, ali i onima koji ne zahtijevaju posredovanje protutijela. Jedno od središnjih obilježja i kriterij u postavljanju dijagnoze MS-a je prisutnost oligoklonalnih traka (OCB) u cerebrospinalnom likvoru (CSF) i plakovima u moždanom tkivu koje su rezultat perzistentne intratekalne klonalne ekspanzije B-stanične populacije koja proizvodi autoreaktivna protutijela. Studije sugeriraju da prisutnost klonalnih B-staničnih populacija u krvi i u SŽS-u upućuju na periferne B-stanice kao potencijalan izvor intratekalnih OCB-a, a što dalje potvrđuje da su B-stanice važna sastavnica autoimunskih procesa u MS-u. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo dolazi li do razvoja bolesti uslijed migracije imunskih stanica s periferije ili je inicijacija upale centralno, unutar SŽS-a. [7]

Nadalje, deplecijom B-stanica anti-CD20 monoklonalnim protutijelima ostvareno je značajno smanjenje inflamatorne aktivnosti lezija u SŽS-u u usporedbi s dosadašnjom terapijom koja modificira tijek bolesti. Osim toga, rezultati primjene ove terapije pokazali su i usporenje progresije u PPMS-u. [2]

## **2. B-stanice**

B-stanice potječu od matičnih stanica u koštanoj srži i prolaze kroz procese koji uključuju preslaganje B-staničnog receptora (BCR) i povećanje ekspresije CD34 i HLA-DR površinskih proteina (Slika 1).



**Slika 1. Razvoj B-stanica u koštanoj srži** (preuzeto i modificirano iz [8])

Sazrijevanje B-limfocita odvija se kroz nekoliko diferencijacijskih stadija, svaki karakteriziran promjenama u ekspresiji imunoglobulinskoga (Ig) gena i uzoraka ekspresije Ig proteina. Tranzicijom od pro-B do pre-B ili pre-B do nezrele B-stanice, neuspjeh u ekspresiji proteina, redom Ig teškog lanca ili Ig lakog lanca, rezultira programiranom staničnom smrti (apoptozom). Pre-BCR se sastoji od Ig  $\mu$  teškog lanca povezanoga s membranom i pripojenog s dvama drugim proteinima, surogatnim lakim lancima. Nezrele B-stanice počinju ekspresirati IgM molekulu i izlaze iz koštane srži, postaju tranzicijske stanice koje ekspresiraju IgM s ili bez koekspresije IgD molekule. Naivne B-stanice koekspresiraju IgM i IgD, a mogu ostati u cirkulaciji ili migrirati u sekundarne limfoidne organe. Nakon prepoznavanja antigena, naivne B-stanice prolaze daljnju diferencijaciju u memorijske stanice ili plazmablaste i konačno u plazma stanice. U limfnome tkivu, folikularne  $T_H$  stanice lučenjem IL-21 pomažu aktivaciju i promjenu razreda naivnih B-stanica. Aktivirane B-stanice mogu postati memorijske, od kojih neke i dugoživuće plazma stanice, a imaju sposobnost stvaranja antitijela. [8][9]

Limfociti u SŽS mogu ući na nekoliko mjesta koja uključuju prolazak BBB-a, krvno-meningealne barijere ili barijere koju čine krv i CSF. Općenito, samo aktivirani limfociti izlaze iz perivaskularnih venula BBB-a u moždani parenhim i tako infiltriraju perivaskularni prostor. U zdravom su organizmu vrlo niske razine B-stanica u moždanom parenhimu ( $\approx 0.1$  stanica/cm<sup>2</sup>) i CSF-u, gdje čine < 1% ukupnog broja leukocita. Nasuprot tome, u prisutnosti upale njihov broj raste nekoliko puta u CSF-u te nekoliko desetaka puta u parenhimu SŽS-a i perivaskularnim prostorima. [8]

### 3. B-stanična niša

Parenhim SŽS-a prethodno je smatran mikrookolišem nepovoljnim za dugotrajno preživljenje stanica imunskog sustava. Međutim, perzistencija OCB-a u CSF-u upućuje na to da B-stanice koje stvaraju imunoglobuline mogu preživjeti u tkivu tijekom duljeg vremenskog

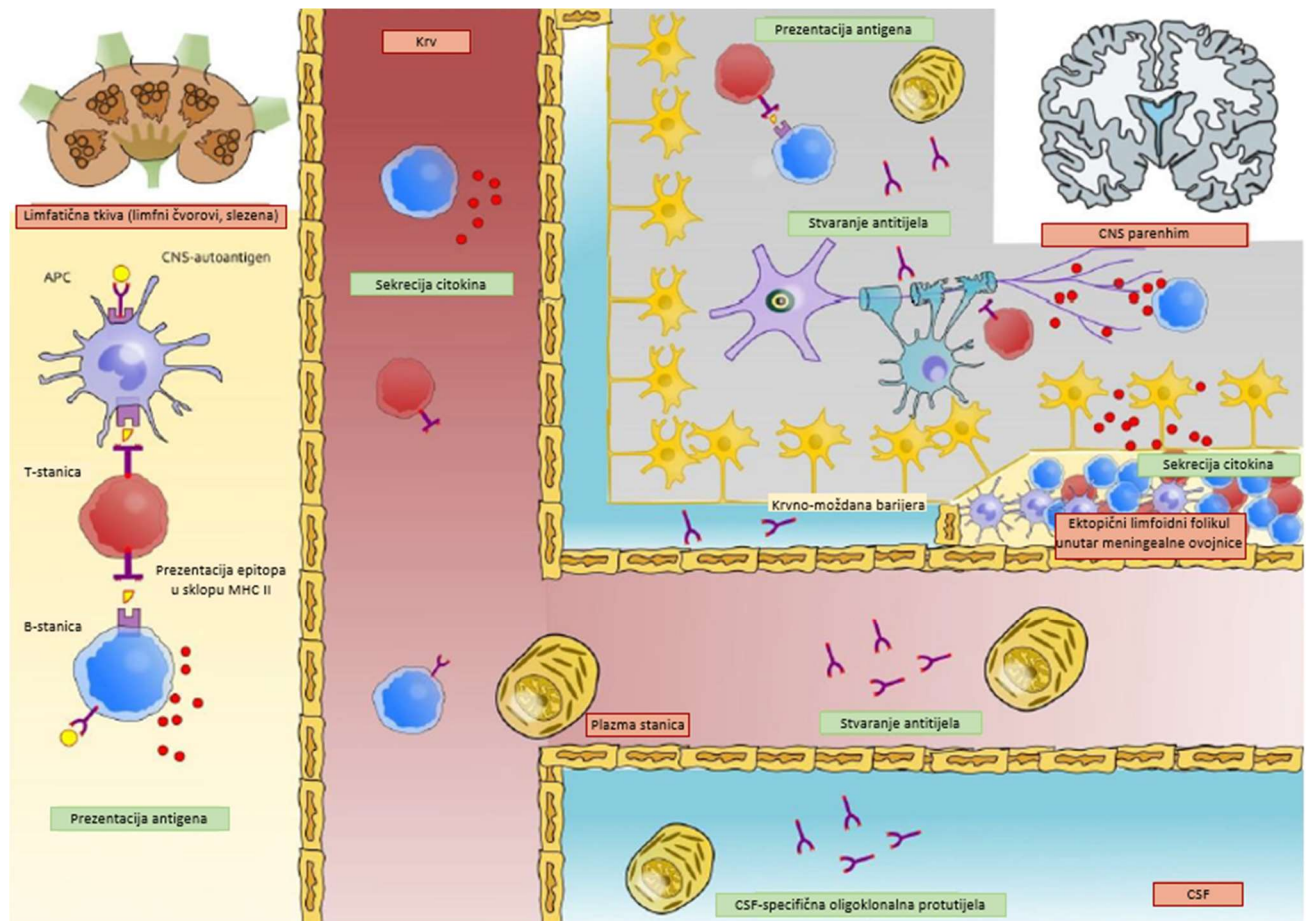
razdoblja, što SŽS čini pogodnim biotopom za B-stanice.[10] U CSF-u bolesnika s MS-om nađena je klonalna ekspanzija memorijskih B-stanica, centroblasti i kratkoživućih plazmablasti u usporedbi sa zdravim kontrolama u kojih su B-stanice u CSF-u rijetkost. [4] B-stanice mogu se naći u demijelinizacijskim lezijama SŽS-a u svim stadijima bolesti, a najbrojnije su u aktivnim lezijama bolesnika s RRMS-om u usporedbi s neaktivnim lezijama ili progresivnim oblikom bolesti kada se većinom nalaze u perivaskularnim lezijama i subarahnoidalnom prostoru, a rjeđe u parenhimu SŽS-a. [8] U postmortalnim uzorcima demijelinizacijskih lezija nađeni su depoziti antitijela i komplementa što dodatno potvrđuje B-staničnu aktivnost u SŽS-u. [2]

Astroцити, glavne višefunkcionalne stanice glije, izlučuju B-stanične faktore rasta kao što su aktivirajući faktor B limfocita (BAFF), CXCL10 i CXCL13, koji mogu poticati preživljenje B-stanica, a upalna aktivacija potiče njihovu produkciju. Ipak, B-stanice koje perzistiraju u SŽS-u ne čine izdvojenu populaciju već se čini da postoji izmjena s B-stanicama na periferiji s obzirom da je identificirano slično genetsko podrijetlo tih staničnih populacija. [10] Infiltracija meningealnih ovojnica B-staničnim strukturama nalik na folikule i depoziti imunoglobulina i komplementa također sugeriraju na prisutnost okoliša koji potiče proliferaciju i klonalnu ekspanziju B-stanica. [7]

Razlikuju se četiri imunopatološka tipa lezija u MS-u, karakterizirana interindividualnom heterogenošću no intraindividualnom homogenošću. Demijelinizacija u tipu I posredovana je T-stanicama i makrofazima, u tipu II protutijelima te aktivacijom komplementa, tip III označuje distalna oligodendrogliopatija, dok je tip IV karakteriziran degeneracijom oligodendrocita u bijeloj tvari u okolini plakova. Ova bi opažanja mogla biti klinički relevantna s obzirom da bi različiti imunopatološki tipovi MS-a mogli uvjetovati vrstu terapije. Nadalje, deplecija antitijela i faktora sustava komplementa koji sudjeluju u patološkim mehanizmima mogla bi biti učinkovita u primjerice tipu II demijelinizacijskih lezija. Tako je u manjoj kohorti u oko 45% bolesnika s fulminantnom kliničkom slikom u MS-u i drugim idiopatskim upalnim demijelinizacijskim bolestima SŽS-a u kojih nije bilo terapijskog odgovora na terapiju kortikosteroidima, došlo do poboljšanja neurološkog statusa nakon terapijske izmjene plazme. Nakon izmjene plazme, u svih je bolesnika s lezijama tipa II (uzorci od 10 bolesnika) no u niti jednog s lezijama uzoraka I i III (uzorci od 9 bolesnika), došlo do umjerenog do značajnog poboljšanja neurološkog deficita. U navedenom radu ocjena stupnja progresije bolesti prema proširenoj ljestvici statusa onesposobljenosti (EDSS) na zadnjem zabilježenom pregledu (prosječno vrijeme praćenja 2.5 godine [0.4 – 13.9 godina]) nije se razlikovala među skupina koje su odgovorile ili nisu odgovorile na liječenje izmjenom plazme, što je konzistentno s izostankom dugotrajne učinkovitosti na progresiju bolesti zabilježenom u prijašnjim studijama. [11]

#### 4. Funkcije B-stanica u autoimunoj bolesti

B-stanice na različite načine sudjeluju u patogenezi MS-a, a osim sekrecije patogenih autoantitijela, uključene su u prezentaciju antigena te aktivaciju T-stanica, sekreciju citokina (citokinsku signalizaciju koja aktivira T-stanice, makrofage i gljiv) te formaciju ektopičnih germinativnih centara (limfoidnih struktura) (Slika 2). [7][12]



#### Slika 2. B-stanice u patofiziologiji MS-a

(APC antigen-prezentirajuća stanica, CNS središnji živčani sustav, CSF cerebrospinalni likvor, MHC glavni kompleks histokompatibilnosti) (preuzeto i prilagođeno iz [2])

Procesi koji uključuju B-stanice u patogenezi bolesti mogu se podijeliti u dvije skupine – o protutijelima ovisni i oni čiji mehanizam ne uključuje protutijela. B-stanice smatraju se izvorom autoantitijela usmjerenih na specifične komponente SŽS-a. Uključenost mehanizama neovisnih o protutijelima u patogenetsku podlogu temelji se na rezultatima studija koje su u liječenju primjenjivale B-staničnu deplecijsku terapiju. Primjena rituksimaba (RTX), anti-CD20 monoklalnog protutijela, nije utjecala na plazma stanice i nije promijenila razinu protutijela u krvi, međutim bez obzira na taj nalaz primijećeno je smanjenje upalne

aktivnosti, učestalosti relapsa, radiološki vidljivih lezija te poboljšanje neurološkog deficita, što sugerira na posredovanje drugih mehanizama posredovanih B-stanicama različitim od mehanizama ovisnih o protutijelima. Osim protutijelima posredovanih mehanizama, B-stanice u patogenezi bolesti sudjeluju i kao antigen-prezentirajuće stanice (APC).

Prezentacijom antigena u stanju mirovanja, B-stanice mogu inducirati T-staničnu toleranciju, odnosno anergiju. S druge strane, B-stanice aktivirane antigenom, a uz pomoć T-stanica, konvertiraju se u APC koje su sposobne pojačati imunološki odgovor. Tako su B-stanice vrlo učinkovite APC, osobito kada prepoznaju isti antigen kao i T-stanice, a čini se da su osnovni izvor APC pri niskoj koncentraciji antigena. Autoproliferacija, koja se odnosi na aktivaciju i razvoj mijelin-specifičnih T-stanica potaknutih APC-om, a u odsutnosti egzogenog nominalnog antigena, još je jedan mehanizam kojim B-stanice stvaraju i održavaju repertoar patogenih T-stanica. Funkcija autoproliferacije pojačana je u oboljelih od MS-a. U osoba s MS-om s HLA-DR15 haplotipom autoproliferacija je posredovana memorijskim B-stanicama, a smanjuje se deplecijom B-stanica anti-CD20 antitijelima. Deplecija B-stanica anti-CD20 monoklonskim protutijelima prekida upalni odgovor posredovan B-stanicama i smanjuje onaj posredovan mijeloidnim i T-stanicama čime je, osim bliske interakcije među spomenutim stanicama, naglašen i doprinos proinflammatory B-stanica koje izlučuju citokine u patogenezi MS-a što je neovisno o njihovoj produkciji protutijela. Nasuprot tome, B-stanice mogu dovesti do smanjenja regulacije imunosnoga odgovora i ograničiti upalu u SŽS-u preko regulatornih B-stanica koje izlučuju antiinflammatory citokine (npr. IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35), a za koje je nađeno da su alterirane u MS-u. Općenito, u MS-u se prati pomak B-staničnog citokinskog profila prema proinflammatorynom, što posljedično potiče aktivnost mijeloidnih i T-stanica pojačavajući patogeni imunosni odgovor. [12] Osim toga, čini se da se sazrijevanje B-staničnog odgovora većinom odvija u cervikalnim limfnim čvorovima što objašnjava učinkovitost sistemske deplecije B-stanica. [13]

#### **4.1 Stvaranje autoantitijela i identifikacija ciljnih antigena**

Detekcija autoantitijela unutar SŽS-a, u krvi i CSF-u bolesnika s MS-om upućuju na uključenost humoralne imunosti u proces inflamatorne demijelinizacije. Navedena autoantitijela u dijela bolesnika vežući se za stanice moždanoga tkiva sudjeluju u oštećenju tkiva aktivacijom klasičnog puta komplementa, posredovanjem leukocita (npr. prirodno-bilačkih stanicama) putem fagocitoze ili citotoksičnih medijatora. Antigeni potencijalno odgovorni za inicijaciju ovih procesa nisu poznati, no predmet su brojnih kliničkih istraživanja. Osim toga, nije sigurno dolazi li do aktivacije B-stanica periferno u germinalnim centrima prije njihove migracije u SŽS, lokalno u germinalnim centrima unutar SŽS-a nakon prolaska BBB-a ili u oba odjeljka s obzirom na prisutnost ektopičnih B-staničnih folikularnih struktura s proliferirajućim B-stanicama u meningealnim ovojnica. U korteksu je ispod

leptomeningealnih infiltrata B-stanica nađena demijelinizacija i neuronalna degeneracija što upućuje na moguću kauzalnu povezanost, odnosno difuziju humoralnih faktora (antitijela) u podležeće tkivo. U aktivnim demijelinizacijskim lezijama nađeni su makrofazi s antitijelima vezanim na mijelinske fragmente što upućuje na moguću uključenost antitijelima posredovane fagocitoze u neuronalno i aksonalno oštećenje. U lezijama su nađena i autoantitijela, B-stanice i plazma stanice.

Oštećenje BBB-a, koje potencijalno prati leptomeningealnu upalu, omogućuje upalnim stanicama s periferije ulazak u SŽS i stvaranje B-staničnih agregata. Na oligodendrocitima i površini mijelinske ovojnice lokaliziran je mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (MOG) koji je direktno dostupan djelovanju antitijela. Anti-MOG antitijela IgG izotipa se u imunološke procese uključuju putem fiksacije komplementa i aktivacije citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC). Anti-MOG se veže na ekstracelularnu domenu epitopa, a smrt stanice je zatim posredovana prirodnoubilačkim (NK) stanicama. Ova su protutijela značajna u pedijatrijskom MS-u te u akutnom diseminiranom encefalomijelitisu (ADEM). Njihova prisutnost zabilježena je i u bolesnika s akvaporin-4 negativnim optičkim neuromijelitisom (NMO) i u spektrumu demijelinizacijskih bolesti koje dijele obilježja MS-a i optičkog neuromijelitisa. Zanimljivo je da su humana anti-MOG protutijela specifična za vrstu, odnosno prepoznaju konformacijske epitope u ljudi, no ne i MOG u glodavaca. Visoki titar anti-MOG u MS-u korelira s težinom kliničke slike u početku bolesti, no ne i s progresijom bolesti. Porast anti-MOG protutijela također može predstavljati sekundarni upalni odgovor na degradacijske produkte mijelina, stoga je neposredni učinak na proces demijelinizacije upitan. Dodatno je u jednoj studiji nađeno da niti jedan bolesnik s pozitivnim anti-MOG IgG1 protutijelima nije imao kliničku dijagnozu MS-a što dalje sugerira da bi detekcija anti-MOG protutijela mogla pomoći diferencijaciji MS-a i stečenih demijelinizacijskih sindroma nepovezanih s MS-om poput ADEM-a. Nedavna istraživanja međutim upućuju na postojanje MOG-specifičnih T-stanica u bolesnika s MS-om.

Unatoč dokazima o postojanju povezanosti anti-MOG protutijela s demijelinizacijskim bolestima, studije koje su koristile rekombinantna protutijela kao reprezentativni model OCB-a u likvoru pokazale su njihovu reaktivnost na intracelularne strukture, a bez utvrđene reakcije na mijelinske komponente, MOG ili druge poznate glijalne autoantigene sugerirajući tako postojanje drugih potencijalnih antigena kao promotora upalne demijelinizacije, uključujući viruse (poput EBV-a), ionske kanale, sinaptičke komponente i IgG4 autoantitijela na neurofascin, ionski kanal anoktamin-2, kontaktin, transaldolazu i  $\alpha$ -aktin.

U dijela bolesnika nađena je produkcija antitijela na determinante paranodalnog područja aksona. Antitijela na neurofascin, aksoglijalni protein koji se nalazi oko Ranvierova čvora, uključena su u paranodopatiju u kojoj poremećaj u povezivanju proteina dovodi do bloka provođenja. Nalaz ovih protutijela u bolestima različitim od MS-a dovodi u pitanje njihovu



specifičnost, a njihovo korištenje kao biomarkera progresije bolesti i prognoze zahtijeva daljnja istraživanja. Nadalje, u oboljelih od MS-a nađen je povišen titar protutijela na citoskeletni protein talin-1, koji vjerojatno sudjeluje u transmigraciji limfocita, a u negativnoj je korelaciji s razinom IgG protutijela te vjerojatno djeluje protektivno, u smislu usporavanja progresije bolesti. Jedno istraživanje je u značajnog broja bolesnika s RRMS-om identificiralo autoantijela na glijalne kalijске kanale KIR4.1, međutim isto nije potvrđeno u drugim kohortama. Ostala protutijela koja se smatraju vrijednim dijagnostičkim i prognostičkim biomarkerima uključuju antiglikanska, antigangliozidna i antitijela na neurofilamente (NFL). U panelu 4 antiglikanska IgM protutijela (anti-GAGA 2,3,4 i 6) nađena je povezanost barem jednoga s neposrednim ranim relapsom i progresijom bolesti. Štoviše, rano u bolesti nađena je povećana razina IgM antitijela na  $\alpha$ -glukozne antigene koje stvaraju repopularizirane B1 B-stanice što može predvidjeti konverziju u RRMS.

Povišene vrijednosti NFL-a indikativne su za aksonalnu degeneraciju u MS-u i koreliraju sa stupnjem aksonalnog oštećenja i lošijim ishodom bolesti te većim udjelom bolesnika s progresivnim oblikom bolesti. Također, u MS-u je povećano intratekalno stvaranje IgM i IgG protutijela na NFL. Osim toga, pronađene povišene razine anti-gangliozidnih protutijela potiču lokalni imunološki odgovor i posljedično neuronalno oštećenje. Dodatno, studije ukazuju na moguću povezanost visokog titra anti-GM1 s demijelinizacijom te anti-GM3 IgG protutijela s oštećenjem BBB-a. [7][8][10]

#### **4.2 Prezentacija antigena i regulacija citokinske sekrecije**

B-stanice prepoznaju prostornu konformaciju topljivih antigena kojima su epitopi na površini molekule, internaliziraju i ekspimiraju antigene na površini u kompleksu s MHC molekulom, koje onda prepoznaju T-stanice. Pogreške do kojih može doći u perifernom procesuiranju autoantigena proteazama mogu dovesti do perzistencije T-stanica reaktivnih na mijelin u cirkulaciji uslijed neuspjele tolerancije na vlastiti antigen. Reaktivacija autoreaktivnih T-stanica APC-om nakon migracije u SŽS inicira neuroinflamatorne reakcije. Prezentacija antigena u sklopu MHC-II molekule zajedno s kostimulatornim molekulama, poput CD40, CD80 i CD86, potiče proliferaciju T-stanica i sekreciju citokina, odnosno aktivacija T-stanica započinje autoimunosnu reakciju. Povećana ekspresija CD80 na površini B-stanica u aktivnoj fazi MS-a vjerojatno je odgovorna za aktivaciju Th1 staničnog odgovora i posljedično epizode egzacerbacije. Nedavno je istraživanje pokazalo da aktivacija T-stanica antigen-prezentirajućim B-stanicama na periferiji i posljedična migracija u SŽS dovodi do destrukcije mijelina, dok s druge strane deplecija B-stanica dovodi do smanjene proliferacije T-stanica. Nadalje, postoji mogućnost da je sposobnost prezentacije antigena B-stanicama pojačana CD40-CD40L interakcijama. U MS-u je zabilježena povećana ekspresija CD40L molekula na površini CD4<sup>+</sup> T-stanica. Nakon vezanja na CD40 molekulu na površini B-stanica, dolazi do

inicijacije neuroinflamatornih procesa regrutacijom upalnih stanica, povećanja nivoa ekspresije adhezijskih, MHC-II i drugih kostimulatorskih molekula, proliferacije B-stanica, produkcije antitijela i sekrecije citokina. Štoviše, stimulacijom putem CD40 dolazi do aktivacije NF- $\kappa$ B puteva i posljedično pojačane proliferacije memorijskih B-stanica uslijed NF- $\kappa$ B hiperfosforilacije u bolesnika s MS-om i pojačane sekrecije proinflamatornog citokina IL-6 u usporedbi s kontrolom. U odsutnosti CD40 opažena je smanjena proliferacija B-stanica. U demijelinizacijskim lezijama povećana ekspresija BAFF-a omogućuje perzistenciju B-stanica koje luče citokine. Smanjena razina BAFF-a u CSF-u oboljelih u početku bolesti sugerira na trošenje faktora intratekalno i korelira s povećanom produkcijom IgG-a. Regulacija je BAFF-a važna u održavanju ravnoteže proinflamatornih i regulatornih aktivnosti B-stanica. [7]

U monocita i T-stanica oboljelih od MS-a nađena je povećana ekspresija BAFF-a i liganda koji inducira proliferaciju (APRIL), a atacicept se pokazao djelotvornim u nekoliko modela autoimunosti, uključujući animalni model MS-a – EAE. Atacicept je rekombinantni fuzijski protein koji suprimira B-staničnu funkciju i produkciju antitijela, preciznije blokira djelovanje nekoliko faktora, BAFF-a i APRIL-a, koji pomažu sazrijevanje, aktivaciju i preživljenje B-stanica. Klinička studija u fazi II kojoj je svrha bila ispitati učinkovitost atacicepta u MS-u s prethodno povoljnim učincima u drugim autoimunim bolestima, poput reumatoidnog artritisa (RA) i lupusa, ranije je obustavljena zbog kliničkog pogoršanja, odnosno utvrđenog povećanog broja relapsa u skupinama koje su primale lijek u usporedbi s placebo, a što je povezano s pojačanom aktivacijom memorijskih i smanjenjem B-stanica koje secerniraju IL-10. Time je istaknuta važnost ravnoteže proinflamatornih memorijskih i regulatornih B-stanica u patogenezi bolesti. Značajno je da se CD20 molekula eksprimira ranije u razvoju od BAFF-a i APRIL-a (ciljnih molekula atacicepta). Stoga, primjena atacicepta ne utječe na prekursore B-stanica i memorijske B-stanice, što može rezultirati u preferencijalnoj atenuaciji regulatornih stanica doprinoseći tako proinflamatornome odgovoru. Neočekivani porast broja relapsa, koji se nije reflektirao na aktivnost bolesti vidljive na snimkama magnetske rezonancije (MR), naglašava kompleksnost imunosne regulacije i ciljanog terapijskog djelovanja na B-stanice i protutijela u MS-u. [14]

Nadalje, rezultati studija sugeriraju da se, suprotno nalazima u RA i dijabetesu tipa 1, poremećaji u B-staničnoj toleranciji u MS-u mogu pripisati poremećenoj funkciji T-stanica. Štoviše, u bolesnika s MS-om nađen je poremećaj B-stanične tolerancije na razini perifernih kontrolnih točaka, ne i centralnih. Pokazano je da je ovaj nedostatak praćen povećanom aktivacijom i homeostatskom proliferacijom zrelih naivnih B-stanica. Za razliku od nalaza u bolesnika s RA i dijabetesom tipa 1, čini se da je u MS-u centralna selekcija B-stanica u koštanoj srži održana. Specifičan defekt periferne B-stanične tolerancije u MS-u potencijalno

se može pripisati poremećenoj funkciji regulatornih T-stanica, što vodi nakupljanju autoreaktivnih klonova B-stanica u krvi. [15]

Osim toga, bolesnici pokazuju aberantni B-stanični citokinski odgovor na stimuluse i produciraju neuobičajeno velike količine proinflammatoryh citokina. Proinflammatory B-stanice luče IL-6, IL-12, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i limfotoksin- $\alpha$  koji dovode do polarizacije na pomoćničke T-stanice tipa 1 (T<sub>H</sub>1) ili pomoćničke T-stanice koje luče IL-17 (T<sub>H</sub>17). TNF- $\alpha$  može stimulirati astrocite na sekreciju BAFF-a, čija je ekspresija povećana u MS lezijama, pojačavajući tako autoimunost ovisnu o B-stanicama. Sekrecija faktora stimulacije rasta kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF) upućuje na interakciju s mijeloidnim stanicama i suprotstavlja se regulatornom učinku citokina IL-10. S druge strane, regulatorne B-stanice izlučuju i protuupalne citokine, poput IL-10, IL-35 i TGF- $\beta$ , koji posreduju imunoprotektivno djelovanje, odnosno suprimiraju djelovanje proinflammatoryh T-stanica. U eksperimentalno induciranom modelu EAE transfer B-stanica koje izlučuju IL-10 rezultirao je supresijom aktivnosti bolesti. [2][7][8]

### **4.3 Formacija ektopičnih limfoidnih struktura**

Agregati B i T limfocita formiraju tercijarne limfoidne organe i strukture koje nalikuju germinativnim centrima u meningealnim ovojnicama bolesnika s MS-om. Unutar germinativnog centra, B-stanice proliferiraju i prolaze procese sazrijevanja afiniteta i somatske hipermutacije, te se nakon niza reakcija diferenciraju u plazma i memorijske stanice koje produciraju autoantitijela. Štoviše, B-limfociti koji zaostaju u ektopičnim strukturama rezistentni su na djelovanje anti-CD20 terapije i nastavljaju proizvoditi antitijela bez obzira na kompletnu depleciju B-stanica, vjerojatno zbog lokalne sekrecije B-staničnih faktora (npr. BAFF-a) koji omogućuju njihovo preživljenje. Kreiranjem specifične upalne niše potiče se formiranje i održavanje ektopičnih limfoidnih struktura.

Osim upalnih, važnu ulogu u regrutiranju limfocita i njihovoj retenciji unutar meningealnih ovojnica imaju stromalne, neimunosne stanice. Citokini (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-23), kemokini (CXCL13) te regulatorni B-stanični faktori stvaraju povoljni, proinflammatory milje te sudjeluju u održavanju limfoidnih struktura. Signalizacija putem kemokina CXCL13, koji veže CXCR5 eksprimiran na B-stanicama, uključena je u kontrolu lokalizacije imunskih stanica i aktivaciju mikroglije, a razina je CXCL13 u aktivnim lezijama u MS-u povećana. Formiranje ektopičnih folikularnih struktura povezano je s težom kliničkom slikom vjerojatno zbog izraženijeg afinitetnog i klonalnog sazrijevanja B-stanica prema autoantigenima. Citokin IL-22 važan je u posredovanju ekspresije kemokina CXCL12 i CXCL13, medijatora kemotaksije B-stanica, čime ostvaruje ulogu u stvaranju ektopičnih limfoidnih struktura, odnosno potiče nakupljanje B-stanica koje stvaraju autoantitijela. [7]

## 5. Meningealna inflamacija u kortikalnoj patologiji sekundarno-progresivne multiple skleroze

SPMS karakterizirana je difuznom upalom, prisutnošću kroničnih demijelinizacijskih lezija bijele tvari, gubitkom aksona, imunopatološkim promjenama bijele tvari normalnoga izgleda (NAWM) i kortikalne sive tvari koje su važne determinante invalidnosti. U progresivnoj fazi bolesti smanjuje se broj novih lezija u bijeloj tvari i infiltracija limfocitima, a smatra se da se imunosni odgovor u toj fazi ograničava na SŽS iza relativno intaktne BBB-e.

U drugim autoimunim bolestima, poput RA, Sjögrenova sindroma, mijastenije gravis i autoimunog tireoiditisa, kronična je upala ciljnih organa često praćena stvaranjem ektopičnih B-staničnih folikula, odnosno organiziranih struktura B i T-stanica nalik onima u sekundarnom limfoidnom tkivu. Iako patofiziološka uloga ektopičnih, tercijarnih limfoidnih struktura nije do kraja poznata, smatra se da predstavljaju lokalni izvor proinflamatornih medijatora, autoantitijela i autoreaktivnih T-stanica. Ektopične B-stanične strukture nalik na folikule u meningealnim ovojnica u dijela bolesnika sa SPMS-om mogle bi predstavljati važno mjesto aktivacije limfocita i njihova širenja u kroničnoj bolesti.

Subarahnoidalni i perivaskularni prostori SŽS-a mjesta su (re)aktivacije T i B-stanica, gdje cirkulirajući limfociti međudjeluju s APC-om slično kao u limfoidnim organima. B-stanice igraju ključnu ulogu u razvoju SŽS lezija, a jasno je vidljiva perzistentna aktivacija intratekalnih B-stanica kroz sve stadije bolesti. Klonalni limfociti nađeni u demijelinizacijskim lezijama, meningeama i likvoru sugerirajući njihovu lokalnu ekspanziju i perzistenciju, te pretpostavljaju sposobnost tih stanica da nasele sekundarna mjesta unutar moždanog tkiva koja bi mogla prethoditi stvaranju novih lezija. Dakle, strukture nalik limfoidnim folikulima mogle bi biti važne u produljenju i heterogenosti upalnog odgovora generiranjem novih autoreaktivnih B-staničnih klonova koji bi se mogli širiti moždanim tkivom. Iz patoloških studija vidljivo je da kortikalnim lezijama nedostaju tipični infiltrat limfocita, aktivacija komplementa i makrofazi ispunjeni ostacima degradiranog mijelina prisutni u lezijama bijele tvari, što je dovelo do hipoteze kako oštećenje sive tvari nije primarno nastalo zbog upale već kao posljedica udaljenog gubitka mijelina i aksona u bijeloj tvari. Međutim, brojne su studije pokazale kako kortikalna demijelinizacija, neurodegeneracija i atrofija pozitivno koreliraju s prisutnošću difuznih upalnih infiltrata i struktura nalik limfoidnim folikulima u leptomeningeama, što implicira da imunološka aktivnost u ovom odjeljku sudjeluje u patološkim procesima koji zahvaćaju korteks. Tako prisutnost ekstenzivne subprijalne demijelinizacije u SPMS-u s naznačenom meningealnom upalom i gotovo potpunom odsutnošću limfocita i makrofaga u kortikalnim lezijama isključuje ulogu perivaskularne upale te sugerira imunosni odgovor u inflamiranim meningealnim ovojnica kao čimbenik koji

sudjeluje u razvoju patogenetskih promjena podležeće sive tvari. Difuzni infiltrati upalnih stanica i ektopične limfoidne strukture izvor su proinflammatoryh citokina, litičkih enzima i imunoglobulina koji pridonose stvaranju okoliša koji pogoduje oštećenju moždanog parenhima. Konzistentno s navedenim u osoba u kojih su nađene B-stanične meningealne strukture nalik folikulima, utvrđena je i opsežnija demijelinizacija sive tvari i gubitak oligodendrocita, veća atrofija korteksa te povećani broj aktivirane mikroglije u vanjskim kortikalnim slojevima. Povećanje upalnog miljea praćeno je znatnim oštećenjem glije limitans i neuronalnim gubitkom najopsežnijim u superficijalnoj lamini uz pijalnu ovojnica. To dovodi do pretpostavke da je destrukcija podležeće sive tvari korteksa uzrokovana proinflammatorym okruženjem koje je djelomično uzrokovano citokinima, metaloproteinazama i reaktivnim kisikovim i dušikovim vrstama koje T i B-stanice izlučuju u subarahnoidalni prostor. Važno je naglasiti da dio studija koji se bavio ovom problematikom nije uspio detektirati B-stanične strukture niti utvrditi ulogu meningealne upale u subpijalnoj patologiji. [16][17]

Nadalje, u prilog upalnog podrijetla kortikalnih lezija govore rezultati studije provedene na biopstatima moždanog tkiva uzetih unutar nekoliko dana ili tjedana od prezentacije prvih simptoma u bolesnika u svrhu isključivanja bolesti različitih od MS-a, a u kojih je naposljetku dijagnosticiran MS. Nađeno je da demijelinizacijske kortikalne lezije, osim što su česte u ranijim stadijima bolesti i povezane s meningealnom upalom, pokazuju prominentan infiltrat stanicama imunološkog sustava i fagocitozu mijelina, što je suprotno nalazima na postmortalnim tkivnim uzorcima koji su sugerirali neovisan razvoj neurodegeneracije o parenhimalnoj upali. [18]

### **5.1 Uloga B-stanica u razvoju patologije korteksa**

U sklopu studije, kojoj je svrha bila utvrditi prisutnost meningealnih i perivaskularnih infiltrata upalnih stanica u blokovima tkiva i/ili cjelovitim koronalnim makrosekcijama, pregledani su postmortalni uzorci moždanog tkiva 123 bolesnika koji su bolovali od SPMS-a. Sekcije su uzete u razini anteriornog septuma, stražnjeg dijela kaudatusa s uključenim motorničkim korteksom i okcipitalnog roga lateralnih ventrikula obuhvaćajući tako velik broj različitih moždanih regija. U 52% uzoraka detektiran je znatan perivaskularni ili meningealni upalni infiltrat, dok su B-staničnih nakupine nađene u 40% slučajeva (imunohistokemijskim bojanjem utvrđena prisutnost proliferirajućih Ki67<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> B-stanica, imunoglobulin A,G,M<sup>+</sup> plazma stanica/plazmablasta, CD3<sup>+</sup> T-stanica i CD35<sup>+</sup> folikularnih dendritičkih stanica). Uzorci u kojih su detektirane strukture nalik na limfoidne folikule označeni su kao F+ SPMS, dok su uzorci bez takva nalaza svrstani u F- SPMS skupinu. Važno je istaknuti da je u obje skupine smrtni ishod često povezan sa sistemskom infekcijom (45/74 u F- SPMS kohorte i 29/49 u F+ kohorte), bez jasne veze s meningealnim strukturama nalik na limfoidne folikule.

Meningealne (B-stanične) strukture nalik na limfoidne folikule nađene na presjecima uvijek su blisko bile vezane s podležećim subprijalnim patofiziološkim promjenama, dok obratno ne vrijedi, odnosno na pregledanim presjecima subprijalne demijelinizacije zabilježene su i na mjestima koja prostorno nisu povezana sa strukturama nalik na imfoidne folikule, što međutim ne isključuje mogućnost postojanja takvih struktura na susjednim presjecima. Kortikalne lezije, karakterizirane demijelinizacijom subprijalne sive tvari (predominantno), intrakortikalnih i leukokortikalnih dijelova, nađene su u cingulatnom girusu, superiornom i inferiornom frontalnom sulkusu, inzuli i temporalnim režnjevima, što je u skladu s nalazom prethodnih publikacija. Lezije periventrikularne bijele tvari često se bilježe u kutovima lateralnih komora i u centru semiovale, koji je često smanjenog volumena. Kvantitativna analiza cjelovitih koronalnih presjeka bilježi 3 puta veću površinu ukupne demijelinizacije u F+ SPMS, preciznije  $18.3 \pm 2.7\%$  u usporedbi s F- slučajevima kada iznosi  $5.3 \pm 1.4\%$ . Osim toga, u F+ presjeka 6 puta je veća površina koju čine lezije sive tvari ( $12.2 \pm 2.3\%$ ; u F- iznosi  $1.9 \pm 0.7\%$ ). Također, u F+ SPMS slučajeva nađeno je otprilike 2 puta više lezija bijele tvari, no bez statističke značajnosti rezultata. Nadalje, rezultati kvantitativne analize koja je obuhvatila 12 F+, 12 F- te 6 kontrolnih slučajeva pokazuju povećanu perivaskularnu upalu u meningeama i bijeloj tvari u F+ u usporedbi s F- skupinom. Iako nije nađeno značajnih razlika u gustoći infiltrata CD68<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> ili CD20<sup>+</sup> imunskih stanica u meningeama iznad područja sive tvari normalnoga izgleda u usporedbi s onima u kojima se nalaze lezije, infiltracija je makrofazima, T i B-stanica u meningeama (neovisno o njihovoj prostornoj povezanosti s lezijama sive tvari) značajno veća u F+ slučajeva u usporedbi s F- i kontrolnim slučajevima. Nadalje, kvantifikacija CD3<sup>+</sup> i CD20<sup>+</sup> perivaskularnih infiltrata unutar lezija bijele tvari i NAWM-a pokazuje povećanu limfocitnu infiltraciju u F+ naspram F- slučajeva sa SPMS. U subprijalnoj sivoj tvari normalnog izgleda i sivoj tvari u kojoj se nalaze lezije uočena je povećana gustoća parenhimalne CD68<sup>+</sup> mikroglije u F+ skupine u usporedbi s kontrolnom i F- skupinom. U F+ kohorti relativna incidencija agregata sličnih folikulima u značajnoj je korelaciji s gustoćom ukupnih meningealnih infiltrata (CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> i CD68<sup>+</sup> stanica;  $r = 0.6$ ) i s gustoćom CD68<sup>+</sup> makrofaga u meningeama ( $r = 0.8$ ). Također, nađena je umjereno pozitivna korelacija između ukupnog meningealnog infiltrata i broja parenhimalne CD68<sup>+</sup> mikroglije te ukupnog meningealnog infiltrata i opsega demijelinizacije sive tvari u 16 slučajeva u kojih su bile dostupne cjelovite koronalne makrosekcije. Prisutnost aktiviranih CD68<sup>+</sup> stanica u parenhimu blisko povezanom s upalnim žarištama u meningealnim ovojnica ilustrira topografski odnos upalnih stanica često viđen u ova dva odjeljka, odnosno povezanost meningealne i priležeće parenhimalne upale. U prijašnjim je studijama opisana povezanost struktura nalik limfoidnim folikulima s ranijim početkom bolesti te ranijim smrtnim ishodom bolesnika. U F+ skupini neuropatološkim se testiranjem učestalije detektira aktivna upala u trenutku smrti (temeljem nalaza ranih aktivnih lezija u bijeloj tvari) u

usporedbi sa slučajevima stabilne aktivnosti bolesti (umjerena upala i inaktivne lezije). Rezultati ove studije pokazuju da upala meningealnih ovojnica, nevezano za organizaciju u strukture nalik na limfoidne folikule, pridonosi kortikalnoj patologiji i općenito progresiji bolesti. Tako je veći stupanj upale povezan s progresijom bolesti u mlađoj dobi, osobito progresijom ranih stadija bolesti. Osim toga, u F+ skupini nađeno je kraće trajanje bolesti ( $22.2 \pm 1.1$  g., nasuprot  $29.5 \pm 1.3$  g. F- skupine), kraći period potreban od nastupa bolesti do konverzije u SPMS ( $8.8 \pm 1.0$  godina, nasuprot  $12.7 \pm 1.2$  godina u F- uzorcima) te kraće trajanje progresivne faze, odnosno perioda od sekundarne progresije do smrti ( $13.0 \pm 0.9$  godina, nasuprot  $16.9 \pm 1.0$  godina u F- SPMS). Više je studija pokazalo da upalom zahvaćene meningealne ovojnice igraju važnu ulogu u patološkim procesima koji zahvaćaju sivu tvar korteksa u progresivnim stadijima MS-a. Ektopične B-stanične strukture slične folikulima nađene su u 40% uzoraka SPMS-a, a kada se nalaze u subarahnoidalnom prostoru povezane su s većom globalnom meningealnom upalom i većim patološkim zahvaćanjem sive tvari. Rezultati studije sugeriraju da prisutnost limfoidnih nakupina upućuje na veću zahvaćenost meningealnih ovojnica upalom koja je vjerojatno jedan od etioloških čimbenika globalno povećane kortikalne demijelinizacije te smanjenog vremena do nastupa značajne invalidnosti. [16]

Druga je studija obuhvatila 181 moždani tkivni blok prikupljenih postmortalno od 44 bolesnika koji su bolovali od SPMS-a. U 26 slučajeva nađeni su B-stanični folikuli te im je pridodana oznaka F+, dok je preostalih 18 označeno kao F-, odnosno bez prisutnih meningealnih folikula na pregledanim presjecima. CD20<sup>+</sup> stanice pobrojane su u 17 sekcija, CD8<sup>+</sup> u 11 sekcija, a Ig<sup>+</sup> stanice u 8 sekcija u perivaskularnim prostorima, a rezultati su prikazani kao postotak imuno-obojenih stanica od ukupne populacije stanica nađene u perivaskularnome prostoru. U F+ slučajeva češći je bio nalaz imunološki aktivnih lezija u bijeloj tvari, imunološki aktivnih i kroničnih aktivnih kortikalnih lezija, a od kliničkih parametara bolest je nastupila u ranijoj dobi, a ovisnost o invalidskim kolicima i smrtni ishod bio je ranije u tijeku bolesti. Među 26 F+ slučajeva, 42% (11 slučajeva) ih je imalo i subprijalne kortikalne lezije koje sadrže gusti perivaskularni infiltrat imunoloških stanica, za razliku od F- uzoraka u kojih nije nađeno niti jedne infiltrirane kortikalne lezije. U podskupini F+ uzoraka značajno je bio češći i nalaz kroničnih aktivnih lezija u bijeloj tvari. Sve subprijalne kortikalne lezije s upalnim infiltratom nalazile su se uz područja lokalne ili difuzne meningealne upale u obliku struktura nalik limfoidnim folikulima. Intrakortikalna je upala uglavnom uključivala manje vene koje dreniraju vanjske slojeve korteksa ili površinske ogranke vena koje dreniraju sve kortikalne slojeve ili korteks i subkortikalnu bijelu tvar. U svih su intrakortikalnim infiltratima nađene CD3<sup>+</sup> T-stanice te gust infiltrat CD8<sup>+</sup> T-stanica (preciznije, činile su  $31.6 \pm 11.3\%$  perivaskularne populacije stanica), osobito u najaktivnijim lezijama. Akumulacija je CD20<sup>+</sup> B-stanica i Ig<sup>+</sup>

plazmablasta/plazma stanica također bila prominentna u F+ slučajeva (činile su  $33.2 \pm 17.6\%$ , odnosno  $24.6\% \pm 8.3\%$  perivaskularnog infiltrata). Nalazi meningealnih i intrakortikalnih imunoloških infiltrata u postmortalnim uzorcima SPMS slučajeva s prisutnošću znatne SŽS upale, kortikalnim oštećenjem i težim kliničkim tijekom, idu u prilog pretpostavke direktne uključenosti perzistentne upale u egzacerbaciju kortikalne patologije tijekom progresivne faze bolesti. Posljedično nalazu intrakortikalne infiltracije imunološkim stanicama u 40% slučajeva F+ uzoraka, a ni u jednom slučaju s neznatnom meningealnom upalom, te predominantnog zahvaćanja malih vena koje dreniraju II. i III. kortikalni sloj, direktna je veza meningealne i intrakortikalne upale vjerojatna. Perzistencija intrakortikalne upale tijekom progresivne faze bolesti mogla bi pomoći interpretaciji promjena u sivoj tvari koja je detektibilna naprednim tehnikama MR-a, a snažno korelira s progresijom invalidnosti. U skladu s upalnom prirodom kortikalnih lezija, pokazano je da natalizumab (NTZ), monoklono protutijelo koje blokira ulazak leukocita u SŽS, dovodi do značajnog smanjenja akumulacije kortikalnih lezija i progresije kortikalne atrofije u RRMS-u. [17]

## **5.2 Detekcija stanica inficiranih Epstein–Barr virusom**

Na temelju dosadašnjih istraživanja hipoteza je da bi meningealne strukture nalik limfoidnim folikulima mogle predstavljati glavno mjesto za EBV perzistenciju u SŽS-u u MS-u, što je kompatibilno sa serološkim nalazima koji upućuju na povezanost infekcije EBV-om s MS-om i jedinstvenom sposobnošću EBV-a da inficirane B-stanice učini besmrtnima. B-stanice koje se nakupljaju u moždanom tkivu oboljelih od MS-a podržavaju aktivnu infekciju EBV-om. Smatra se da se perzistencija i reaktivacija EBV-a događa unutar meningealnog ektopičnog limfoidnog tkiva te da bi CD8<sup>+</sup> T-stanicama posredovana reakcija na inficirane B-limfocite mogla posredno dovesti do oštećenja priležećeg korteksa. [16]

U istraživanju, koje je analiziralo postmortalne uzorke moždanog tkiva oboljelih od SPMS-a, u 3 je bloka tkiva dvaju bolesnika nađena očuvana RNA EBV-a, te EBER (engl. Epstein-Barr encoded RNA)<sup>+</sup> stanice u tkivu i susjednim upalnom zahvaćenim meningeama. Osim toga, nađeno je da plazma stanice u perivaskularnom prostoru eksprimiraju EBV rane litičke proteine (BZLF1, BFRF1). Perivaskularne stanice koje su pokazale imunoreaktivnost za BZLF1 detektirane su u kortikalnim lezijama infiltriranim upalnim stanicama, ali ne i u kroničnim aktivnim lezijama. Dodatno je u 8 aktivnih lezija nađen pozitivitet na jedan ili oba litička EBV proteina (antigena), dok slično nije detektirano u dvije kronične aktivne lezije obuhvaćene analizom. Osim toga, opaža se konzistentno pojavljivanje CD8<sup>+</sup> stanica morfološki nalik aktiviranim limfoblastima u bliskom kontaktu s Ig<sup>+</sup> stanicama i BFRF1<sup>+</sup> stanicama, kao i granzim B<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> stanica u blizini BFRF1<sup>+</sup> stanica. Dvostruko imunobojanje na perforin i Ig pokazalo je nakupljanje perforinskih granula polariziranih prema Ig<sup>+</sup>



stanicama. Nadalje, CD107a degranulacijski marker detektiran je na površini nekih CD8<sup>+</sup> stanica u upalnim kortikalnim lezijama i okolnim meningealnim ovojnicama. Ovi nalazi sugeriraju da bi plazma stanice inficirane litičkim EBV-om, koje se nakupljaju u kortikalnim lezijama u MS-u, mogle biti ciljne stanice citotoksičnog imunološkog odgovora. Prisutnost granzima B unutar CD8<sup>+</sup> stanica i na površini susjednih EBV inficiranih (BFRF1<sup>+</sup>) stanica, polarizacija perforinskih granula prema Ig<sup>+</sup> stanicama i nalaz CD107 na površini CD8<sup>+</sup> stanica indirektno sugeriraju aktivan nadzor imunološkog sustava nad EBV-om u upalnim kortikalnim lezijama. Sveukupno, slični nalazi u aktivnim lezijama bijele tvari i meningealnim ovojnicama i opažanja u ovoj studiji upućuju na to da reaktivacija EBV-a i posljedični antivirusni citotoksični odgovor mogu pokrenuti akutni upalni odgovor u sva tri cerebralna odjeljka, odnosno u bijeloj tvari, sivoj tvari te meningeama. Konačno, potvrda širenja aktivne EBV infekcije B-stanicama SŽS-om i reaktivacija u plazma stanicama, dodatno upućuje na moguću uzročnu povezanost između povećanog imunološkog odgovora na EBV i upalnu prirodu SŽS patologije u MS-u. Međutim, uloga virusa u patogenezi bolesti i infekcija B-stanica virusom u meningealnim i perivaskularnim infiltratima ostaje sporna. [16][17]

## **6. Poremećaji periferne tolerancije B-stanica**

Gubitak specifične imunološke nereaktivnosti na određeni antigen ili antigene osnova je razvoja autoimunih bolesti. Rano u bolesti dolazi do smanjene ekspresije faktora inhibicije migracije makrofaga (MIF) što korelira sa smanjenom CD74, ali povećanom ekspresijom CXCR4 receptora, što dovodi do poremećaja sazrijevanja B-stanica te njihova zaostajanja u ranijim diferencijacijskim stadijima. S prekomjernom ekspresijom CXCR4 dolazi do smanjene ekspresije Fas-a, važnog medijatora apoptoze, nužnoga za uklanjanje autoreaktivnih imunih stanica, što dalje omogućuje naivnim B-stanicama izbjegavanje tolerancije na autoantigene. Razina MIF-a, koja korelira s težinom i progresijom bolesti, nađena je povećanom u progresivnom obliku bolesti. Primjena ibudilasta, inhibitora MIF-a i fosfodiesteraza, pokazala je nešto sporiju progresiju moždane atrofije u bolesnika koji su primali lijek u usporedbi s placebo. Delecija klona, anergija klona i imunološko zanemarivanje su mehanizmi tolerancije neophodni za uklanjanje autoreaktivnih klonova B-stanica.

Transkripcijski faktor c-ets-1 uključen je u indukciju imunološkog zanemarivanja i periferne anergije limfocita B, odnosno ima središnju ulogu u inhibiciji diferencijacije anergičnih B-stanica u stanice koje stvaraju autoantitijela. Russell i suradnici istraživali su učinke nedostatka c-ets-1 na procese imunotolerancije i ustanovili da unatoč održanoj centralnoj klonalnoj deleciji, B-stanice nisu uspjele postići toleranciju perifernim mehanizmima imunološkog zanemarivanja i anergije. Defekti u apoptozi posredovanoj aberantnim Fas-FasL specifičnim B-staničnim interakcijama dovode do nekontrolirane produkcije autoantitijela što označuje važnost uloge Fas molekule u održavanju tolerancije. [7]

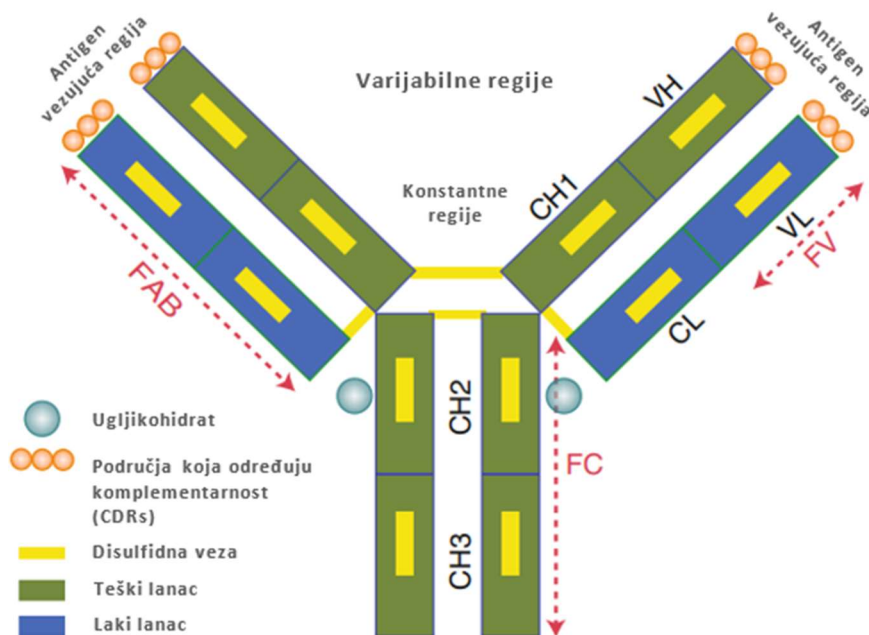
## 7. B-stanice u eksperimentalnom modelu autoimunskog encefalomijelitisa

B-stanice razvoju autoimunosti mogu pridonijeti sekrecijom autoantijela, transportom autoantigena od tkiva do sekundarnih limfoidnih organa, prezentacijom autoantigena T-stanicama i sekrecijom citokina koji podržavaju upalni milje. Klasični eksperimentalni model EAE ima ograničenu vrijednosti s obzirom na umjetne metode indukcije (adjuvantna imunizacija, prijenos stanica imunskog sustava). Alternativno, izrađena su dva transgenična animalna, mišja modela koja spontano razvijaju autoimunosni encefalomijelitis baziran na međudjelovanju autoimunih T i B-stanica. Mišji model optikospinalnog encefalomijelitisa (OSE) dvostuko transgeničan C57BL/6 s T-staničnim receptorom na T-stanicama usmjerenim na MOG i B-stanicama s „knocked-in“ teškim lancem specifičnim za MOG. Incidencija autoimunskog encefalomijelitisa u ovoga je modela iznosila oko 60%, a lezije su bile isključivo ograničene na optički živac i kralježničnu moždinu, s pošteđnom moždanog tkiva. Suprotno, drugi je mišji model (RR miš) transgenični SJL/J miš s MOG reaktivnim transgeničnim TCR-om eksprimiranim na više od 70% CD4<sup>+</sup> T-stanica rezultirao razvojem relapsno-remitirajućeg autoimunskog encefalomijelitisa u približno 100% slučajeva. U oba modela razvoj je bolesti značajno ovisio o intaktnoj crijevnoj mikrobioti. Animalni modeli čija crijeva nisu bila kolonizirana bakterijama nisu razvili EAE, no kada bi ih kolonizirali fekalnim uzorcima bolest bi se ubrzo pojavila. B-stanice u oba modela imaju značajnu ulogu. U OSE modelu, internaliziraju topljivi MOG antigen (prisutan i manjoj koncentraciji), obrađuju ga i prezentiraju srodnim T-stanicama, amplificirajući tako proces autoimunog odgovora. Nasuprot tome, u RR mišjeg modela uloga je B-stanica koncentrirana na proizvodnju demijelinizirajućih autoantitijela. Ovo je opažanje značajno budući da u ovog modela nije manipulirano B-staničnim repertoarom, a ipak se od 4. tjedna pojavljuju anti-MOG protutijela u plazmi koja prepoznaju konformacijske MOG epitope na površini mijelina, a kad ih se transferira u miševe s blagim, nedemijelinizirajućim lezijama stvaraju velike konfluentne lezije s izrazitom destrukcijom mijelina, kreirajući patološki uzorak koji nalikuje plakovima koje nalazimo u MS-u. B-stanice ključne su u patogenetskoj osnovi budući da miševi u kojih su B-stanice odstranjene nisu razvili EAE. Regrutacija MOG reaktivnih B-stanica ovisi o dostupnosti MOG-a: u MOG-knockout miševa s potpunom ekspresijom RR T-staničnog receptora neće doći do stvaranja anti-MOG protutijela. Dodatno, stvaranje protutijela ovisi o mikrobioti: u RR miševa koji nisu kolonizirani bakterijama neće se formirati anti-MOG autoantitijela niti će doći do razvoja EAE. Za razliku od klasičnog modela, u prethodno opisanih eksperimentalnih modela encefalomijelitis se razvija spontano što omogućuje istraživanje početnih stadija autoimune bolesti, a to uključuje interakciju crijevne mikrobiote s autoimunim T i B-staničnim klonovima u stanju mirovanja te genetske faktore koji sudjeluju u regulaciji tih procesa. [10] S druge strane, pokazano je da prisutnost

proinflamatornih citokina u subarahnoidalnom prostoru u MOG-induciranom EAE može dovesti do meningealne inflamacije i ekstenzivne subpialne demijelinizacije. [16]

## 8. Monoklonska protutijela

Protutijela (imunoglobulini) su heterodimerni glikoproteini sastavljeni od dvaju teških i dvaju lakih (polipeptidnih) lanaca, povezanih disulfidnim vezama u razini spojnice (Slika 3).



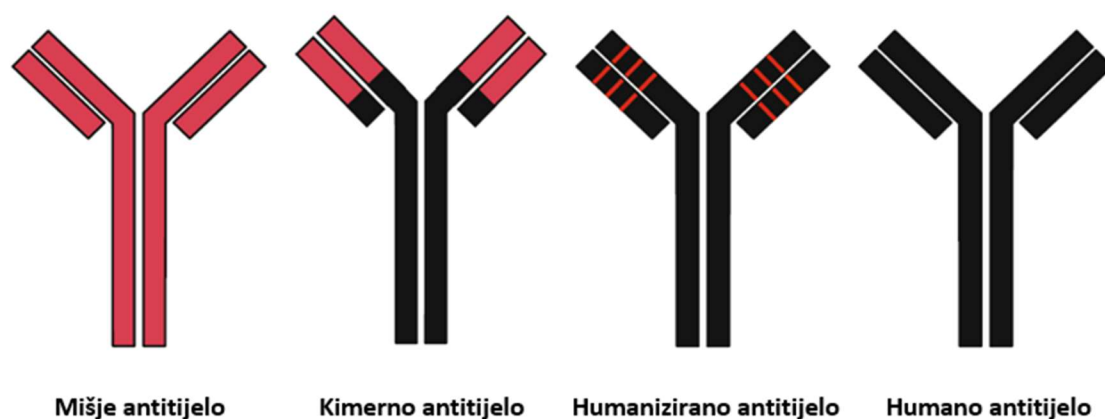
**Slika 3. Temeljna četverolančana struktura protutijela** (preuzeto i prilagođeno iz [19])

Proizvod su završnih diferencijacijskih stadija B-limfocita, odnosno plazma stanica. Funkcionalno se molekulu može razdvojiti u dvije domene – varijabilnu, koja prepoznaje antigene i konstantnu, koja obavlja efektorske funkcije neovisne o specifičnosti, poput aktivacije komplementa ili vezanja za Fc receptore. Varijabilne se domene kreiraju posredovanjem kompleksnih sljedova pregradnje gena, nakon čega su podložni nastanku somatskih hipermutacija, a nakon ekspozicije antigenima, kako bi se ostvarilo afinitetno sazrijevanje. Svaka se varijabilna regija može podijeliti u tri hipervarijabilne regije (CDR) i četiri relativno konstantna odsječaka osnovnog kostura (FR). Varijabilna regija, odnosno regija koja određuje komplementarnost (CDR), sastoji se od tri hipervarijabilne regije teškog lanca i tri hipervarijabilne regije lakog lanca koji određuju konfiguraciju antigenskog veznog mjesta. Pet je osnovnih razreda imunoglobulina: IgG, IgA, IgD, IgE i IgM, a međusobno se razlikuju u teškom lancu. IgG se dalje dijeli u 4 podklase različitih bioloških svojstava: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4; IgA se slično dijeli na IgA1 i IgA2. Promjena konstantne domene teškog lanca dopušta alteraciju efektorske funkcije, a istodobno zadržava antigensku specifičnost.

Od svih izotipova, IgG i njegovi derivati tvore okvir za razvoj terapijskih protutijela. [19][20] Monoklonska protutijela su proizvod jednoga klona B-limfocita. [21] Homogeni su preparat protutijela (monovalentna protutijela) identičnih proteinskih sekvenci, stoga i jednakog antigenskog veznog mjesta (vežu isti epitop) i s jedinstvenim afinitetom, interakcijama i biološkim učincima. Tako se razlikuju od poliklonskih antitijela, koja su heterogenih proteinskih sekvenca i prepoznaju različite epitope antigena ili čak različite antigene, a secerniraju ih plazma stanice različitih staničnih linija. In vivo, izlaganje antigenu dovodi do stimulacije, heterogenosti i propagacije velikog broja genetski različitih B-stanica, odnosno imunološki je odgovor na antigen poliklonskoga karaktera. [22][23] Osnovna metoda u proizvodnji monoklonskih protutijela koristi kultivirane stanice, primjerice stanice ovarija kineskog hrčka. Metoda proizvodnje hibridoma stanica koje stvaraju protutijela željene specifičnosti zasniva se na fuziji limfocita B i tumorskih (mijelomskih) stanica, što rezultira većom specifičnošću za antigen i višestrukom učinkovitošću, odnosno većim afinitetom i mogućnošću primjene manje količine protutijela, čime se umanjuje vjerojatnost razvoja serumske bolesti ili drugih neželjenih reakcija na lijek. [24]

### **8.1 Vrste monoklonskih protutijela**

Izvorno, monoklonska protutijela potječu od nehumanih vrsta (primjerice miša ili štakora), a do određenoga se stupnja mogu 'humanizirati' inženjeringom, odnosno supstitucijom različitog broja aminokiselina čime se postiže veža sličnost s humanim sekvencama. U tu se svrhu koristi rekombinantna DNA tehnologija. U pravilu, što je monoklonsko protutijelo sličnije sekvencama izvedenih od čovjeka, manje je vjerojatno da će izazvati imunogene reakcije nakon primjene. Potencijalne neželjene reakcije imunogenosti uključuju infuzijske reakcije, smanjenu efikasnost lijeka i razvoj protutijela na lijek, međutim njihovu je pojavu teško predvidjeti. [22] Poznate su četiri vrste monoklonskih protutijela koja se upotrebljavaju u terapijske svrhe (Slika 4).



**Slika 4. Tri generacije terapijskih protutijela (preuzeto i prilagođeno iz [19])**

Prva upotrebljavana monoklonska protutijela bila su mišja (nastavak –momab), 100% mišjeg porijekla, a proizvedena su tehnologijom hibridoma stanica. Brzo je primijećeno da lako izazivaju stvaranje neutralizacijskih humanih anti-mišjih protutijela, što ih čini neefikasnim i ograničava njihovu daljnju primjenu. Druga generacija, kimerna protutijela (nastavak –ksimab, npr. rituksimab, ublituksimab) sastoje se od konstante humane i varijabilne mišje regije (oko 60 – 70% sekvence je slično humanim protutijelima). Specifičnost za antigen jednaka je mišjim protutijelima, međutim zbog humanog Fc-fragmenta imaju dulji poluvijek i efektorske funkcije slične humanim protutijelima. Međutim, i ova protutijela induciraju razvoj anti-kimernih protutijela. Humanizirana protutijela (nastavak –zumab, npr. okrelizumab) sastavljena su od značajnog dijela humane sekvence (oko 90 – 95%), osim regije koja određuje komplementarnost (CDR) koja je mišjeg podrijetla. S primjenom ovih protutijela bilježi se znatan pad incidencijske stope protutijela na lijek. Napredovanjem molekularno-bioloških tehnika, a kako bi se postigla gotovo potpuna biokompatibilnost, razvijena su potpuno humanizirana (humana) protutijela (nastavak –mumab, npr. ofatumumab), u gotovo 100% sekvenci nalik ljudskim protutijelima. [19]

## 9. Anti-CD20 monoklonska protutijela

Deplecija B-stanica posredovana je anti-CD20 monoklonskim protutijelima. CD20 molekula je transmembranski ionski kanalni fosfoprotein eksprimiran na pre-B-stanicama, nezrelim, zrelim, memorijskim B-stanicama te u manjoj mjeri na ranim plazmablastima, no ne i na limfoidnim matičnim stanicama, pro-B stanicama, kasnim plazmablastima i plazma stanicama. [12] Dodatno, CD20 je eksprimiran i na podskupini T-stanica, no u manjoj količini. Na površini stanice oblikuje tetramere povezane s lipidnim strukturama te se smatra da je uključen u otpuštanje kalcijevih iona iz intracelularnih skladišta (endoplazmatskog

retikulumu) tijekom aktivacije B-stanica, odnosno vezanja B-staničnog receptora na određeni antigen. Biomarker za praćenje direktnih učinaka anti-CD20 monoklonalnih protutijela je molekula CD19, a ne CD20, budući da CD20-antitijela interferiraju s CD20<sup>+</sup> stanicama na analizi protočnom citometrijom. CD19 molekula eksprimirana je na širem spektru B-stanične linije, uz stanice koje eksprimiraju CD20 uključuje i pro-B stanice i kasne plazmablaste. Deplecija B-stanica ovisna je o dozi i nastaje unutar nekoliko sati od početka infuzije terapije, s najnižim vrijednostima otprilike 8 tjedana nakon infuzije. Razine B-stanica nemjerljive su i nekoliko mjeseci nakon početka liječenja, što ovisi o dozi i karakteristikama primjenjenog monoklonskog protutijela. Bez ponovne infuzije, deplecija može perzistirati i do 20 mjeseci (moguće i dulje). Nakon deplecije, dolazi do rekonstitucije naivnih i nezrelih B-stanica, dok su memorijske suprimirane i koncentracija im ostaje niska minimalno 1 – 2 godine. Tako razina proinflamatornih citokina pada, a protuupalnih koje luče regulatorne B-stanice raste. Osim toga, bilježi se smanjena proliferacija CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-stanica i proizvodnja proinflamatornih citokina uz povećan broj regulatornih T-stanica. [2][12][13]

### **9.1 Mehanizmi djelovanja anti-CD20 monoklonskih protutijela**

Osnova farmakološkog djelovanja protutijela je specifična interakcija, odnosno vezanje paratopa za antigensku determinantu. [19] Rekrutacija imunih medijatora se obično odvija putem interakcija s Fc-ulomkom monoklalnoga protutijela. [22]

Četiri su pretpostavljena mehanizma djelovanja ovih protutijela, a uključuju citotoksičnost ovisnu o komplementu (CDC), citotoksičnost ovisnu o protutijelima (ADCC), uništenje ciljnih stanica putem aktivacije fagocitnog sustava (ADCP) i apoptozu. Sustav komplementa važan je dio prirodne imunosti, a sastavljen je od enzimskih komponenata koje tvore kaskadu tako da svaka djeluje kao katalizator sljedeće. CDC započinje vezanjem komplementne komponente klasičnog puta, C1q, za Fc-regiju protutijela. Nakon vezanja za imuni kompleks, C1q prolazi konformacijsku promjenu rezultirajući aktiviranim kompleksom i započinje kaskadu reakcija koja uključuje ostale komponente sustava komplementa, C2 – C9, i nekolicinu drugih faktora, a završava stvaranjem kompleksa koji napada membranu, konačno dovodeći do osmotskog raspada i lize ciljne stanice. RTX, a djelomice i ofatumumab (anti-CD20 monoklonsko protutijelo novije generacije) svoje učinke prominentno ostvaruju ovim putem. [2][19] ADCC je mehanizam stanicama posredovane imunosti, kojim efektorske stanice imunskog sustava aktivno izazivaju lizu ciljne stanice obložene specifičnim antitijelima. Zbog ovisnosti o prethodnom djelovanju protutijela, ubraja se u mehanizme stečene imunosti. Klasično je posredovan NK stanicama, monocitima ili makrofazima. NK stanice su glavni medijatori ADCC-a. Nakon što vežu Fc-fragment preko FcγRIII receptora, otpuštaju citokine poput IFN-γ i citotoksičnih granula (perforina, granzima) koji ulaskom u ciljnu stanicu pokreću apoptozu. [9][19] Treći mehanizam uključuje fagocite,

stanice u koje se ubrajaju monociti, makrofazi i srodne stanice mononuklearnog fagocitnog sustava poput mikroglije u mozgu. Na Fc-ulomak protutijela koja oblažu stanice, makrofazi se vežu svojim FcγRIIIa receptorom dovodeći do fagocitoze i posljedične enzimske razgradnje stanice. [25] Uz prethodno navedene efektorske funkcije, monoklonska protutijela mogu direktnim djelovanjem izazvati programiranu staničnu smrt, odnosno apoptozu. Apoptoza je karakterizirana degradacijom nuklearne DNA, nuklearnom degeneracijom i kondenzacijom, te fagocitozom preostale stanice. [2][19]

S obzirom na mehanizam kojim dovode do deplecije B-stanica i karakteristika vezanja za CD20 molekulu, razlikuju se dva tipa anti-CD20 protutijela. Tip I protutijela nakon vezanja na CD20 molekulu na površini stanice limfocita dovodi do nakupljanja agregata CD20 molekula u lipidnim strukturama učinkovito dovodeći do aktivacije CDC-a. Tip II protutijela ne dovodi do križnog povezivanja CD20 molekula te ne aktivira sustav komplementa. Umjesto toga inducira programiranu smrt stanica i to u većoj mjeri od protutijela tipa I. Oba tipa protutijela induciraju ADCC i ADCP. [13]

#### **10. Predstavnici anti-CD20 monoklonskih protutijela**

Četiri su predstavnika anti-CD20 monoklonskih protutijela primijenjena u liječenju MS-a: rituksimab, okrelizumab, ofatumumab i ublituksimab. Sva četiri pripadaju protutijelima tipa I i lijekovima koji modificiraju tijek bolesti. Primjena ove terapije dovela je do usporenja progresije bolesti, smanjenja aktivnosti i stope relapsa bolesti. Osim na B-stanice ostvaruju djelovanje i na CD20<sup>+</sup> T-stanice, što parcijalno objašnjava smanjenje upalne aktivnosti. Dodatno, deplecijska B-stanična terapija povećava broj regulatornih T-stanica i smanjuje aktivnost T-stanica s obzirom na smanjeni broj antigen-prezentirajućih B-stanica nakon primjenjenog liječenja. Svi navedeni lijekovi ispitivani su u RRMS-u dok je okrelizumab prvi lijek odobren u terapiji PPMS-a. [7][13]

Tablica 1 - Pregled anti-CD20 monoklonskih protutijela (modificirano prema [13])

Protutijelo	Molekularna struktura	Poluvijek $\tau_{1/2}$ (dani)	Efektorski mehanizam		Kliničke studije
			CDC	ADCC	
Rituksimab	Kimerno IgG1	18 (5.17 - 77.5)*	++	++	RRMS HERMES faza II PPMS OLYMPUS faza III
Okrelizumab	Humanizirno IgG	26	+	+++	RRMS faza II RRMS OPERA I+II faza III PPMS ORATORIO faza III
Ofatumumab	Humano IgG	14 (2.3 - 61.5)*	+++	++	RRMS faza II RRMS MIRROR faza II RRMS ASCLEPIOS I+II faza II
Ublituksimab	Kimerno IgG1 (niski sadržaj fukoze)	—	+	++++	RRMS faza II RRMS faza II (u tijeku)

ADCC citotoksičnost ovisna o protutijelima, CDC citotoksičnost ovisna o komplementu, Ig imunoglobulin, PPMS primarno-progresivna multipla skleroza, RRMS relapsno-remitirajuća multipla skleroza, \* preuzeto iz studije koja je razvijala lijek za liječenje reumatoidnog artritisa, \*kronične limfocitne leukemije

### 10.1 Rituksimab (RTX)

RTX je kimerno IgG1 anti-CD20 protutijelo i prototip je monoklonskog protutijela tipa I. Uglavnom aktivira CDC, a u manjoj mjeri i ADCC. [13] Lijek je inicijalno evaluiran u open-label studiji faze I na 26 bolesnika s RRMS-om što je uključivalo primjenu dvije infuzije od 1 grama u razmaku od 2 tjedna (1. i 15. dan) na početku studije te ponovljenu primjenu nakon 24 tjedana s ukupnim praćenjem od 72 tjedna. [26] U više od polovice oboljelih (65.4%) prvi je ciklus bio praćen neželjenim reakcijama na infuziju lijeka, dok je u drugom zabilježen značajno manji broj reakcija (8%). Neželjeni učinci manifestirali su se kao blagi do umjereni u 77% ispitanika, a rjeđe u obliku težeg umora, glavobolje ili mišićne slabosti. Broj je godišnje stope relapsa smanjen s 1.27 iz prethodne godina na 0.18 u 72. tjednu od početka liječenja, dok je većina bolesnika (80.8%) ostala u remisiji. Istodobno je došlo i do smanjenja broja gadolinijem pojačanih (Gd+) lezija. Prije početka primjene lijeka srednji broj Gd+ lezija po bolesniku iznosio je 1.31, dok je četiri tjedna nakon započetog liječenja taj broj iznosio 0.73, nakon 48 tjedana 0.05, a nakon 72 tjedna 0.0. Također je zabilježeno smanjenje broja lezija na T2 mjernim snimkama s 0.92 (4 tjedna nakon primljene infuzije) na 0.0 nakon 72 tjedana. [13][27]

Zatim je, u dvostruko-slijepoj, placebo kontroliranoj randomiziranoj (HERMES) studiji, provedena faza II kliničkog ispitivanja čiji je cilj bio evaluirati učinkovitost i sigurnost lijeka tijekom 48 tjedana. Studija je uključila 104 bolesnika s RRMS-om, od kojih je nakon randomizacije 69 bolesnika primilo 1 gram RTX-a 1. i 15. dan. Usporedbom s placebo bilježi se relativno smanjenje (kumulativnoga broja) Gd+ lezija za 91% (u 12., 16., 20. i 24. tjednu) te smanjenje stope relapsa od 58% u 24. tjednu i 50% u 48. tjednu. Potpuni učinak RTX-a na prevenciju nastanka novih lezija opaža se unutar 12 tjedana od prve primijenjene doze, što je znatno ranije od vremena koje bi bilo potrebno za primjetnu depleciju patogenih



antitijela. Takav nalaz ponovno upućuje na posredovanje B-stanične funkcije neovisne o protutijelima u patofiziologiji MS-a. Dodatno, smanjenje volumena lezija na T2 mjernim snimkama nakon 36 tjedana bilo je veće u bolesnika koji su primali RTX u usporedbi s placebo. Reakcije na infuziju mogu nastupiti unutar 24 sata od infuzije. Reakcije gradusa 1 ili 2 češće su prijavljene u bolesnika koji su primali RTX, preciznije u 92.6% bolesnika u usporedbi s 40% u placebo skupini. Također, učestalije su i teže reakcije (gradusa 3) u bolesnika koji su primali RTX (7.4%), a manifestiraju se kao vrućica, groznica i hipotenzija, odnosno kao simptomi konzistentni sa sindromom otpuštanja citokina tijekom lize B-stanica. Međutim, isto se ne prati nakon druge infuzije kada incidencija reakcija na infuziju RTX-a nije prešla onu u placebo skupini. U otprilike četvrtine bolesnika do 48. tjedna detektiran je razvoj anti-kimernih protutijela na RTX, koji nije koreliralo s incidencijom reakcija na infuziju.

[2][13][28]

Druga dvostruko-slijepa placebo kontrolirana, multicentrična (OLYMPUS) studija u fazu II/III ispitivanja uključila je 439 bolesnika s PPMS-om randomiziranih u omjeru 2:1 na primanje ponavljanih infuzija RTX-a (dvije infuzije u razmaku od 2 tjedna 1 grama RTX-a) ili placebo svaka 24 tjedna kroz 96 tjedana, koji su zatim praćeni kroz 122 tjedna. Studija nije pokazala značajno smanjenje progresije bolesti. Međutim, u podskupini bolesnika mlađih od 51 godine, a osobito u kojih su detektirane aktivne inflamatorne lezije, pronađeno je usporenje progresije bolesti i smanjenje Gd+ lezija u prethodno spomenutom razdoblju, dovodeći tako do zaključka da bi terapija mogla biti učinkovita u mlađih bolesnika oboljelih od PPMS-a s aktivnom bolešću, odnosno s Gd+ lezijama na T1 mjernim snimkama. U bolesnika koji su primali RTX očekivano se češće bilježe reakcije na infuziju lijeka, uglavnom blagog do umjerenog karaktera i nakon prve primljene doze lijeka. Teže nuspojave prijavljivane su nešto češće u RTX skupini, 16.4% u usporedbi s 13.6% bolesnika na placebo, dok je obolijevanje od težih infekcija bilo izraženije u bolesnika koji su primali RTX (4.5%) u usporedbi s placebo (< 1%); stope su slične zapaženima u HERMES studiji. U četvrtine bolesnika liječenih RTX-om detektirana su protutijela na dani lijek nešto više od 11 mjeseci nakon početka liječenja, no nije nađeno povezanosti s nuspojavama ili utjecaja na učinkovitost primljene terapije. U švedskoj kohorti veći je bio postotak bolesnika s razvojem protutijela na dani lijek, točnije 37% bolesnika s RRMS-om te 26% s PPMS-om. Međutim, primijećen je pad titra istih protutijela s ponavljanim infuzijama RTX-a. Postojanje protutijela na dani lijek povezano je s nepotpunom deplecijom B-stanica, no samo je u četiri bolesnika od cijele kohorte od 339 bolesnika prekinuto liječenje, a kako je prethodno navedeno, nije nađeno povezanosti titra protutijela s učestalošću nuspojava ili reakcija na infuziju lijeka.

[2][13]

Jedna manja MR studija faze II uključila je 30 bolesnika s RRMS-om koji su imali relaps bolesti, odnosno minimalno jednu novu Gd+ leziju na T1 mjernoj snimci i novi relaps unutar

18 mjeseci prije uključenja u studiju, a dok su bili na injekcijskoj terapiji lijekovima koji mijenjaju tijek bolesti, poput interferona- $\beta$ 1a/b (IFN- $\beta$ 1a/b) ili glatiramer acetata (GA). Cilj studije bila je evaluacija sigurnosti, učinkovitosti i podnošenja RTX-a u kombinaciji s postojećom terapijom u dozi od 375 mg/m<sup>2</sup> intravenski (iv.) 4 puta tjedno. S obzirom na radiološku aktivnost bolesti, 74% snimaka MR-a nakon primijenjene terapije bilo je bez vidljivih Gd+ lezija u usporedbi s 26% istih na početku studije. Kombinacija RTX-a i standardnih lijekova koji modificiraju bolest uglavnom se dobro podnosi, s malo zabilježenih nuspojava. [2] Nadalje, ekstenzivna retrospektivna multicentrična studija koja je uključila veliku kohortu švedskih bolesnika, 822 bolesnika praćenih otprilike 22 mjeseca, od kojih 557 s RRMS-om, 198 s SSPM-om te 67 s PPMS-om, primala je RTX „off-label“. Rezultati studije, u skladu s randomiziranim kliničkim studijama, sugeriraju sigurnost i efikasnost RTX-a u terapiji MS-a barem 2 godine od zadnje infuzije lijeka. Studija je pokazala nisku godišnju stopu relapsa tijekom liječenja (redom 0.044, 0.038 i 0.015), no bez kontrolne skupine ovi rezultati samo upućuju na učinkovitost RTX-a. Broj Gd+ lezija znatno se smanjio otprilike 3 mjeseca nakon početka liječenja na 0.054 po MR snimku, odnosno lezije su bile prisutne na 2.2% svih MR snimaka u usporedbi s 26.2% bolesnika koji su imali lezije prije početka liječenja kada je broj lezija po MR snimku prosječno iznosio 0.8 [SD, 2.3]). Ocjenjeno stanje EDSS-om u periodu praćenja bilo je nepromijenjeno ili se povećalo za 0.5 i 1 bod u sekundarno, odnosno primarno progresivnom obliku bolesti. [13][29]

Još je jedna švedska studija pokazala visoku efikasnost RTX-a kao prve linije terapije, te nižu stopu aktivnosti bolesti u usporedbi s bolesnicima koji su koristili injekcijski oblik terapije ili dimetil fumarat (DMF), kao i nižu stopu prestanka liječenja u usporedbi s ostalim oblicima, uključujući fingolimod (FNG) i NTZ. Manja retrospektivna studija iz SAD-a koja je uključila bolesnike koji su liječeni RTX-om minimalno 1 godinu između 2005. i 2016. godine u kohorti bolesnika s RRMS-om pokazala je nisku godišnju stopu relapsa (0.005), dok je 87% (20 bolesnika) bilo klinički stabilno pod terapijom na kraju studije. [13][30]

Još jedna švedska studija uključila je 75 bolesnika s klinički stabilnim RRMS-om čija je terapija GA-om ili IFN- $\beta$ -om zamijenjena RTX-om, a nakon čega se broj Gd+ lezija s 0.37 smanjio na 0.003 po pojedinom bolesniku. S druge strane, nedostatna učinkovitost RTX-a u terapiji PPMS-a pripisivala se niskim koncentracijama lijeka u CSF-u nakon iv. primjene, nedovoljnima da utječu na kompartmentaliziranu upalu SŽS-a za koju se vjeruje da je u podlozi progresivne MS. [13] Stoga je dvostruko slijepa RIVITALISE studija ispitala učinak iv. i intratekalne kombinacije RTX-a u usporedbi s placebo. Iako je intratekalna injekcija RTX-a dovela do potpune deplecije B-stanica u CSF-u, taj je učinak potrajao tek 3 mjeseca. Osim toga, rezultirala je nepotpunom deplecijom B-stanica u tkivu SŽS-a, bez deplecije T-stanica ili promjene u koncentraciji NFL-a. Smanjenoj efikasnosti RTX-a u SŽS-u doprinijele su nepostizanje adekvatne koncentracije u CSF-u, parcijalna djelotvornost putem ADCC-a,

nedostatak litičke komponente komplementa s manjkavom citotoksičnošću ovisnom o komplementu i manjak citotoksičnih CD56<sup>+</sup> NK stanica. Iako je u konačnici obustavljena, studija je dodatno potvrdila težinu prodiranja lijeka u upalom zahvaćene meningealne ovojnice i SŽS. Razvoj RTX-a u svrhu liječenja MS-a nikada nije dovršen, međutim još se uvijek koristi „off-label“. [12]

### 10.1.1 Sigurnost i tolerancija

S obzirom na dugotrajni učinak na staničnu i humoralnu imunost te da se radi o kimernoj molekuli, RTX ima prilično prihvatljiv sigurnosni profil. Reakcije povezane s primjenom infuzije čine najveći postotak nuspojava, a počinju se javljati otprilike 30 – 120 minuta od primjene prve infuzije i njihov se broj sa idućim ciklusima infuzija smanjuje. Preciznije, bilježe se reakcije potencijalno povezane s degranulacijom mastocita a uključuju urtikariju, angioedem, mučninu, groznicu, vrućicu, vrtoglavicu, bol u faringolaringealnom području, pruritus, osip, crvenilo, bronhospazam, akutni respiratorni distres sindrom (ARDS) i hipotenziju. Međutim, prijavljeni su izolirani slučajevi pojave Kounisova sindroma (vazospastički ili tromboembolijski događaji koji kompliciraju anafilaktoidne epizode, a vjerojatno potaknuti IgE protutijelima specifičnima za monoklonska protutijela koja induciraju lokalnu ili sistemsku degranulaciju mastocita) ili srčanih aritmija uslijed citokinskih oluja povezanih sa sindromom sistemnog upalnog odgovora (SIRS)). Iako postoje upozorenja da tijekom ili nakon provođenja liječenja monoklonskim protutijelima (ovdje naznačeno za RTX) može doći do razvoja ozbiljnih bakterijskih, gljivičnih ili virusnih infekcija, uglavnom se bilježe u sličnom postotku kao u kontrolnim skupinama (69.6% nasuprot 71.4% u HERMES studiji te u više od 10% u obje skupine u OLYMPUS studiji). Među svim prijavljivanim infekcijama, sinusitis i infekcije mokraćnog sustava nešto su bile češće u bolesnika liječenih RTX-om. Što se tiče težih nuspojava koje su zahtijevale liječenje, njihova je pojava opažena u 14% bolesnika liječenih RTX u velikoj multicentričnoj studiji iz tri centra u Švedskoj. Osim toga, u uputama o lijeku je upozoreno na povećan rizik od razvoja progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML) uzrokovane infekcijom JC (John Cunningham) virusom, iako pojava iste nije zabilježena. Međutim, godišnja incidencija PML-a u bolesnika s RA-om liječenih RTX-om iznosi manje od 1:25000, dok je udio bolesnika u kojih se razvoj bolesti može pripisati RTX vjerojatno i manji budući da su bolesnici bili liječeni ili su konkomitantno primali i drugu imunosupresivnu terapiju odnosno bili liječeni transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica. Niti jedan slučaj PML-a nije zabilježen u velikoj multicentričnoj studiji unatoč serumskoj detekciji antitijela na JC virus (seropozitivnost) u 83.6% bolesnika. Međutim, nekoliko bolesnika je u trenutku provođenja studije bilo na terapiji RTX više od 24 mjeseci. Osim toga, postoji opasnost od reaktivacije latentne hepatitis B infekcije, osobito u bolesnika s kroničnim hepatitisom B (HBs-Ag pozitivni) u kojih je taj rizik

relativno visok s varijabilnim izvještajima studija, između 27 i 80%, i bolesnika s preboljenom HBV infekcijom (HBsAg-negativni/cAb-pozitivni). Profilaktička terapija lamivudinom, entekavirom ili tenofovirom pokazala se učinkovitom u smanjenju rizika reaktivacije HBV infekcije i s time povezanog mortaliteta u HBsAg-pozitivnih bolesnika s visokim rizikom od reaktivacije. Osim toga, nakon provedene terapije rijetko se opažaju teške mukokutane reakcije, poput paraneoplastičnog pemfigusa, Stevens-Johnsonova sindroma i toksične epidermalne nekrolize. Nadalje, opaženo je pojavljivanje hipogamaglobulinemije (posebno za IgG i definirane kao koncentracija IgG-a manja od 7 g/L) te se postavlja pitanje relevantnosti tog nalaza u određivanju doza i intervala u kojima bi bilo sigurno primjenjivati RTX u liječenju autoimunih poremećaja s obzirom na povećan rizik razvoja ozbiljnih infekcija (definirane potrebom hospitalizacije i iv. primjene antibiotika). IgM hipogamaglobulinemija se češće bilježi, no manje je klinički značajna od IgG hipogamaglobulinemije, a IgA deplecija se rjeđe nalazi (IgG 38%, IgM 56%, IgA 18% u kohorti s poremećajima iz NMO-spektra liječenih RTX-om). Hipogamaglobulinemija se nalazi u više od 1/2 bolesnika liječenih srednje dugo do dugotrajno B-staničnom deplecijskom terapijom zbog optičkog neuromijelitisa ili poremećaja iz NMO-spektra, preciznije u 64% slučajeva britanske kohorte od 50 bolesnika, 52% u talijanskoj kohorti koju je činio 21 bolesnik, bez obzira na to što plazma stanice koje secerniraju protutijela nisu primarno mjesto djelovanja anti-CD20 monoklonskih protutijela. Anti-CD20 monoklonskim protutijelima inducirana hipogamaglobulinemija akumulira se u uzastopnim ciklusima terapije, s tipičnim vrhuncem nakon nekoliko ciklusa primjene lijeka (srednjih vrijednosti IgG-a od 4.5 g/l nakon otprilike 3.4 godine primjene RTX-a), a što je vjerojatno posljedica deplecije CD27<sup>+</sup> memorijskih B-stanica, plazmablasta te plazma stanica u koštanoj srži (zbog nepovoljnog utjecaja na sazrijevanje naivnih B-stanica) ili zbog povećane vjerojatnosti interakcije T-stanica s APC-om različitim od B-stanica. Nadalje, zbog navodne povezanosti terapije RTX-om i nastanka malignih bolesti prezentirani su podaci retrospektivne studije koja je obuhvatila švedsku kohortu od 6331 ispitanika kojoj je primarni cilj bio usporediti omjere incidencija bilo kojeg malignog tumora ili malignog tumora dojke u žena u liječenih RTX-om ili drugom terapijom koja modificira tijek bolesti. Omjer rizika (hazard ratio, HR) nakon provedene analize pokazao je da je rizik razvoja malignog tumora uključujući i tumor dojke u RTX liječenih ispitanika usporediv s onim u općoj populaciji. Dodatno, američka i švedska retrospektivna studija uključile su otprilike 2700 oboljelih od MS-a koji su primili prvu infuziju RTX-a između 2011. i 2017. godine (KPRS i COMBAT-MS kohorte) koje nisu detektirale povezanosti infuzije lijeka i smrtnog ishoda. U obje je studije zabilježeno 17 smrtnih slučajeva, no niti jedan unutar 2 tjedna od zadnje infuzije RTX-a. Međutim, kohorte ispitanika bile su relativno nehomogene, s ispitanicima u KPSC studiji koji su se činili podložnijima razvoju kardiovaskularnih poremećaja. [2][26][31]

### 10.1.2 Usporedba s drugim lijekovima koji mijenjaju tijek bolesti

Multicentrična, opservacijska studija koja je obuhvatila kohortu od 256 bolesnika s RRMS-om iz 3 centra u Švedskoj uspoređivala je terapiju RTX-om s FNG-om u bolesnika koji su inicijalno liječeni NTZ-om te nakon seropozitiviteta na JC virus prebačeni na naveden lijekove. Opisan je veći omjer učinkovitosti i tolerabilnosti za RTX, koji je doveo ne samo do smanjenja broja Gd<sup>+</sup> lezija na T1 mjernim snimkama (1% u bolesnika liječenih RTX-om nasuprot 16% u skupini liječenih FNG-om) i novih cerebralnih T2 lezija, te kliničkih relapsa u usporedbi s FNG-om (relapsi su zabilježeni u 2% bolesnika na terapiji RTX-om, a u 18% na FNG-u), već je povezan i s manjom pojavom nuspojava (5% u RTX skupini nasuprot 21% u liječenih FNG-om) u periodu praćenja od 78 tjedana. Međutim, utjecaj na rizik od razvoja PML-a nakon prelaska na terapiju RTX-om i utvrđivanje vremena kada bi trebalo prijeći na drugi oblik terapije ostaje upitan nakon provođenja ove studije. [13]

Visoko aktivni lijekovi koji modificiraju tijek bolesti poput RTX-a povezani su s povećanim rizikom razvoja infekcija u usporedbi sa standardnom injekcijskom terapijom koja modificira tijek bolesti (IFN- $\beta$  i GA). Retrospektivna studija koja je uključila kohortu svih švedskih bolesnika s MS-om koji su započeli liječenje RTX-om (3260 bolesnika) između 2011. i 2016. godine ukazuje na sličan rizik razvoja ozbiljnih infekcija u bolesnika liječenih RTX-om (stopa incidencije je iznosila 19.7/1000 osoba-godina) i bolesnika na terapiji NTZ-om (11.4/1000 osoba-godina) ili FNG-om (14.3/1000 osoba-godina), no povećan u usporedbi s IFN- $\beta$ /GA (8.9/1000 osoba-godina) i općom populacijom (5.2/1000 osoba-godina). Nasuprot tome, zabilježena je znatno veća stopa primjene antivirusne terapije za infekciju herpes virusom u osoba liječenih NTZ-om i FNG-om u usporedbi s RTX-om i IFN- $\beta$ /GA-om, a nakon prilagodbe za karakteristike bolesnika HR za NTZ iznosio je 1.61, a za FNG 1.70 u usporedbi s RTX-om. Međutim, nije detektirano fatalnih slučajeva što se dijelom može pripisati korištenju kliničkih smjernica za smanjenje rizika povezanih s varičelom u terapiji FNG-om odnosno JC virusom u terapiji NTZ-om. Biološko objašnjenje za razlike među FNG-a i NTZ-a nasuprot RTX-a mogao bi biti stupanj do kojeg određeni lijek koji modificira tijek bolesti utječe na antivirusni odgovor T-stanica. Nadalje, zabilježana su dva slučaja PML-a (jedan u bolesnika koji je primao FNG i drugi na terapiji RTX-om). U oba slučaja, terapija navedenim lijekovima tek je započeta nakon prelaska s liječenja NTZ-om, što je konzistentno sa subkliničkom „carry-over“ infekcijom, dijagnosticiranom pri pojavi imunosnog rekontitucijskog sindroma kada koncentracije NTZ-a padnu ispod praga potrebnog za sprječavanja migracije T-stanica preko BBB-a. [32] Druga retrospektivna studija na uzorku od 494 bolesnika s RRMS-om iz švedskog registra za MS ističe da je RTX superiorniji s obzirom na tolerabilnost (godišnja stopa prestanka uzimanja lijeka za RTX je iznosila 0.03 nasuprot 0.53 za IFN- $\beta$ 1a/b/GA, 0.32 za DMF, 0.38 za FNG i 0.29 za NTZ) i učinkovitost u usporedbi sa

standardnom terapijom koja modificira tijek liječenja. Zbog kimernog karaktera molekule, rizik razvoja antitijela na lijek, osobito humanih anti-kimernih protutijela (HACA) je veći u RTX-a nego u modernijih srodnih predstavnika anti-CD20 skupine monoklonalnih protutijela. Veliko istraživanje švedskog registra za MS detektiralo je antitijela na lijek u serumu 37% od 238 bolesnika s RRMS-om i u 26% od 101 bolesnika s progresivnim oblikom bolesti. Autori opisuju korelaciju između prisutnosti protutijela na lijek i titra istog s nepotpunom deplecijom B-stanica. Međutim, unatoč tome što je većina bolesnika prekinula terapiju RTX-om tijekom njihova praćenja, nije nađeno povezanosti između titra protutijela na lijek i kliničkih ishoda ili reakcija na infuziju lijeka. Živa cjepiva kontraindicirana su tijekom terapije RTX, stoga je cjepiva koja su nužna (primjerice VZV cjepivo) potrebno primijeniti prije započinjanja terapije RTX-om. Za bolesnice generativne dobi važno je istaknuti da je primjena RTX-a tijekom trudnoće kontraindicirana prema trenutno važećim smjernicama te je neophodna primjena kontracepcije za vrijeme liječenja. Trenutno se ne preporučuje trudnoća unutar 6 – 12 mjeseci od primjene posljednje infuzije rituksimaba RTX-a. [2][33]

## 10.2. Okrelizumab (OCR)

OCR je za razliku od prethodno opisanog RTX-a, humanizirano IgG1 protutijelo tipa I. Epitopi koje vežu OCR i RTX preklapaju se na velikoj petlji CD20 molekule. Međutim, zbog većeg afiniteta konstantne (Fc) domene OCR-a za FcγRIII na NK stanicama, aktivnost se OCR-a očituje pojačanom ADCC-om i smanjenom CDC-om u usporedbi s RTX-om. Lijek je razvijen imajući na umu smanjenje imunogenosti, odnosno smanjenje incidencije razvoja protutijela na lijek i reakcija na infuziju lijeka, te ga je 2017. godine odobrila FDA, a početkom 2018. godine EMA za liječenje relapsno-remitirajućeg (prvo odobreno anti-CD20 monoklonsko protutijelo) i primarno-progresivnog oblika bolesti (prvi općenito odobren oblik farmakoterapije).

Učinkovitost i sigurnost ovog lijeka ispitana je u randomiziranoj, multicentričnoj, placebo kontroliranoj studiji faze 2 u 218 bolesnika s RRMS. U studiju uključeni ispitanici imali su 18 – 55 g., sa dva ili više relapsa unutar prethodne 3 godine i jednim unutar prethodne godine, EDSS score između 1.0 i 6.0 te dokazanu inflamatornu aktivnost sa šest ili više T2 lezija na MR-u, ili dva relapsa unutar prethodnih 12 mjeseci. Studija je uključila prvu skupinu koja je u 1. ciklusu primila placebo 1. i 15. dan, te nisku dozu (600 mg) OCR-a u dvije doze 1. i 15. dana drugoga ciklusa (24. tjedan), drugu skupinu koja je primila nisku dozu OCR-a u dvije doze 1. i 15. dana 1. ciklusa, te 600 mg 1. dana drugoga ciklusa, dok je treća skupina primila visoku dozu (2000 mg) iv. OCR-a u dvije doze 1. i 15. dana prvog, te 1000 mg 1. dana drugog ciklusa. U četvrtoj skupini je primijenjen IFN-β-1a u dozi od 30 µg intramuskularno jednom tjedno uz 600 mg OCR-a u 24. tjednu. Zabilježeno je značajno smanjenje Gd+ lezija na T1 mjernim snimkama u obje skupine koje su primale OCR u usporedbi s placebo (5.5 u

placebo skupini nasuprot 0.6 u skupini koja je primala 600 mg OCR-a, odnosno 89% relativnog smanjenja, te 0.2 u bolesnika koji su primali 2000 mg OCR-a, s 96% relativnog smanjenja). Podupirući opažanja iz RTX HERMES studije, značajno smanjenje radiološke aktivnosti bolesti bilo je vidljivo već 8 tjedana od primjene prve doze u obje skupine liječene OCR-om. [2][34] Slično je i prosječan broj novih ili povećavajućih T2 lezija u 24. tjednu smanjen u obje skupine koje su primale OCR (0.0) u usporedbi s placebo-skupinom (1.4) i onima koji su primali IFN- $\beta$  (1.8). Nije primijećeno statističke razlike u ukupnom volumenu T2 lezija od početka ispitivanja do 24. tjedna. Dodatno je smanjena i godišnja stopa relapsa u obje skupine koje su uzimale OCR u razdoblju od 24 tjedna (0.13 u bolesnika koji su uzimali 600 mg, 0.17 u bolesnika koji su lijek primali u dozi od 2000 mg), odnosno zabilježeno je relativno smanjenje od 80% i 73% u usporedbi s placebo (0.64) i IFN- $\beta$  skupinom (0.36). Budući da nije nađeno značajne razlike učinaka dviju doza OCR-a, a uz potencijalni smrtni ishod induciran dozom od 2000 mg, daljnje studije koristile su nižu dozu od 600 mg (300 mg iv. 1. i 15. dan, praćeno dozom od 600 mg iv. svakih 6 mjeseci). U nastavku kliničkog ispitivanja (open-label) utvrđena je minimalna MR aktivnost nakon 144 tjedan te niska godišnja stopa relapsa u obje skupine koje su uzimale OCR.

U otvorenoj fazi istraživanja nakon slijepe faze, uz povećanu učestalost reakcija povezanih s infuzijom lijeka s obzirom na placebo skupinu, stope infekcije bile su 6.5% za niske doze te 11.1% za visoke doze OCR-a, a uglavnom se radilo o infekcijama respiratornog i urinarnog trakta. Lijek se dobro tolerira, s reakcijama nakon prvog ciklusa infuzije lijeka kao najčešćim neželjenim događajem. Učinkovitost i sigurnost lijeka dalje je ispitana u fazi III dvije dvostruko-slijepe, randomizirane studije u bolesnika s RRMS-om (OPERA I i OPERA II studije) koje su uključivale 821 i 835 bolesnika randomiziranih (1:1) na primanje 600 mg OCR-a iv. (u dozi od 300 mg 1. i 15. dana, praćeno sa 600 mg iv. svaka 24 tjedna) ili IFN- $\beta$ -1a 44  $\mu$ g supkutano (sc.) tri puta tjedno tijekom 96 tjedana. Primarni ishod studije bio je značajno smanjenje godišnje stope relapsa (ARR) koja je bila 0.29 u skupini liječenih IFN- $\beta$ -om a u skupini liječenih OCR-om kroz 96 tjedana iznosila je 0.16 godišnje. Dodatno je pokazano smanjenje potvrđene progresije onesposobljenosti (CDP) za 40% u skupini liječenih OCR-om nakon 12 i 24 tjedna. Sekundarni ishod je bio potvrđena progresija bolesti prema EDSS-u tijekom dvanaest tjedana koja je smanjenja za 43% (OPERA I) i za 37% (OPERA II studija) u bolesnika liječenih OCR-om u usporedbi s IFN- $\beta$ -1a-om. Zatim, broj Gd+ lezija na T1 mjernim snimkama nakon 96 tjedana smanjen je za 94% (OPERA I) i 95% (OPERA II), a broj novih ili povećavajućih T2 lezija na MR-u za 77% (OPERA I) i 83% (OPERA II) u usporedbi s IFN- $\beta$ -1a. Osim toga, u bolesnika liječenih OCR-om zabilježena je manji gubitak moždanog volumena, preciznije -0.57% i -0.64%, u usporedbi s -0.74% i -0.75% u IFN- $\beta$  skupini. Osim toga, značajno češće (47.9% i 47.5%) se u OCR liječenih bolesnika bilježi stanje bez dokaza aktivnosti bolesti (NEDA -3), što uključuje stanja bez

relapsa bolesti, bez progresije onesposobljenosti, bez Gd+ lezija na T1 mjernim snimkama ili novih T2 lezija, u odnosu na ispitanike liječenih IFN- $\beta$ -1a. Protutijela na lijek razvila su se u 3 od 825 bolesnika, a neutralizacijska u jednog bolesnika. [2][13]

Često prijavljivani neželjeni učinci koji su vjerojatno bili povezani s terapijom OCR-om uključivali su reakcije na infuziju lijeka, nazofaringitis i ostale infekcije gornjeg respiratornog trakta, glavobolju te infekcije mokraćnog sustava, dok su teže nuspojave zabilježene u oko 7% bolesnika. [35]

Dijelom zbog obećavajućih rezultata analiza podskupina OLYMPUS studije, provedena je faza III randomizirane, dvostruko-slijepa i placebo kontrolirane studije (ORATORIO studija) koja je uključila 732 bolesnika s PPMS-om, s randomizacijom bolesnika u omjeru 2:1 koji su primali OCR u dozi od 600 mg iv. (300 mg 1. i 15. dan svakih 24 tjedana) ili placebo svaka 24 tjedna minimalno 120 tjedana. Također, u usporedbi s osnovnim karakteristikama kohorte koju je obuhvatila OLYMPUS studija, u ovoj se studiji radilo o mlađim bolesnicima (srednja dob od 44 godine, nasuprot prosječne dobi od 50 godina u kohorti OLYMPUS studije), kraćem trajanju bolesti (6.7 godina, nasuprot 9 godina) i neznatno nižoj vrijednosti EDSS-a na početku provođenja studije (EDSS 4.5, nasuprot 5.0 u OLYMPUS studiji). Primarni ishod bio je tromjesečni, odnosno šestomjesečni CDP i iznosio je 32.9% i 29.6% u skupini liječenih OCR-om nasuprot 39.3% i 35.7% u placebo skupini. [2][13][36]

Nakon 120 tjedana utvrđeno je pogoršanje brzine hodanja (testom brzine hodanja, T25-FW) za 38.9% u OCR i 55.1% u placebo skupini. Nadalje, nađeno je ukupno smanjenje volumena hiperintenzivnih lezija na T2 mjernim snimkama nakon 120 tjedana u bolesnika liječenih OCR-om (zabilježena promjena od -3.4%), u usporedbi s povećanjem od 7.4% u placebo skupini. Dodatno, prosječan gubitak moždanog volumena u bolesnika liječenih OCR-om iznosio je 0.90% u usporedbi s 1.09% u placebo skupini. Evaluacijom sigurnosti primjene OCR-a ustanovljena je pojava barem jedne nuspojave u 95.1% bolesnika nakon provedene terapije nasuprot 90% u bolesnika koji su primali placebo, dok su teže nuspojave prijavljene u 20.4% liječenih OCR-om, odnosno u 22.2% bolesnika koji su primali placebo, čime se ne nalazi značajnijih razlika između ove dvije skupine. U studiji je prijavljena i povećana učestalost pojavljivanja malignih bolesti - 2.3% OCR skupina u usporedbi s placebo skupinom 0.8%. Apsolutni broj malignih bolesti odgovara onom u općoj populaciji, međutim postoji potreba za razlučivanjem pojavljivanja pojedinih oblika malignih tumora u ovoj populaciji bolesnika. U studijama nije prijavljen niti jedan slučaj PML-a, međutim u postmarketinškom praćenju pojavilo se 8 slučajeva od kojih 7 nakon prelaska s terapije NTZ-om ili FNG-om dok je jedan slučaj označen kao „non-carry over“.

Detaljnijom analizom podskupina koju je zatražila FDA postalo je evidentno da je učinak OCR-a na CDP pod snažnim utjecajem dobi bolesnika: u bolesnika mlađih od 45 godina bio je umjereno smanjen (HR 0.64), dok u starijih od 45 godina gotovo i nije zabilježen učinak



terapije (HR 0.88). [2][12][26] U otvorenoj fazi istraživanja nakon slijepe faze ORATORIO studije, bolesnici koji su primali OCR nastavili su s terapijom, dok je u bolesnika koji su prethodno primali placebo započeta terapija OCR-om. Nakon 5.5 godina (264 tjedna) praćenja, udio bolesnika s progresijom onesposobljenosti mjerenom EDSS-om i testom s devet rupa i klinova (9-HPT) bio je manji u skupini u kojoj je liječenje OCR-om započeto ranije u odnosu na bolesnike koji su inicijalno primali placebo, što pokazuje da su bolesnici u kojih je liječenje OCR-om započeto 3 – 5 godina (144 – 240 tjedana) ranije postigli znatno i konstantno smanjenje CDP-a u usporedbi s bolesnicima koji su s placeba prešli na OCR. [37]

### 10.2.1 Sigurnost i tolerancija

Studija koja je 2010. godine razvijala program uključivanja OCR u liječenju RA obustavljena je, ali ne zbog sigurnosnih pitanja, već zbog korelacije visokih doza OCR u fazi III kliničkog ispitivanja s povećanom pojavom teških oportunističkih infekcija. Tijekom studija koje su pratile učinak terapije u oboljelih od RA, nije nađeno povećane stope incidencije malignih bolesti ili PML-a. Međutim, konkomitantni razvoj drugih imunosupresivnih terapijskih opcija i prosječno viša dob oboljelih od RA sugerirao je viši osnovni rizični profil, tako da su studije koje uključuju razvoj OCR nastavljene samo u MS-u. U fazi II kliničkog ispitivanja MS studije, reakcije povezane s infuzijom lijeka značajno su češće zabilježene u skupinama liječenih OCR-om u dozi od 600 mg (34.5%) i 2000 mg (43.6%) u usporedbi s IFN- $\beta$ -1a (9.3%), dok je u skupini u kojoj je OCR primijenjen u dozi od 2000 mg prijavljen jedan smrtni ishod posljedično SIRS-u komplicirana tijekom. Kao i u slučaju RTX, reakcije na infuziju grupiraju se kratko nakon prve infuzije (25%) i većinom obuhvaćaju reakcije blagog do umjerenog karaktera poput pruritusa, osipa, iritacija grla ili crvenila. Relativno je niža incidencija u usporedbi sa studijama koje su uključivale primjenu RTX, primjerice OLYMPUS studija, vjerojatno zbog primjene antipiretika i antihistaminika prije infuzije lijeka. Slično je zabilježeno u fazi III kliničkog ispitivanja, uz nešto učestaliju pojavu infekcija blagog do umjerenog karaktera u usporedbi sa skupinom liječenih IFN- $\beta$ -1a, uključujući infekcije gornjeg respiratornog trakta (15.2% nasuprot 10.5%), nazofaringitis (14.8% nasuprot 10.2%) i blage kožne infekcije herpes virusom (5.9% nasuprot 3.4%). Osim toga, nađeno je znatno smanjene razine IgM-a u serumu liječenih OCR u obje studije (OPERA i ORATORIO). Štoviše, u ORATORIO studiji, značajno je više prijavljenih malignih bolesti u usporedbi s placebo skupinom (2.3% nasuprot 0.8%), preciznije četiri raka dojke, jedan endometrijski adenokarcinom, anaplastični limfom, histiocitom, metastatski karcinom pankreasa i tri karcinoma bazalnih stanica. Sveukupno, apsolutni broj slučajeva ne prelazi epidemiološka očekivanja, a budući da se bilježi pad incidencije u open-label nastavku studije te različiti maligni tumori nisu svrstali u jednu patološku kategoriju, ne može se pretpostaviti jasan

dokaz uzročne povezanosti. Sličan je nalaz studija koje su ispitivale RTX kao terapijsku opciju RA-a i limfoma. Nije zabilježeno slučajeva PML-a u liječenih OCR-om, međutim 7 slučajeva PML-a prijavljeno je nakon prelaska s terapije NTZ-om ili FNG-om na OCR što se uglavnom opisuje „carry-over“ učinkom. Tek je u 0.4% slučajeva zabilježen razvoj protutijela na OCR u 96-tjednom periodu primjene lijeka, za razliku od znatno veće incidencije (28.5%) u RTX studijama. Važno je međutim naglasiti da to zapažanje nije isključivo posljedica toga što se radi o humaniziranom monoklonskom protutijelu (za razliku od kimernog RTX), već da je razina detektiranih protutijela na lijek u inverznoj korelaciji s primjenjenom dozom lijeka. Nije nađeno kliničke relevantnosti ovih protutijela. Preliminarna testiranja za kronične infektivne bolesti, kao i preporuke za trudnoću i cijepjenje u skladu su s onima za RTX. Dodatno, nije nađeno povećane učestalosti pojavljivanja reakcija povezanih s infuzijom lijeka nakon prelaska na OCR s terapije RTX. OCR dovodi do potpune deplecije CD20<sup>+</sup> B-stanica u serumu neposredno nakon primjene prve infuzije, nakon čega je potrebno 16 – 32 tjedna za oporavak B-stanične linije, odnosno utvrđivanja detektabilnih razina i medijan od 72 tjedna za postizanje koncentracija na donjoj granici normalnog raspona. Zanimljivo je da se terapijski i radiološki učinci prate barem 18 mjeseci od primjene lijeka, što je znatno dulje od perioda obilježenog deplecijom B-stanica, vjerojatno zbog djelovanja na memorijske B-stanice. Vjeruje se da je CDC aktivnost osnova razvoja reakcija na infuziju, što bi u teoriji značilo da bi se OCR trebao bolje podnositi od RTX-a, iako tijekom inicijalnih istraživanja RTX-a u MS-u nije korištena premedikacija metilprednizolonom. Specifičnih preporuka za provođenje prevencije malignih bolesti nema te se savjetuju standardne metode probira. Studije trenutno u tijeku, uz daljnju evaluaciju djelotvornosti i sigurnosti primjene OCR-a, pokušavaju procijeniti učinak na funkciju gornjih udova u podskupine starijih bolesnika s naznačenom onesposobljenošću (EDSS između 3 i 8) te djelotvornost u progresivnih oblika bolesti (PPMS i SPMS). Procjenjuje se i učinak na prognozu RRMS-a s rano započetim liječenjem, a cilj novih istraživanja je ispitivanjem koncentracije NFL-a, CD19<sup>+</sup> B-stanica i CD3<sup>+</sup> T-stanica u likvoru razjasniti mehanizme djelovanja OCR-a i pružiti uvid u biološku osnovu B-stanica u RRMS-u i PPMS-u. [2][31]

### **10.3 Ofatumumab (OMB157)**

OMB157 primjer je humanog IgG1 CD20 monoklalnog protutijela, stvorenog kako bi bio manje imunogeničan od prethodnika, RTX-a i OCR-a. Veže manju membransku petlju CD20 molekule s visokim afinitetom čak i pri njevoj niskoj ekspresiji. Posljedično, disocira puno sporije od CD20 molekule nego RTX, snažno pokrećući CDC, a u manjoj mjeri ADCC. Odobren je u terapiji refraktorne kronične limfatične leukemije (CLL), a pokazao se djelotvornim u terapiji aktivnog RA. Važno je naglasiti da se lijek osim iv., može primijeniti i sc., čime se smanjuje učestalost reakcija na infuziju lijeka, otklanja potreba za

premedikacijom kortikosteroidima, a omogućuje povoljniji način primjene bolesnicima i medicinskim djelatnicima. OMB157 je odobrila FDA za liječenje relapsnih oblika MS-a, što uključuje CIS, RRMS i aktivnu SPMS u odraslih, u injekcijskom obliku za sc. aplikaciju. Randomizirana, dvostruko-slijepa, placebo kontrolirana studija u fazi II kliničkog ispitivanja objavljena 2014. godine provedena je kako bi se utvrdile sigurnost i preliminarna učinkovitost lijeka, a uključila je 38 bolesnika s RRMS-om koji su primili 2 infuzije OMB157 100 mg, 300 mg ili 700 mg ili placebo u razmaku od 2 tjedna. [13][26][38] U svih skupina koje su primale OMB157 bilježi se značajna supresija pojave novih Gd+ lezija na T1 mjernim snimkama (> 99%), kao i novih ili povećanja postojećih T2 lezija u prva 24 tjedna nakon primjene. Tijekom prva 24 tjedna, relapsi su zabilježeni u 5 bolesnika (19%) koji su primali OMB157 i u 5 bolesnika (25%) koji su bili u placebo skupini, a tijekom iduća 24 tjedna relaps je zabilježen u još jednog bolesnika koji je inicijalno primao OMB157, ponovno dovodeći u pitanje relevantnost nalaza MR-a kao samostalne prognostičke varijable (što je prethodno opaženo u slučaju). Nije nađeno klinički značajnih promjena u vrijednostima EDSS-a između skupina na terapiji OMB157. Najčešće prijavljivane nuspojave, kao i s prethodno opisanim monoklonskim protutijela (RTX, OCR), uključuju infuzijske reakcije, češće pri prvoj primjeni lijeka, uglavnom gradusa 1 i 2: infekcije, osip, eritem, iritaciju grla, umor i crvenilo. Pojava se infekcija gotovo i nije razlikovala među skupinama liječenih OMB157 i placebo. Važno je naglasiti da niti u jednog bolesnika nije detektiran razvoj protutijela na OMB157. Također, isti je doveo do selektivne deplecije CD19<sup>+</sup> stanica, bez utjecaja na razinu serumskih imunoglobulina. [2][26]

Sljedeća klinička multicentrična, dvostruko-slijepa, placebo kontrolirana studija, faze 2, tzv. studija MIRROR, uključila je 232 bolesnika s RRMS-om. Sudionici su randomizirano priključeni jednoj od pet skupina: placebo, OMB157 3 mg, 30 mg ili 60 mg sc. svakih 12 tjedana, ili OMB157 <60 mg svaka 4 tjedna, kroz 24 tjedana, nakon čega su bolesnici dodatno praćeni do rekonstitucije B-stanica. Bolesnici u placebo skupini dodatno su nakon 12 tjedana primili 3 mg OMB157.

Analizom T1 mjernih snimaka MR-a nađeno je 65% (odnosno  $\geq 90\%$  kada se u obzir uzme latencija početka djelovanja) smanjenje broja novih Gd+ lezija u svih koji su primali OMB157 u dozi  $\geq 30$  mg u usporedbi s placebo u periodu između 4. i 12. tjedna. Zanimljivo je da i doze OMB157 kojima nije postignuta potpuna deplecija B-stanica ipak pokazuju optimalni terapijski učinak. [39] DSS score u većine bolesnika (79%) ostao je nepromijenjen tijekom tromjesečnog razdoblja (između 12. i 24. tjedna), bez značajnih razlika među grupama. Incidencija neželjenih učinaka koje su ponovno uglavnom uključivale reakcije na primjenu lijeka bila je najveća u skupini liječenih najvećom dozom OMB157 svaka 4 tjedna, s učestalošću 41 – 66% prema 15% zabilježenih u placebo skupini. Dodatno, prijavljeno je nekoliko slučajeva težih nuspojava i niti jedna oportunistička infekcija. Osim toga, u tri

bolesnika detektirana je neutropenija. U 4 bolesnika zabilježen je niski titar protutijela na OMB157 tijekom razdoblja primjene lijeka, a u jednog je bolesnika u fazi praćenja nađen pozitivan titar no samo do 48. tjedna; nije nađeno utjecaja visine titra na depleciju B-stanica. [2][13]

Dvije dvostruko-slijepa, randomizirane studije u fazi 3 kliničkog ispitivanja (ASCLEPIOS I i II), usporedile su dva modaliteta liječenja, OMB157 20mg sc. svaka 4 tjedna i teriflunomid (TFM) 14 mg peroralno svaki dan. Oko 2/3 ispitanika činile su žene, prosječna dob bolesnica bila je 38 godina, a trajanje bolesti 8 godina; OMB157 primijenjen je u 465 i 481 bolesnika, a TFM u 462 i 474 u ASCLEPIOS I odnosno II studiji. Prije primjene lijeka, EDSS score prosječno je iznosio 2.9, stopa relapsa u prethodnih 12 mjeseci bila je 1.3, 40% snimaka MR-a pokazalo je Gd+ lezije, dok je 60% bolesnika prethodno primalo terapiju lijekovima koji modificiraju bolest. Godišnja stopa relapsa, kao primarni ishod studija, iznosio je za skupine liječene OMB 1570.11 i 0.10 u usporedbi s 0.22 i 0.25 u liječenih TFM-om, rezultirajući relativnim smanjenjem od 50.5%, odnosno 58.5% u ASCLEPIOS I odnosno II studiji. OMB157 je usporio tromjesečno, odnosno šestomjesečno pogoršanje onesposobljenosti na EDSS ljestvici za 34.4% odnosno 32.5%. U ASCLEPIOS I, smanjenje broja Gd+ lezija bilo je 97.5% a novih ili T2 lezija koje se povećavaju 82%, dok su korespondirajuće vrijednosti iz druge studije iznosile smanjenje za 93.8% i 84.5% u usporedbi s terapijom TFM-om. Osim toga, OMB157 je značajno smanjio koncentraciju NFL u serumu. Nadalje, čini se da OMB157 ima nešto sigurniji profil uporabe bez slučajeva koji bi doveli u pitanje sigurnost lijeka. Nešto se češće javljaju reakcije povezane s aplikacijom lijeka prilikom prve primjene u usporedbi s placebo. Teže nuspojave zabilježene su u 1.8% i 2.5% slučajeva te se uglavnom radilo o infekcijama, a maligne bolesti zabilježene su u 0.3% i 0.5% slučajeva, redom za TFM i OMB157. Ponovno se ističe prednost sc. pred iv. aplikacijom lijeka, međutim sa slabijom mogućnosti kontrole redovite primjene lijeka. Post-hoc analizom pokazano je da OMB157 može spriječiti pojavu nove aktivnosti bolesti u bolesnika s RRMS-om, te da je vjerojatnost da bolesnik ima NEDA-3 otprilike 3 puta veća s OMB157 nego s TFM-om u periodu od 0 do 12 mjeseci (47.0% nasuprot 24.5% bolesnika) te 8 puta veća u razdoblju od 12. do 24. mjeseca od započinjanja terapije (87.8% nasuprot 48.2% bolesnika). [2]

Konačno, APLIOS open-label studija faze II kliničkog istraživanja, rezultirala je u brzom i gotovo potpunoj depleciji B-stanica s 20 mg sc. apliciranog OMB157 bez obzira na ubodno mjesto ili uređaj kojim se lijek aplicirao; udio bolesnika s koncentracijom B-stanica nižom od 10 stanica/ $\mu$ L iznosio je više od 65% sedmoga dana nakon prve injekcije, 94% do 4. tjedna te > 95% sa svim sljedećim primljenim injekcijama. Broj Gd+ lezija smanjio se s 1.5 (koliko je iznosio prije početka primjene) na 0.8, 0.3 i 0.1, redom nakon 4, 8 i 12 tjedana, a udio

bolesnika koji su bili bez vidljivih lezija u korespondirajućim vremenskim točkama iznosio je redom 66.5%, 86.7% i 94.1%. [40]

#### **10.4 Ublituksimab**

Ublituksimab je predstavnik treće generacije anti-CD20 monoklonalnih protutijela. Kimeričko je protutijelo s niskim sadržajem fukoze čime ostvaruje veći afinitet za sve varijante FcγRIIIa receptora i pojačano posreduje putem ADCC-a u usporedbi s RTX-om i OMB157 osobito u stanica s niskom ekspresijom CD20 molekule. Tako bi se njegova vrijednost, pored postojećih anti-CD20 monoklonskih protutijela, očitovala smanjenjem potrebne efektivne doze i kraćim infuzijskim periodu. Primarno je ispitivan u liječenju kronične limfocitne leukemije, no moguće će biti i jedna od terapijskih opcija NMO-spektra bolesti.

Multicentrična, randomizirana, placebom kontrolirana studija faze 2 kliničkog ispitivanja uključila je 48 bolesnika (2/3 ženskog spola, prosječne dobi od 39.2 godine i srednjim trajanjem bolesti oko 7.4 godina) s aktivnom RRMS-om (zadovoljava kriterije od dva ili više relapsa u prethodne dvije godine ili jednog relapsa i/ili jedne Gd+ lezije u prethodnoj godini). Početno su u prvom tjednu svi bolesnici primili 150 mg iv., a nakon dva tjedna i ponovno nakon 20 tjedna dozu od 450 ili 600 mg iv., kroz 1 – 4 h, nakon čega su praćeni 48 tjedana. U svih je skupina postignuta značajna deplecija B-stanica (>99%). Primijećen je i značajan pomak populacije T-stanica prema naivnom i regulatornom fenotipu, što bi moglo indicirati interferenciju s antigen-prezentirajućom ulogom B-stanica. Srednji broj Gd+ lezija na T1 mjernim snimkama prije početka studije iznosio je 3.8, što je u 24. tjednu smanjeno na 0.0 (100% smanjenje), a takvo se stanje održalo do 48. tjedna. Volumen T2 lezija smanjen je za 8% (7.3) u 24. tjednu, odnosno 10% (10.6) u 48. tjednu. Dodatno, godišnja stopa relapsa bila je kontinuirano niska (0.07), 93% bolesnika bilo je u remisiji u 48. tjednu, a niti jedan bolesnik nije se prezentirao produženim pogoršanjem onesposobljenosti. Najčešće opisane nuspojave terapije ublituksimabom, kao i u njegovih prethodnika, bile su reakcije povezane s infuzijom lijeka, uglavnom gradusa 1 i 2, s većom incidencijom u bolesnika u kojih je lijek infundiran u kraćem vremenskom razdoblju. Nije zabilježeno pojavljivanje težih nuspojava. U tijeku su (ULTIMATE I i ULTIMATE II) studije u fazi 3 kliničkog ispitivanja koje će, osim ocjene efikasnosti i sigurnosti ublituksimaba, iznijeti usporedbu s TFM-om u bolesnika s RRMS-om. [2][13]

## 11. Zaključak

B-stanice neosporno imaju temeljnu ulogu u patogenezi MS-a, što je potvrđeno povoljnim ishodom liječenja anti-CD20 monoklonskim protutijelima. Klinički se njihovo djelovanje očituju supresijom neuroinflamacije, smanjenjem broja relapsa i usporenjem akumulacije ireverzibilne invalidnosti.

S obzirom da se ovi učinci ne mogu jednoznačno objasniti mehanizmima koji dovode do smanjenja autoantitijela, pretpostavlja se da je funkcija B-stanica u patologiji MS-a neovisna o protutijelima, odnosno da je smanjenje upalne aktivnosti bolesti rezultat smanjenog lučenja proinflammatoryh citokina te sprječavanja prezentacije antigena u sklopu MHC-II molekule. Osim toga, infiltrati B-stanica formiraju se u tercijarne limfoidne strukture koje nalikuju na germinativne centre u meningealnim ovojnica bolesnika. Te strukture povezane su s pratećim kvantitativnim porastom difuzne meningealne upale koja korelira sa stupnjem mikroglijalne aktivacije i demijelinizacije sive tvari. Valja istaknuti da klonalne B-stanice perzistiraju u likvoru bolesnika s MS-om i nakon primjene imunomodulatorne terapije.

Nakon pozitivnih učinaka RTX-a na relapsni oblik bolesti, za liječenje MS-a razvija se humanizirano monoklonsko protutijelo OCR. Klinička istraživanja koja su uključila bolesnike s PPMS-om pokazala su značajno smanjenje stupnja kliničke onesposobljenosti osobito u mlađih i bolesnika s dokazanom perzistentnom perivaskularnom upalnom aktivnosti. Na temelju ovih opažanja, OCR postaje prva odobrena terapija za liječenje ranog primarno progresivnog oblika bolesti. U tijeku su klinička istraživanja kojima je cilj ispitati djelotvornost i sigurnost novijih generacija anti-CD20 monoklonskih protutijela, s OMB157 kao zanimljivom alternativnom opcijom s obzirom na mogućnost sc. primjene, a time veće autonomije bolesnika. Zbog mogućnosti prekomjernog izlaganja bolesnika ozbiljnim nuspojavama preranim uvođenjem anti-CD20 terapije, dominira *treat-to-target* pristup (ciljano liječenje) uz postupni prijelaz na *on-treatment* (liječenje) relapsa bolesti. Daljnjim translacijskim istraživanjima i kliničkim studijama potrebno je utvrditi optimalno vrijeme započinjanja terapije, doziranje lijeka te dugoročnu sigurnost primjene s obzirom na utvrđeni omjer rizika i koristi tijekom duljeg korištenja terapije, a u kontekstu imunosenescencije u starijih bolesnika i rizika od razvoja malignih bolesti ili progresivne multifokalne leukoencefalopatije.

## **12. Zahvale**

Željela bih se zahvaliti svojoj mentorici dr.sc. Terezi Gabelić na stručnom vodstvu, podršci i savjetima tijekom pisanja ovog rada. Zahvaljujem i svojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju, strpljenju i beskrajnoj podršci za vrijeme cijeloga studiranja.

### 13. Literatura

- [1] F. Gilli, K. D. DiSano, and A. R. Pachner, "SeXX Matters in Multiple Sclerosis," *Front. Neurol.*, vol. 11, no. July, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3389/fneur.2020.00616.
- [2] M. Ancau, A. Berthele, and B. Hemmer, "CD20 monoclonal antibodies for the treatment of multiple sclerosis: up-to-date," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 19, no. 8, pp. 829–843, 2019, doi: 10.1080/14712598.2019.1611778.
- [3] N. Dargahi *et al.*, "Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update," *Brain Sci.*, vol. 7, no. 7, pp. 1–27, 2017, doi: 10.3390/brainsci7070078.
- [4] P. O. Behan and S. Currie, *Clinical neuroimmunology*, vol. (I-X+213p.); 2020.
- [5] P. Schwenkenbecher *et al.*, "Clinically isolated syndrome according to mcdonald 2010: Intrathecal IgG synthesis still predictive for conversion to multiple sclerosis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 10, pp. 1–12, 2017, doi: 10.3390/ijms18102061.
- [6] Y. Hou, Y. Jia, and J. Hou, "Natural Course of Clinically Isolated Syndrome: A Longitudinal Analysis Using a Markov Model," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-29206-y.
- [7] P. Wanleenuwat and P. Iwanowski, "Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis," *Mult. Scler. Relat. Disord.*, vol. 36, no. September, 2019, doi: 10.1016/j.msard.2019.101416.
- [8] J. J. Sabatino, A. K. Pröbstel, and S. S. Zamvil, "B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 20, no. 12, pp. 728–745, 2019, doi: 10.1038/s41583-019-0233-2.
- [9] S. P. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, *Basic Immunology: Functions and Disorders*. 2016.
- [10] H. Wekerle, "B cells in multiple sclerosis," *Autoimmunity*, vol. 50, no. 1, pp. 57–60, 2017, doi: 10.1080/08916934.2017.1281914.
- [11] M. Keegan *et al.*, "Relation between humoral pathological changes in multiple," *Lancet*, vol. 366, pp. 579–582, 2005.
- [12] R. Milo, "Therapies for multiple sclerosis targeting B cells," *Croat. Med. J.*, vol. 60, no. 2, pp. 87–98, 2019, doi: 10.3325/cmj.2019.60.87.
- [13] F. Sellebjerg, M. Blinkenberg, and P. S. Sorensen, "Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for Relapsing and Progressive Multiple Sclerosis," *CNS Drugs*, vol. 34, no. 3, pp. 269–



280, 2020, doi: 10.1007/s40263-020-00704-w.

- [14] L. Kappos *et al.*, "Atacept in multiple sclerosis (ATAMS): A randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial," *Lancet Neurol.*, vol. 13, no. 4, pp. 353–363, 2014, doi: 10.1016/S1474-4422(14)70028-6.
- [15] T. Kinnunen *et al.*, "Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 6, pp. 2737–2741, 2013, doi: 10.1172/JCI68775.
- [16] O. W. Howell *et al.*, "Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis," *Brain*, vol. 134, no. 9, pp. 2755–2771, 2011, doi: 10.1093/brain/awr182.
- [17] R. Magliozzi *et al.*, "B-cell enrichment and epstein-barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 72, no. 1, pp. 29–41, 2013, doi: 10.1097/NEN.0b013e31827bfc62.
- [18] C. F. Lucchinetti *et al.*, "Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 23, pp. 2188–2197, 2011, doi: 10.1056/NEJMoa1100648.
- [19] B. Metcalf and R. Rappuoli, *Pharmaceutical biotechnology*, vol. 14, no. 6. 2003.
- [20] H. W. J. Schroeder and L. Cavacini, "Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript)," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, pp. S41–S52, 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.Structure.
- [21] J. K. H. Liu, "The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations," *Ann. Med. Surg.*, vol. 3, no. 4, pp. 113–116, 2014, doi: 10.1016/j.amsu.2014.09.001.
- [22] Manis JP. Overview of therapeutic monoclonal antibodies. In: Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. [ažurirano 08.05.2020; pristupljeno 18.08.2020.]. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-therapeutic-monoclonal-antibodies>
- [23] E. D. Lobo, R. J. Hansen, and J. P. Balthasar, "Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics," *J. Pharm. Sci.*, vol. 93, no. 11, pp. 2645–2668, 2004, doi: 10.1002/jps.20178.
- [24] Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M i sur., *Imunologija 7.izd.* Zagreb: Medicinska Naklada; 2010.

- [25] U. Herbrand, "Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis: The Mechanism of Action That Gets No Respect A Discussion About Improving Bioassay Reproducibility," *Bioprocess. J.*, vol. 15, no. 1, pp. 26–29, 2016, doi: 10.12665/j151.herbrand.
- [26] K. M. Myhr, Ø. Torkildsen, A. Lossius, L. Bø, and T. Holmøy, "B cell depletion in the treatment of multiple sclerosis," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 19, no. 3, pp. 261–271, 2019, doi: 10.1080/14712598.2019.1568407.
- [27] A. Bar-Or *et al.*, "Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A 72-week, open-label, phase I trial," *Ann. Neurol.*, vol. 63, no. 3, pp. 395–400, 2008, doi: 10.1002/ana.21363.
- [28] S. L. Hauser *et al.*, "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, no. 7, pp. 676–688, 2008, doi: 10.1056/NEJMoa0706383.
- [29] J. Salzer *et al.*, "Rituximab in multiple sclerosis," *Neurology*, vol. 87, no. 20, pp. 2074–2081, 2016, doi: 10.1212/WNL.0000000000003331.
- [30] B. Alldredge, A. Jordan, J. Imitola, and M. K. Racke, "Safety and Efficacy of Rituximab: Experience of a Single Multiple Sclerosis Center," *Clin. Neuropharmacol.*, vol. 41, no. 2, pp. 56–59, 2018, doi: 10.1097/WNF.0000000000000268.
- [31] European Medicines Agency. OCREVUS (ocrelizumab) 30 mg/mL for solution for infusion. [pristupljeno 24.08.2020]  
Dostupno na:  
[https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ocrevus-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ocrevus-epar-public-assessment-report_en.pdf)
- [32] G. Luna *et al.*, "Infection Risks among Patients with Multiple Sclerosis Treated with Fingolimod, Natalizumab, Rituximab, and Injectable Therapies," *JAMA Neurol.*, vol. 77, no. 2, pp. 184–191, 2020, doi: 10.1001/jamaneurol.2019.3365.
- [33] E. A. A. Christou, G. Giardino, A. Worth, and F. Ladomenou, "Risk factors predisposing to the development of hypogammaglobulinemia and infections post-Rituximab," *Int. Rev. Immunol.*, vol. 36, no. 6, pp. 352–359, 2017, doi: 10.1080/08830185.2017.1346092.
- [34] L. Kappos *et al.*, "Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial," *Lancet*, vol. 378, no. 9805, pp. 1779–1787, 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(11)61649-8.
- [35] S. L. Hauser *et al.*, "Ocrelizumab versus interferon beta-1a in relapsing multiple

- sclerosis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 3, pp. 221–234, 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1601277.
- [36] X. Montalban *et al.*, “Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 3, pp. 209–220, 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1606468.
- [37] J.S. Wolinsky, B. Brochet, X. Montalban, R.T. Naismith, M. Manfrini, M. Garas, P. Villoslada, F. Model, S. Hubeaux, L. Kappos, S.L. Hauser. Sustained reduction in confirmed disability progression in patients with primary progressive multiple sclerosis treated with ocrelizumab in the open-label extension period of the Phase III ORATORIO trial. ECTRIMS Online Library. 2018 Oct 11 [pristupljeno 21.08.2020.]; 228753; P910. Dostupno na: [https://onlinelibrary.ectrims-congress.eu/ectrims/2018/ectrims-2018/228753/jerry.wolinsky.sustained.reduction.in.confirmed.disability.progression.in.html?f=media=3\\*search=ocrelizumab%20oratorio\\*listing=3\\*browseby=8](https://onlinelibrary.ectrims-congress.eu/ectrims/2018/ectrims-2018/228753/jerry.wolinsky.sustained.reduction.in.confirmed.disability.progression.in.html?f=media=3*search=ocrelizumab%20oratorio*listing=3*browseby=8)
- [38] P. S. Sorensen *et al.*, “Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2 study,” *Neurology*, vol. 82, no. 7, pp. 573–581, 2014, doi: 10.1212/WNL.000000000000125.
- [39] A. Bar-Or *et al.*, “Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: The MIRROR study,” *Neurology*, vol. 90, no. 20, pp. E1805–E1814, 2018, doi: 10.1212/WNL.0000000000005516.
- [40] Amit Bar-Or, Edward Fox, Alexandra Goodyear, Inga Ludwig, Morten Bagger, Dieter A. Häring, Harald Kropshofer, Martin Merschhemke, Heinz Wiendl. Onset of B-cell Depletion and Suppression of MRI Activity with Ofatumumab Treatment in Relapsing Multiple Sclerosis: The APLIOS Study. *Neurology*. 2020 Apr 14 [pristupljeno 26.08.2020.]; 94 (15 Supplement) 3971. Dostupno na: [https://n.neurology.org/content/94/15\\_Supplement/3971](https://n.neurology.org/content/94/15_Supplement/3971)

## 14. Životopis

Rođena sam 07.01.1996. godine u Zagrebu.

Pohađala sam Osnovnu školu Mate Lovraka u Zagrebu, a svoje obrazovanje sam nastavila u XV. gimnaziji koju sam završila s odličnim uspjehom. Upisujem 2014. godine Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji završavam u roku. Tijekom studija sam sudjelovala u aktivnostima studentskih sekcija za neuroznanost i kirurške sekcije te sam prisustvovala interdisciplinarnom kongresu *Diskursi shizofrenije* u organizaciji studenata. U osnovnoj i srednjoj školi sam od izvannastavnih aktivnosti pohađala školu stranih jezika (engleski i talijanski jezik) i astronomiju.