

STRESZCZENIE

Stwardnienie rozsiane (ang. *multiple sclerosis*, MS) jest przewlekłą chorobą neurodegeneracyjną o podłożu autoimmunizacyjnym. Schorzenie obejmuje głównie ośrodkowy układ nerwowy (ang. *central nervous system*, CNS), prowadząc do ogniskowych i rozsianych uszkodzeń w mózgu i rdzeniu kręgowym. Rozwój MS napędzany jest poprzez utrzymującą się reakcję zapalną z udziałem autoreaktywnych limfocytów T i B skierowanych przeciwko antygenom mieliny. Proces zapalny w CNS jest nasilany przez zwiększoną przepuszczalność uszkodzonej bariery krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB), z racji czego patofizjologia MS obejmuje nie tylko podłoże neurozapalne, ale także naczyniowe.

MS jest schorzeniem niejednorodnym, trudnym do sklasyfikowania, o zróżnicowanym przebiegu i zmiennym fenotypie. Najczęściej występującą formą choroby jest zapalna postać rzutowo-remisyjna, (ang. *relapsing-remitting multiple sclerosis*, RRMS), z kolei postać wtórnie postępująca (ang. *secondary progressive multiple sclerosis*, SPMS), rozwijająca się zwykle w następstwie RRMS, wiąże się z postępującymi procesami neurodegeneracyjnymi, bez okresów rzutów i remisji. Ostatnie doniesienia wskazują jednak na współistnienie zarówno cech zapalnych, jak i neurodegeneracyjnych w obu fenotypach choroby, co utrudnia wczesne różnicowanie, decyzje terapeutyczne i prognozowanie postępu schorzenia.

Nadrzędnym celem badań podjętych w niniejszej rozprawie doktorskiej była identyfikacja markerów umożliwiających różnicowanie fenotypów choroby u pacjentów z RRMS w fazie remisji oraz SPMS. W pierwszym etapie badań scharakteryzowano agregaty płytkowo-leukocytarne (ang. *platelet-leukocyte hetero-aggregates*, PLAs) jako element łączący patogenezę uszkodzeń naczyniowych i rozwój procesu zapalnego. Z wykorzystaniem testu migracji, obrazowania mikroskopowego i cytometrii przepływowej wykazano w MS zwiększoną chemotaksję leukocytów w kierunku płytek krwi i tworzenie PLAs, wśród których dominowały kompleksy z udziałem limfocytów B. Dodatkowo, stwierdzono prawdopodobną rolę osi CD40-CD40L w tworzeniu PLAs, odnotowując istotną korelację między ekspresją płytkowego CD40L i limfocytarnego CD40, najsilniej wyrażoną w badaniu koekspresji tych antygenów na płytkach krwi i komórkach B w SPMS.

W drugim etapie badań przeprowadzono przesiewową analizę różnicowej ekspresji cząsteczek mikroRNA (ang. *microRNA*, miRNA) pochodzących z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs) metodą sekwencjonowania RNA, walidację wyników za pomocą RT-qPCR, a także oznaczenie stężenia osoczowych cytokin zapalnych i markerów uszkodzeń

neuronów/gleju przy użyciu odpowiednio systemu Bio-Plex oraz techniki ELISA. Następnie wykonano integracyjną analizę bioinformatyczną wyników. Zidentyfikowano cztery miRNA różnicujące RRMS i SPMS (miR-760, miR-98-5p, miR-301a-3p, miR-223-3p), przy czym miR-760 okazał się najsilniejszym pojedynczym predyktorem klasyfikacji do fenotypu RRMS. W SPMS odnotowano swoiste korelacje – między miR-760 a interleukiną (ang. *interleukin*, IL) 4 i IL-17 oraz między miR-98-5p a IL-17. Model łączący ekspresję miRNA z poziomem podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor basic*, FGF basic) uzyskał AUC 0,97 (czułość 93,3%, swoistość 90%), potwierdzając wysoką zdolność dyskryminacji RRMS wobec SPMS.

W trzecim etapie kompleksowo scharakteryzowano EVs prezentujące cząsteczkę adhezyjną L1 (ang. *L1 cell adhesion molecule*, L1CAM) w surowicy i w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF). L1CAM⁺ jest białkiem wykorzystywanym w celu wzbogacenia frakcji EVs pochodzenia neuronalnego podczas ich izolacji. Badania przeprowadzono pod kątem rozmiaru pęcherzyków, ich stężenia, morfologii, ładunku białkowego i fenotypu antygenów powierzchniowych. W analizach, oceniono przydatność L1CAM⁺ EVs jako dynamicznych biomarkerów do monitorowania odpowiedzi na leczenie rytuksymabem, monoklonalnym przeciwciałem anty-CD20, u pacjentów z RRMS. Na tej podstawie uzyskano odmienne profile immunologiczne przed i po terapii, co podkreśla potencjał L1CAM⁺ EVs w monitorowaniu leczenia immunosupresyjnego, skierowanego na deplecję limfocytów B.

Podsumowując, zrealizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania poszerzają wiedzę na temat mechanizmów patofizjologicznych MS, łącząc odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów z uszkodzeniami naczyniowymi. Ponadto, praca identyfikuje możliwości zastosowania potencjalnych nieinwazyjnych biomarkerów służących różnicowaniu RRMS i SPMS oraz monitorowaniu immunopatologii CNS i odpowiedzi na leczenie.