

Određivanje anti-AQP4 i anti-MOG antitijela u diferencijalnoj dijagnostici demijelinizirajućih bolesti SŽS-a

Kanižić, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:991380>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Helena Kanižić

**Određivanje anti-AQP4 i anti-MOG antitijela u
diferencijalnoj dijagnostici demijelinizirajućih
bolesti SŽS-a**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Neurokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Željke Vogrinc, spec. med. biochem.

Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici doc. dr. sc. Željki Vogrinc na iznimnoj susretljivosti, pomoći, stručnom vodstvu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem prijateljicama koje su bile uz mene, saslušale me kada je to bilo potrebno ali i sanjale te proživljavale nezaboravne trenutke sa mnom.

Najveće hvala mojim roditeljima na ljubavi i osloncu koje mi oduvijek pružaju, kao i bratu i baki na podršci tijekom svih ovih godina.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. OSNOVNE GRAĐEVNE JEDINICE ŽIVČANOG SUSTAVA.....	1
1.1.1. NEURONI.....	1
1.1.2. GLIJA STANICE	1
1.2. PROVODNOST MIJELINIZIRANIH AKSONA	3
1.3. GRAĐA MIJELINA	4
1.4. OSNOVNE FUNKCIJE MIJELINA	5
1.5. DEMIJELINIZIRAJUĆE BOLESTI I REMIJELINIZACIJA	5
1.6. GRAĐA I RASPROSTRANJENOST AKVAPORINA 4 (AQP-4).....	6
1.7. GRAĐA I ULOGA MIJELINSKOG OLIGODENDROCITNOG GLIKOPROTEINA (MOG)	8
1.8. DEMIJELINIZIRAJUĆE BOLESTI SŽS-A: MS, NMOSD I MOGAD	8
1.8.1. MULTIPLA SKLEROZA.....	8
1.8.2. POREMEĆAJI IZ SPEKTRA OPTIČKOG NEUROMIJELITISA	11
1.8.3. BOLESTI VEZANE UZ ANTITIJELA NA MOG	14
1.9. RAZLIČITI TERAPIJSKI PRISTUPI	16
1.10. LABORATORIJSKE METODE ZA DOKAZIVANJE ANTITIJELA	17
1.10.1. NAČELO ELISE	17
1.10.2. NAČELO INDIREKTNE IMUNOFLUORESCENCIJE	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. MATERIJALI KORIŠTENI ZA IZVOĐENJE CBA IIF	21
3.1.1. OPIS POSTUPKA	22
3.1.2. INTERPRETACIJA REZULTATA CBA IIF.....	23
3.2. MATERIJALI KORIŠTENI ZA IZVOĐENJA ELISA TESTA.....	23
3.2.1. OPIS POSTUPKA	23
3.2.2. INTERPRETACIJA REZULTATA ELISA TESTA	24
3.3. KLINIČKA PROCJENA DIJAGNOSTIČKIH POSTUPAKA	24
4. REZULTATI	26
4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTITIJELA NA AQP4.....	26
4.1.1. OSJETLJIVOST, SPECIFIČNOST I TOČNOST ELISA RSR AQUAPORIN-4 AB V2 TESTA.....	29
4.1.2. OSJETLJIVOST, SPECIFIČNOST I TOČNOST EUROIMMUN CBA IIF TESTA.....	30
4.1.3. PRIMJERI NALAZA ANTITIJELA NA AQP4 DOBIVENIH METODOM CBA IIF ...	31

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTI MOG ANTITIJELA.....	33
5. RASPRAVA	35
5.1. ANTITIJELA NA AQP4.....	35
5.2. ANTITIJELA NA MOG	38
6. ZAKLJUČAK.....	41
7. POPIS KRATICA.....	42
8. LITERATURA	44
9. SAŽETAK.....	49
SUMMARY.....	50

1. UVOD

1.1. OSNOVNE GRAĐEVNE JEDINICE ŽIVČANOG SUSTAVA

Neuroni i glija stanice, bez kojih neuroni ne bi mogli opstati, su osnovne stanice najstroženijeg sustava u tijelu, živčanog sustava.

1.1.1. NEURONI

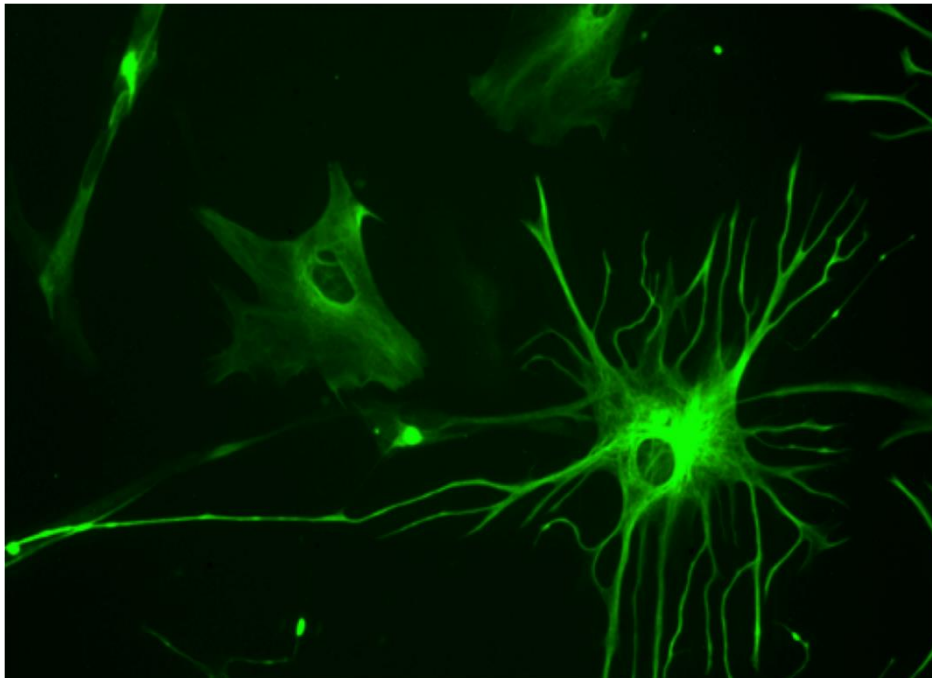
Neuroni su osnovne jedinice živčanog sustava koje imaju glavnu ulogu u stvaranju i prijenosu signala neurotransmisijom pri čemu je svaki neuron u doticaju sa tisućama drugih. To su „dugoživuće“ stanice koje se ne dijele i ne regeneriraju. Iako se neuroni mogu uvelike razlikovati oblikom, u građi su im zajednička četiri morfološka obilježja: dendriti koji sa tijelom neurona sudjeluju u primanju signala, akson te aksonski završetak zadužen za prijenos impulsa na druge stanice. U integracijskom dijelu neurona kojeg čine aksonski brežuljak i početni odsječak aksona dolazi do stvaranja novih impulsa. Zbog različitih oblika (stupanj razgranatosti dendrita, duljina i mijeliziranost aksona) neuroni nose i različite funkcije u organizmu na temelju čega se mogu navesti tri osnovne vrste: motorički, osjetilni i interneuroni, a naziv govori o ulozi koju imaju i vrsti signala koje prenose (Judaš & Kostović, 1997.).

1.1.2. GLIJA STANICE

U glija stanice se ubrajaju stanice koje se razvijaju iz mezoderma – mikroglija stanice te one koje se razvijaju iz ektoderma – makroglija stanice. Od posebnog značaja su makroglija stanice koje se dalje mogu podijeliti na astrocite i oligodendrocite o kojima će biti više riječi u ovome radu.

Najzastupljenije stanice u moždanom tkivu, astrociti (Slika 1.), koji su ujedno i jedine stanice u središnjem živčanom sustavu (SŽS) koje sadrže glikogen i imaju sposobnost vršenja glikolize, vrše brojne funkcije ovisno o njihovom smještaju u mozgu. Kao biljezi astrocita navode se: protein S 100B, glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein (GFAP) koji je dio citoskeleta astrocita, vimentin te glutamat sintetaza. Fibrozni astrociti sa brojnim ali jednostavnim nastavcima nalaze se većinski u bijeloj tvari, dok su protoplazmatski astrociti koje odlikuju razgranatiji nastavci smješteni uglavnom u sivoj tvari (Judaš & Kostović, 1997.).

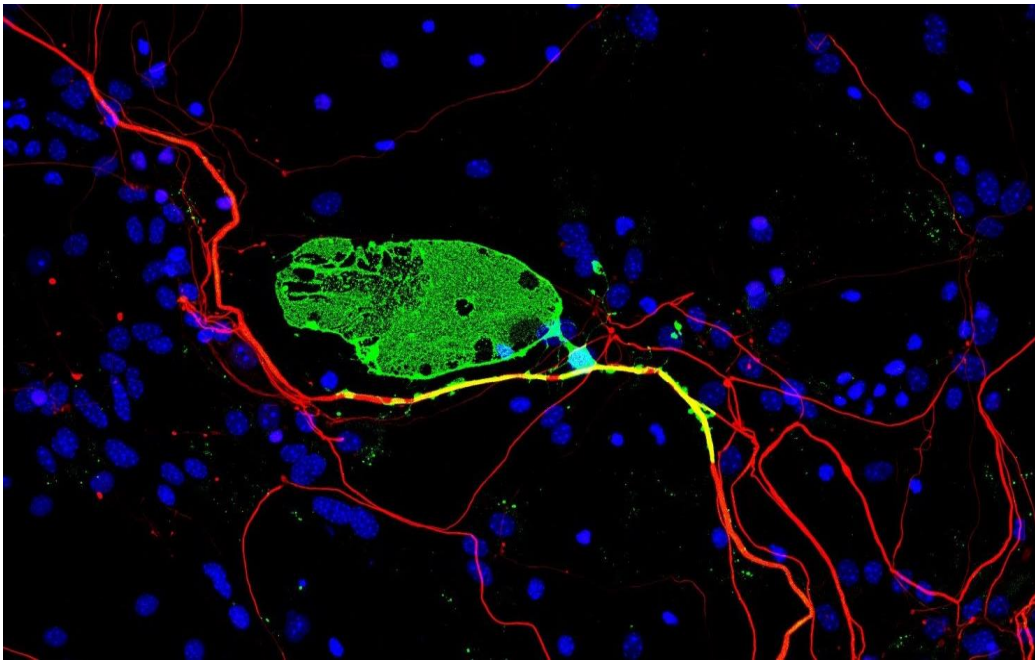
Tijekom razvoja živčanog sustava astrociti sudjeluju u regulaciji migracije neurona, poticanju stvaranja krvno – moždane barijere (KMB) te određivanju rasta dendrita i aksona (nastavaka neurona), dok u odraslom živčanom sustavu imaju ulogu u regulaciji moždanog protoka krvi, odstranjivanju razgradnih produkata, metaboličkoj ravnoteži te imunološkoj zaštiti. Astrociti sudjeluju i u regulaciji izmjene tvari kroz KMB s obzirom da 80% površine pripadnih nefenestriranih kapilara pokrivaju stanice glatkih mišića te nožice astrocita. KMB grade endotelne stanice čiji su rubovi spojeni čvrstim elektrostatskim vezama. Prema tome, za razliku od drugih organa, mozak ima veću kontrolu nad ulazom i izlazom tvari zbog prisutnosti KMB. U slučaju bolesti narušava se integritet barijere, dolazi do mijenjanja propusnosti te povećanog ulaska topljivih imunoreaktanata.



Slika 1. Ljudski astrocit (preuzeto iz <https://search.openverse.engineering/image/2f788c98-049d-4671-9310-c1877457ed3a>, prema Bruno Rascal (2012.), uz dopuštenje izdavača)

Mijelinske ovojnice aksona SŽS-a grade oligodendrociti (Slika 2.), dok tu ulogu u perifernom živčanom sustavu (PŽS) vrše Schwannove stanice. Oligodendrociti se prema smještaju dijele na interfascikularne - one koji se nalaze između snopova aksona te perineuronske koji su smješteni uz tijela neurona. S obzirom na to da oligodendrociti imaju sposobnost istovremenog stvaranja više internodalnih segmenata, samo jedan oligodendrocit svojim brojnim nastavcima može mijelinizirati više centralnih aksona, dok u PŽS-u jedna

Schwannova stanica gradi jedan internodalni segment. Navedene stanice mijelinizaciju obavljaju spiralnim omatanjem aksona vlastitim membranama te se povećanjem promjera aksona povećava i broj namotaja. U SŽS-u se duljina internodalnog segmenta kreće obično oko 100 μm , dok je u PŽS-u prosječno deset puta veća (Zalc & Rosier, 2018.). Uz internodalne segmente nalaze se jukstaparanodalni, dok su do njih smješteni paranodalni segmenti koji se prikazuju kao uvećane petlje ispunjene citoplazmom.



Slika 2. Mišji oligodendrocit (zeleno označen), (preuzeto iz <https://www.flickr.com/photos/148881376@N06/49725368527> prema Gergely Karsai, University Hospital of Zurich - USZ (2020.), uz dopuštenje izdavača)

1.2. PROVODNOST MIJELINIZIRANIH AKSONA

Djelovi aksona koji su nemijelinizirani i nalaze se između internodalnih segmenata nazivaju se Ranvierovi čvorovi. Na tim područjima koncentrirani su naponom regulirani natrijevi i kalijeve kanali, a ona su bogata i brojnim drugim signalnim proteinima i adhezijskim molekulama. Za razliku od nemijeliniziranih aksona kod kojih je vođenje potencijala kontinuirano, kod aksona obavijenih mijelinom do depolarizacije dolazi na područjima Ranvierovih čvorova što rezultira skokovitim vođenjem potencijala. Mijelin na taj način djeluje kao izolator, ubrzava provodnost te pri tom dolazi do očuvanja prostora i energije (Rasband & Macklin, 2012.). Iako svi aksoni nisu mijelinizirani (nemijelinizirani su ujedno i kraći), navodi

se kako je mijelin najzastupljeniji kod aksona motoneurona te proprioceptivnih¹ i vestibularnih neurona (Mason, 2017.). Bijela tvar u SŽS-u se sastoji od mijeliniziranih aksona, dok nemijelinizirani aksoni nose naziv siva tvar (Johnson & Khalili, 2021.). Sama mijelinizacija kreće od perifernog živčanog sustava i završava na složenijim dijelovima SŽS-a.

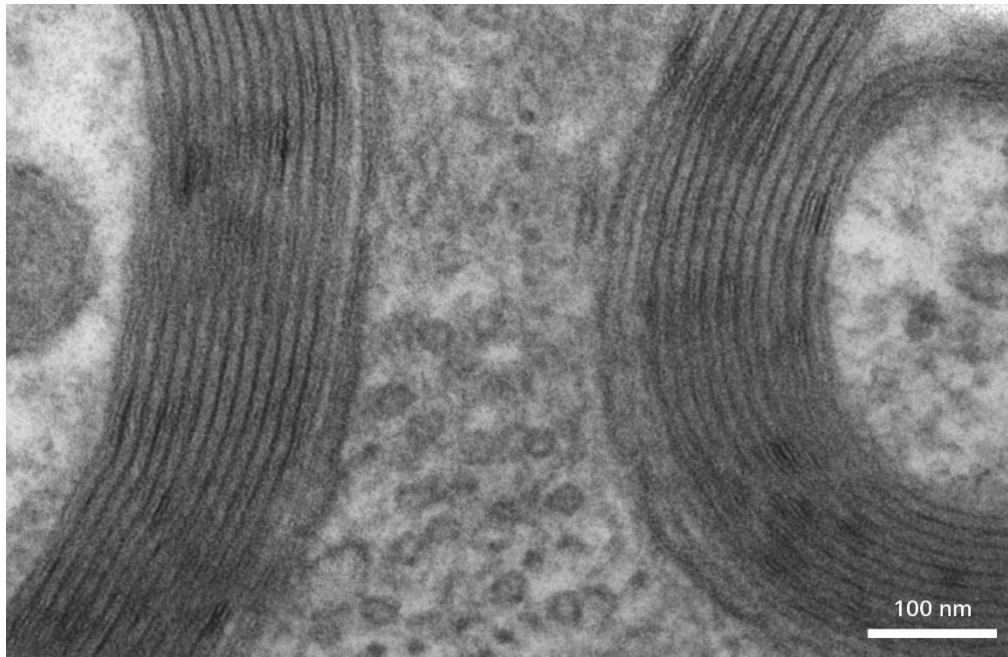
1.3. GRAĐA MIJELINA

Mijelin (Slika 3.) se sastoji od 40% vode, dok suhu tvar čini poprilično velik udio lipida (70 – 85%) te posljedično tome nizak udio proteina (15 – 30%). Glavna razlika u građi mijelina u odnosu na mijelin PŽS-a je sadržaj proteina.

Zbog same građe SŽS-a i same KMB sastav i zastupljenost lipida se razlikuje od onih u ostatku tijela. Najzastupljeniji je kolesterol (25%), a veliki udio čine i fosfolipidi. Iako ne postoje lipidi specifični za mijelin, najtipičnijim se smatra galaktocerebrozid čije su koncentracije proporcionalne količini mijelina (Wang & sur., 2018.). Brady i sur. u knjizi *Basic Neurochemistry* navode kako je čak 1/5 galaktolipida mijelina sulfatirana pri čemu i galaktocerebrozid. Sulfatirani lipidi su negativno nabijeni i smješteni uz paranodalne segmente, što vjerovatno doprinosi njihovom prijanjanju aksonu (Zalc & Rosier, 2018.). Glikolipidi su svojim najvećim dijelom smješteni na vanjskoj površini mijelina, dok je na citoplazmatskoj strani najvećim dijelom lokaliziran karakterističan fosfolipid – plazmalogen koji sadrži etanolamin. Od ostalih značajnih lipida izdvajaju se fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin te lipid čiji naziv i potječe od prvotne identifikacije u mijelinu – sfingomijelin. Mijelin u sisavaca sadrži i 0,1 – 0,3 % ganglioziida (složeni glikosfingolipidi koji sadrže sijalinsku kiselinu), od kojih se u najvećem udjelu u CNS-u nalazi monosijaloganglioziid (GM1) te sijalozilgalaktozilceramid (GM4).

60 – 80% mijelinskih proteina čine mijelinski bazični protein (MBP) sa 30% te proteolipidni protein (PLP) koji se još naziva i Folch – Lees protein sa svojom izoformom DM20 koji je najzastupljeniji od proteina s udjelom od 50%. Od ostalih se još ističu glikoprotein vezan za mijelin (MAG) te mijelinski oligodendrocitni protein (MOG). Oligodendrocitni specifični protein (OSP) i MOG su često korišteni biljezi za karakterizaciju oligodendrocita, MBP je eksprimiran i od strane Schwannovih stanica.

¹ proprioceptivni neuroni – osjetni neuroni koji dopremaju informacije o položaju i kretanju tijela



Slika 3. Ultrastruktura mijelina (tkivo mozga štakora) (preuzeto iz <https://wordpress.org/openverse/image/ed32a58f-aede-4a9c-9305-ade18b90d58c> prema ZEISS microscopy (2015.), uz dopuštenje izdavača)

1.4. OSNOVNE FUNKCIJE MIJELINA

Bernard Zalc u svojoj knjizi „Myelin – The Brain's Supercharger“ navodi tri glavne funkcije mijelina. Prva funkcija je izolacija i zaštita aksona, pri čemu ga mijelin štiti od električnih interferencija drugih susjednih vlakana. Sljedeća funkcija je ubrzanje provodnosti signala zbog skokovitog prijenosa potencijala, dok je treća funkcija prehrana neurona. Astroцити pri tom glukozu koja cirkulira u kapilarama prevode u laktat putem anaerobne glikolize te ga dopremaju do tijela neurona. Laktat od astrocита preuzimaju oligodendrociti te potom mijelinizacijom prehranjuju akson duž njegove čitave duljine.

1.5. DEMIJELINIZIRAJUĆE BOLESTI I REMIJELINIZACIJA

Do demijelinizacije dolazi zbog primarnog oštećenja stvorenog mijelina ili neuspješne mijelinizacije zbog oštećenja stanica koje ga stvaraju (oligodendrocita u SŽS-u). Bolesti koje se povezuju sa autoimunošću, poremećajima u strukturi proteina te one primarno aksonalne patologije se vežu uz oštećenje mijelina, dok se virusne infekcije, genetičke i metaboličke bolesti vežu uz nepovoljan utjecaj na preživljavanje stanica koje stvaraju mijelin (Stadelmann & sur., 2019.).

Primarna demijelinizacija uključuje destrukciju mijelina sa relativnim očuvanjem aksona, dok se sekundarna veže uz poremećaje koji slijede nakon oštećenja neurona i aksona (Staugaitis & Trapp, 2012.). Demijelinizirajuće bolesti zahvaćaju mijelinizirane aksone u SŽS-u ili PŽS-u ali ne i oboje.

Kao odgovor na demijelinizaciju dolazi do spontane remijelinizacije kojom se nastoji spasiti život aksona te obnoviti prijenos potencijala (Neumann & sur., 2019.). Sam taj proces u kojem sudjeluju novostvoreni oligodendrociti ili oni koji su preživjeli demijelinizaciju se u konačnici smatra nedostatnim. Djelomično se oligodendrociti pokušavaju nadomjestiti uz pomoć oligodendrocitnih prekursornih stanica (OPC) ili neuronalnih progenitornih stanica (NSC) koje se aktiviraju i diferenciraju u oligodendrocite. U poticanju diferencijacije OPC-a važnu ulogu imaju i rezidentni makrofagi, stanice mikroglije. Njihov M2 fenotip djeluje protuupalno, utječe na regeneraciju tkiva i fagocitozu mijelinskog debrisa. Nadalje, smanjena sposobnost remijelinizacije se povezuje i sa starošću te pripadnim bolestima (Gruchot & sur., 2019.). U odsutnosti mijelina izloženi aksoni postaju ranjivi te podliježu degeneraciji (Neumann & sur., 2019.).

1.6. GRAĐA I RASPROSTRANJENOST AKVAPORINA 4 (AQP-4)

Akvaporini su proteinski kanali važni za transport vode i predstavljaju dio obitelji od ukupno 13 članova koji se još mogu podijeliti na 3 subgrupe. Prvu subgrupu sačinjavaju akvaporini 0, 1, 2, 4, 5, 6 i 8 te oni najvećim dijelom propuštaju samo vodu stoga se nazivaju „obitelj čistih akvaporina“. Akvaporini 3, 7, 9 i 10 čine drugu subgrupu. Oni propuštaju vodu ali i glicerol, purine, pirimidine, poliole, ureju te uz to monokarboksilati doprinose difuziji laktatne kiseline. Superakvaporini 11 i 12 su, s druge strane, locirani u citoplazmi te se smatraju ključnim u regulaciji unutarstaničnog transporta vode, volumena organela te homeostaze vezikula (Pan & sur., 2021.).

Akvaporini su građeni od 8 membranskih domena, od kojih su C i N terminalni krajevi u citoplazmi, dok se ostalih 6 domena proteže kroz membranu (Dadgostar & sur., 2021.). Česta značajka akvaporina je motiv Asn – Pro – Ala koji ima ključnu ulogu u stvaranju pore (Pan & sur., 2021.).

Akvaporin 4 (AQP4), izoliran 1994., široko je rasprostranjen u SŽS-u i ima brojne funkcije. Istraživanja su pokazala da je AQP4 povezan s patologijom različitih neuroloških bolesti. U ljudi su poznate dvije glavne izoforme AQP4 – M1 („duga“ izoforma) građena od

323 aminokiseline i M23 (kratka izoforma zbog skraćenog terminalnog dijela) koja se sastoji od 301 aminokiseline. Kod M1 izoforme translacija započinje sa metioninom 1 (Met 1), dok kod M23 započinje kod Met 23 (Dadgostar & sur., 2021.). U literaturi se navodi još jedna izoforma nazvana Mz koja ima produljeni N terminalni kraj te ju sačinjava 364 aminokiselina.

AQP4 se spajaju u tetramere, pri čemu je svaki monomer zaseban kanal sa centralnom porom veličine 1,5 Å. Sam smjer protoka (može biti u oba smjera) kroz kanal ovisi o razlikama u osmotskom i hidrostatskom tlaku, međutim to može biti modulirano promjenom razine ekspresije AQP4 čime dolazi do porasta ili smanjenja propusnosti (Pan & sur., 2021.). Također, mogu formirati razne heteromultimerne komplekse sa drugim kanalima i transporterima.

AQP4 je, unatoč mogućoj prisutnosti u drugim organima poput bubrega, želuca, pluća i placente (Stadelmann & sur., 2019.), ipak najzastupljeniji u SŽS-u gdje mu distribucija i stupanj ekspresije variraju ovisno o regiji. Jedan je od tri akvaporina opisanih u astrocita, pri čemu se AQP1 i AQP9 uglavnom vežu uz neuropatološke uvjete (Jorgačevski & sur., 2020.).

Ekspimiran je u visokim koncentracijama u mozgu, kralježničnoj moždini, retini i perifernim živčanim tkivima, a najviši stupanj ekspresije veže se uz mali mozak i sivu tvar kralježnične moždine. Uglavnom je ekspimiran na završetcima astrocita koji se nalaze uz kapilare (Pan & sur., 2021.).

Osim perikapilarnih astrocita, do ekspresije AQP4 dolazi i uz endodimalne stanice te epitelne stanice koroidnog pleksusa. Oštećenost barijere uzrokovana anti AQP4 antitijelom potiče daljnji ulaz patogenih antitijela u cerebrospinalnu tekućinu (CSF) i parenhim SŽS-a što potiče stvaranje periventrikularnih i subpialnih lezija. Kod područja koja su bez zaštite KMB (cirkumventrikularni organi) također dolazi do pojave lezija (Stadelmann & sur., 2019.).

Pojam glimfatični putovi opisuje izmjenu likvora, intersticijske tekućine i metabolita u mozgu. (Deffner & sur., 2022.) AQP4 pomažu tekućini i otopljenim tvarima kretanju od periarterijskog prostora kroz ostatak mozga, do pročišćivanja u perivenskom prostoru te konačno kroz glimfatični sustav. AQP4 sudjeluje u prezentaciji bolesti, patološkoj progresiji te pokušaju oporavka homeostaze (Reed & sur., 2022.).

1.7. GRAĐA I ULOGA MIJELINSKOG OLIGODENDROCITNOG GLIKOPROTEINA (MOG)

Mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (MOG) je mijelin specifičan, visokokonzerviran među vrstama i gotovo ekskluzivno eksprimiran na oligodendrocitima u SŽS-u (Hegen & Markus, 2020.). Nalazi se u 0,05% mijelinskih vlakana ali su njegovi epitopi vrlo imunogeni. Kada se govori o konzerviranosti epitopa, ona je uočena u miša, štakora, goveda, majmuna i ljudi, dok ga nema u reptila i ptica pri čemu je jasno kako je konzerviran u sisavaca.

Glikozilacija doprinosi različitosti MOG izoformi. Ekspresija MOG-a je usporedna sa mijelinizacijom, a pokazano je kako je produljena 24 – 48 sati u odnosu na druge glavne mijelinske proteine što ga čini izvrsnim biljekom zrelih oligodendrocita.

Funkcije koje se vežu uz MOG su djelovanje kao adhezijske molekule, reguliranje stabilnosti mikrotubula oligodendrocita te izravna aktivacija klasičnog puta komplementa što ga dovodi u svezu sa imunskim sustavom (Johns & Bernard, 2002.).

MOG pripada superobitelji imunoglobulina sa izvanstaničnom imunoglobulinskom varijabilnom domenom. Dok su drugi članovi obitelji pričvršćeni za membranu glikolipidnim sidrom ili imaju samo jednu transmembransku domenu, MOG se sastoji od transmembranske hidrofobne domene, kratke citoplazmatske petlje, još jedne hidrofobne domene unutar dvosloja te terminalnog kraja u citoplazmi (Ambrosius & sur., 2020.).

1.8. DEMIJELINIZIRAJUĆE BOLESTI SŽS-A: MS, NMOSD I MOGAD

Multipla skleroza (MS), poremećaji iz spektra optičkog neuromijelitisa (NMOSD) te bolesti vezane uz antitijelo na MOG (MOGAD) se svrstavaju u demijelinizirajuće, autoimune bolesti SŽS-a. Iako im se kliničke slike u mnogobrojnim slučajevima preklapaju, razvijanje diferencijalne dijagnostike tijekom vremena je omogućilo prepoznavanje ovih poremećaja kao zasebnih entiteta sa zasebnim karakteristikama.

1.8.1. MULTIPLA SKLEROZA

Multipla skleroza je kronična upalna bolest koja se s obzirom na tijek bolesti može podijeliti na: relapsno – remitirajuću MS koja je najzastupljenija i zahvaća 70 – 80 % pacijenata,

primarno progresivnu MS, sekundarno progresivnu MS te primarno relapsirajuću MS. U MS spektar se nekad uključuju i klinički izolirani sindrom (CIS) koji se definira kao epizoda demijelinizacije te se sam često smatra početkom multiple skleroze, fulminantna MS koja ima izuzetno brz i progresivan tijek te benigna MS koju odlikuju blagi tijek i rijetki relapsi (Tafti & sur., 2022.).

Javlja se 2.3 puta češće u žena te se smatra kako je zastupljenija u osoba koje žive na sjevernoj polutki i u osoba sjevernoeuropskog podrijetla (Stadelmann & sur., 2019.). Iako su u nastanak bolesti uključeni brojni geni te razni okolišni faktori navedeno se može objasniti niskom izloženosti sunčevim zrakama te posljedično tome niskim razinama vitamina D. U skladu sa ovim opažanjima provedena su brojna istraživanja o utjecajima polimorfizma gena koji utječu na metabolizam i regulaciju vitamina D (Elkama & Karahalil, 2018.).

Od ostalih faktora rizika (uz niže koncentracije vitamina D) spominju se: stres, pušenje, prekomjerna tjelesna težina te česte infekcije u djetinstvu uz isticanje povijesti infektivne mononukleoze pri čemu se dovodi u pitanje očuvanje integriteta KMB (Stadelmann & sur., 2019.).

Prema podacima iz 2015. godine prevalencija MS u Republici Hrvatskoj iznosila je 145:100 000 stanovnika (Benjak & sur., 2018.) uz naučestalije pojavljivanje u planinskom dijelu oko Čabra (Gorski kotar) (Sertić, 2009.).

Iako se može pojaviti u svakoj dobi, najčešće se pojavljuje u dobi od 20. do 40. godine. U malom postotku slučajeva (2 – 5%) demijelinizirajući napad se događa prije 18. – e godine te se uz takve pedijatrijske pacijente vežu češći relapsi, što ukazuje na jaču upalnu komponentu, ali i tokom vremena sporija akumulacija poteškoća (Jakimovski & sur., 2022.). Zbog ranijeg početka bolesti, unatoč sporijem i dobroćudnijem tijeku u konačnici MS kod pedijatrijskih pacijenata može uzrokovati jednake poteškoće kao i u odraslih (Burgos - Blasco & sur., 2022.).

Postotak oboljelih osoba sa pozitivnom obiteljskom anamnezom kreće se od 12 do 15% (Šendula-Jengiđ & sur., 2012.). Rizik oboljenja ako je jedan roditelj MS bolesnik iznosi 2%, što je unatoč malom postotku i dalje 10 do 20 puta više od onog u ukupnoj populaciji. Ako oba roditelja boluju rizik iznosi 20%. U jednojajčanih blizanaca incidencija iznosi 20 – 30%, dok kod dvojajčanih taj postotak iznosi 5% (Tafti & sur., 2022.).

Smatra se kako se zbog akumulacije komplikacija životni vijek kod ovih pacijenata skraćuje za 5 do 10 godina u odnosu na ostalu populaciju. Uz fizičku onesposobljenost, kao

jedan od najčešćih komorbiditeta u neurološkim bolestima, spominje se i depresija u skladu s kojom se javlja i veća stopa samoubojstava u odnosu na „zdravu“ populaciju (Šendula-Jengiđ & sur., 2012.). Gori ishod bolesti oćekuje se u osoba: koje nisu bijele rase, koje su muškog spola, sa progresivnim oblikom MS, visokih početnih stopa relapsa te multifokalnog² početka (Tafti & sur., 2022.).

1.8.1.1. DIJAGNOSTIĆKI KRITERIJI MS

Dijagnoza MS postavlja se na temelju McDonaldovih kriterija prvotno postavljenih 2001. godine. S godinama su doživljavali preinake, pri ćemu je posljednja verzija nastala 2017 (Solomon & sur., 2019.). Prema ovim kriterijima su u dijagnostiku uključene oligoklonske vrpce u likvoru koje su pozitivne u 85 – 90 % slučajeva. Oligoklonske vrpce u likvoru ne nestaju te se ne mijenjaju tijekom bolesti (Ambrosius & sur., 2020.).

Iako ne postoji jedinstveni test ćiji bi rezultati mogli ukazivati na pojavu bolesti, dijagnoza MS se postavlja na temelju povijesti bolesti, fizikalnog pregleda, MR, evociranih potencijala te analiza krvi i likvora. Pritom je potrebno postojanje dokaza o dva ili više relapsa (uoćene dvije ili više lezija ili jedna lezija sa dokazima o prethodnom relapsu).

Jedna od temeljnih znaćajki MS su DIS (diseminacija u prostoru) koja se potvrćuje sa barem jednom lezijom u dva od ćetiri ovih podrućja: kraljećnićnoj moćdini, infratentorialnim, jukstakortikalnim ili periventrikularnim regijama te DIT (diseminacija u vremenu) koja prati bolest u skladu sa vremenom.

Lezije u MS su obićno ovalne no mogu biti i fragmentirane. Peripendikularne su na endimalnim površinama (Dawsonovi prsti), a zamjećuje se i stanjivanje corpora callosuma te atrofija parenhima. Lezije na kraljećnićnoj moćdini su obićno locirane na cervikalnom ili torakalnom dijelu (Tafti & sur., 2022.).

Ukoliko su samo neki kriteriji za postavljanje dijagnoze MS postignuti govori se o „mogućoj MS“ (Rosenthal & sur., 2020.).

² multifokalno - sa više Źarišta

1.8.1.2. KLINIČKA SLIKA MS

Širok spektar simptoma kojima se MS predstavlja odgovara različitim lokacijama i stupnju ozljede tkiva, a u područjima kod kojih dolazi do nestanka mijelina nastaju ožiljci koji se nazivaju sklerozom ili lezijama (Šendula - Jengiđ & Guščić, 2012.).

U početku se često javljaju dvoslike, nejasan vid ili gubitak vida na jednom oku uz miješanje boja. Optički neuritis se pojavljuje u 70% pacijenata, dok se kod prvih demijelinizirajućih napada javlja u čak 25% slučajeva te je obično unilateralan (Denis & sur., 2022.). Gubitak vida veže se uz bol u orbiti koja je jača prilikom pokretanja oka, čijim se razlogom smatra iritacija upaljenog optičkog živca.

Nadalje, dolazi do slabosti mišića udova te do poremećaja u koordinaciji i ravnoteži. Javlja se umor, a kao jedan od najčešćih komorbiditeta spominje se i depresija. Problemi se javljaju i u gastrointestinalnom te mokraćnom sustavu te se očituju retencijom ili inkontinencijom stolice ili mokraće.

Atrofija mozga korelira sa kognitivnim poremećajevima u koje su uključeni poremećaj pažnje, koncentracije i pamćenja uz teškoće rasuđivanja.

Još neki od simptoma koji se javljaju su gubitak osjeta, patološki refleksi, trnjenje (parestezija), paraplegija te teškoće u govoru (Sertić, 2009.).

Trigeminalna neuralgija se javlja 20 – 400 puta češće u MS pacijenata. Definira se kao iznenadna probadajuća bol koja obuhvaća jednu ili više grana trigeminalnog živca. Do ovakvih napada može doći i više puta dnevno te mogu trajati djelić sekunde ili nekoliko sekundi.

Spastičnost se često javlja kao posljedica demijelinizirajućih lezija u kralježničnoj moždini i moždanom deblu pri čemu dolazi i do ukočenosti i osjetljivosti mišića uz bolne grčeve.

1.8.2. POREMEĆAJI IZ SPEKTRA OPTIČKOG NEUROMIJELITISA

Poremećaji iz spektra optičkog neuromijelitisa (NMOSD) su autoimune astrocitopatije te kao i MS pripadaju progresivnim bolestima. S obzirom da je optički neuromijelitis (NMO) prvotno opisao Eugene Devic, 1894. godine, NMO se još naziva i Devicevom bolesti. 2015. godine ujedinjeni su termini NMO i NMOSD zbog istovjetne kliničke slike te jednakog načina liječenja te su u skladu sa time donijeti kriteriji za postavljanje dijagnoze (Bašić - Kes & sur., 2018.).

Sve do identifikacije specifičnih antiAQP4 antitijela (99% specifična za NMOSD) 2004. godine, koje ima 60 – 90 % pacijenata, NMOSD su bili smatrani podvarijantom MS. U prilog tome ide i niska prevalencija te simptomi slični drugim autoimunim bolestima demijelinizirajućeg tipa. AntiAQP4 antitijela su također doprinijela dijagnozi stanja koja prethodno nisu odgovarala NMO kriterijima (Vukasović & Mikula, 2018.).

NMOSD se više od 3 puta češće pojavljuje u žena nego u muškaraca najčešće (iako ne isključivo) u dobi od 33 do 45 godina (Sepulveda & sur., 2022.). U zapadnim zemljama se procjenjuje pojava bolesti u 1 do 4,4/ 100 000 stanovnika (Bašić - Kes & sur., 2018.). Studija provedena u Kubi je pokazala kako etnicitet igra ulogu u fenotipu bolesti. Objavljeno je da su Afroamerikanci oboljevali u starijoj dobi te imali više lezija dokazanih slikovnim tehnikama uz češće relapse (Cabrera - Gomez & sur., 2009.).

Napadi se pojavljuju gotovo dva puta češće u NMOSD nego u MS pacijenata te su povezani sa težim neurološkim oštećenjima te nižim stopama potpunog oporavka (Knapp & sur., 2021.). Prema studijama, čak 7% pacijenata ne pokazuje nikakav oporavak, dok se do 22% u potpunosti oporavi (Shumway & sur., 2021.).

NMOSD se često pojavljuje uz druge autoimune bolesti poput sistemskog lupusa, sarkoidoze te Sjörgenovog sindroma (Bašić - Kes & sur., 2018.). Također, pokazano je kako se u 20 – 30% slučajeva NMOSD napadi pojavljuju nakon nekog okolišnog poticaja poput cijepljenja ili nakon infekcije (Shumway & sur., 2021.). Prema istraživanju koje je provedeno kako bi se pratila pojava relapsa u MOGAD ili NMOSD pacijenata cjepljenih mRNA cjepivima protiv COVIDa – 19 pokazana je niska stopa napada. Nuspojave (poput vrućice) kod infekcije ili cijepljenja mogu pogoršati simptome bolesti te je u skladu sa time 17,8% pacijenata nakon cijepljenja prijavilo nove simptome ili pogoršanje postojećih (Dinoto & sur., 2021.).

1.8.2.1. DIJAGNOSTIČKI KRITERIJI NMOSD

Kako bi se postavila dijagnoza NMOSD moraju biti obuhvaćena iduća tri kriterija: barem jedna NMOSD klinička karakteristika, pozitivnost na anti AQP4 antitijela uz isključivanje alternativnih dijagnoza sa pokazateljima koji se vežu uz MS („red flags“).

U slučaju da anti AQP4 antitijela nisu prisutna ili je sam status antitijela nepoznat, dijagnostički kriteriji svode se na: barem dvije kliničke karakteristike koje su posljedica jednog ili više NMOSD napada pri čemu barem jedan klinički pokazatelj mora biti optički neuritis (ON), akutni mijelitis uz longitudinalno ekstenzivan transverzni mijelitis (LETM) ili sindrom

areje postreme. Uz to mora doći do diseminacije u prostoru te isključivanja alternativnih dijagnoza (Wingerchuk & sur., 2015.).

Lezije u NMOSD su longitudinalno ekstenzivne te se protežu kroz tri ili više kralježničnih segmenata pri čemu najčešće zahvaćaju torakalni i cervikalni dio. Zahvaćeni su poprečni presjeci segmenata praćeni edemom. U 55 – 84 % slučajeva mozak nije zahvaćen, a u slučaju zahvaćenosti ističu se područja s visokom ekspresijom AQP4 poput hipotalamusa i moždanog debla. U tom slučaju lezije su najčešće prisutne u bijeloj tvari, jukstakortikalno te subkortikalno. Nisu ovalne kao kod MS, a kod korpusa kalozuma se javljaju u donjem dijelu. Uz lezije se vežu depozicije IgG, IgM te komplemenata uz zadebljale krvne žile i infiltraciju neutrofila, eozinofila te makrofaga.

Neki znakovi mogu upućivati da se ne radi o NMOSD, a takvi znakovi navode se u literaturi kao „red flags“ te su neki od njih: lezije oko lateralnih ventrikula (Dawsonovi prsti), jukstakortikalne lezije te lezije donjeg temporalnog režnja pri čemu treba posumnjati na MS. Također je jednaka situacija ako lezije zahvaćaju manje od tri segmenta kralježnične moždine, dominantno su smještene periferno ili dolazi do difuzne promjene signala. Parcijalni transverzni mijelitis, progresivni tijek bolesti te pozitivne oligoklonske vrpce također upućuju na MS (Bašić Kes & sur., 2018).

U NMOSD oligoklonske vrpce su prisutne u otprilike 15 – 30 % pacijenata, ukupni proteini su povišeni kod 25 – 30% pacijenata (Ambrosius & sur., 2020.), dok su pozitivna autoantitijela (ANA, SS – A, SS – B) prisutna u 38 – 75 % slučajeva (Paul & sur., 2007.).

Sličnu manifestaciju mogu pokazivati i sarkoidoza, tumori, akutni diseminirajući encefalomijelitis, sistemski eritemski lupus te infektivne bolesti, stoga je važno isključiti njihovu pojavnost prije postavljanja dijagnoze (Bašić Kes & sur., 2018).

1.8.2.2. KLINIČKA SLIKA NMOSD

NMOSD se najčešće manifestira optičkim neuritisom, akutnim transverznim mijelitisom i areja postrema sindromom (He & sur., 2022.). Relapsni oblik NMOSD je prisutan u 80 – 90% slučajeva dok se kod monofaznog oblika u isto ili blisko vrijeme javljaju ON i LETM nakon kojih nema relapsa. Bilateralan ON s brzom progresijom često ukazuje na NMOSD.

Karakterističan longitudinalno ekstenzivan transverzni mijelitis (LETM) koji zahvaća tri ili više segmenata kao što je navedeno i u prethodnim odlomcima, a dolazi i do spazama, simetrične tetraplegije, paraplegije, gubitka osjeta te poremećene funkcije mokraćnog sfinktera. Može doći i do pojave Lhermitteovog fenomena.

Zbog zahvaćenosti moždanog debla dolazi do pojave mučnine, štucaanja i povraćanja što je u skladu sa povećanom ekspresijom AQP4 u područjima areje postreme (kemosenzitivni centar koji regulira povraćanje smješten u dorsalnoj medulli (Cahill, 2020.)), a zbog lezija hipotalamusa može doći do debljanja i određenih poremećaja autonomnog sustava u koje su uključene hipotenzija, bradikardija te hipotermija. Navedene lezije hipotalamusa i moždanog debla, poput lezija areje postreme smatraju se atipičnima za MS (Kim & sur., 2022.). U težim slučajevima dolazi do zastoja disanja što se ujedno navodi kao jedan od uzroka povećanog mortaliteta (Shumway & sur., 2021.). Od ostalih simptoma može doći i do pojave gubitka sluha, trigeminalne neuralgije, vrtoglavice te ptoze kapka (Bašić - Kes & sur., 2018.).

1.8.3. BOLESTI VEZANE UZ ANTITIJELA NA MOG

Kod 20 – 25 % NMOSD pacijenata nije moguće detektirati antitijela na AQP4, a kod 40 – 50% takvih osoba dokazana je prisutnost antitijela na MOG. Zbog razlika u kliničkim značajkama, tijekom bolesti te prognozi mnogi autori koriste naziv - bolesti vezane uz antitijela na MOG (MOGAD) (Sepulveda & sur., 2022.). Pozitivnost na anti AQP4 antitijela udružena sa pozitivnošću na anti MOG antitijela je jako rijetka (1%) te se veže uz agresivniji tijek bolesti (Messias & sur., 2022.). U studiji provedenoj od strane Kunchoka i suradnika (Kunchok & sur., 2019.) pokazano je kako je samo 0,06% pacijenata bilo pozitivno na oba antitijela.

Često se već i nakon godinu dana antitijela na MOG u uzorcima nekih pacijenata više ne mogu dokazati što je u skladu sa studijom iz Brazila koja je prikazala povezanost duljeg vremena pozitivnosti na antitijela u serumu sa većom mogućnosti relapsa. Također, smatra se kako je vjerojatnije da će doći do relapsa ako je pri samoj dijagnozi MOGAD-a prisutan veći titar antitijela. (Shu & sur., 2022.)

Iako se češće pojavljuje u žena (63%) ta prednost nije toliko izražena kao kod MS i NMOSD pacijenata. Prosječno se pojavljuje u dobi od 31 do 37 godine, ali može se pojaviti tokom čitavog životnog vijeka. Dok su MS i NMOSD dosta zastupljene i u osoba žute i crne rase, MOGAD pacijenti su većinski bijele rase (Messias & sur., 2022.).

Istraživanjem je pokazano da kod MOGAD pacijenata u odnosu na NMOSD pacijente češće dolazi do relapsa (37.5% u odnosu na 24%) te su napadi javljaju ranije (2.6 u odnosu na 7 mjeseci) (Yong & sur., 2021.). Zbog istog je dovedena u pitanje blaža prognoza MOGAD-a, koja uz rjeđe ali teže NMOSD napade, može dovesti do sličnog, usporedivog stupnja oštećenja (Ringelstein & sur., 2021.). Ukoliko se bolest javi u pedijatrijskoj dobi prognoza u takvih pacijenata je bolja te se odlikuje manjom stopom relapsa (Shu & sur., 2022.).

Kod MOGAD-a se povezanost sa drugim autoimunim poremećajima javlja znatno rjeđe u odnosu na NMOSD (11% naprema 40%) (Messias & sur., 2022.).

1.8.3.1. DIJAGNOSTIČKI KRITERIJI MOGAD

Skupina znanstvenika je 2018. predložila dijagnostičke kriterije za definiranje MOGAD-a u pacijenata pri čemu su za potvrdu bolesti nužne tri komponente: pripadna klinička slika, dokazivanje demijelinizirajućih lezija pomoću slikovnih tehnika (MR) ili uz neurofiziološke testove (optička koherentna tomografija – OCT ili vizualno evocirani potencijali – VEP) te biokemijski testovi – dokazivanje antitijela na MOG sa testovima baziranim na stanicama (CBA- engl. cell based assay).

Za razliku od MS gdje se kao upalne stanice ističu CD8⁺ te se navode leukokortikalne³ demijelinizirajuće lezije, kod MOGAD – a dominiraju CD4⁺ T stanice te granulociti.uz intrakortikalne⁴ lezije (Ambrosius & sur., 2020.). Lezije se još vežu uz moždano deblo i četvrti ventrikul, za razliku od ovalnih lezija okomitih na lateralne ventrikule u MS (Gospe III & sur., 2021.). Oligoklonalne vrpce mogu se pronaći u 13.2% pacijenata, dok su ukupni proteini povišeni u otprilike 44% uzoraka. Stanice koje dominiraju su limfociti i monociti, dok su neutrofili prisutni u barem 43% slučajeva (Ambrosius & sur., 2020.).

Slikovne tehnike pokazale su lezije anteriornih optičkih puteva uz oticanje optičkog živca te ozljedu retrobulbarog segmenta živca (kod NMO pacijenata obično se spominju posteriorni optički putevi, intrakranijalni živci te uključenost hijazme).

Kod određivanja antitijela na MOG, IgG razreda, predlaže se korištenje Fc fragmenata ili IgG1 specifičnih sekundarnih antitijela kako bi se izbjegla križna reaktivnost sa IgM i IgA antitijelima (Ambrosius & sur., 2020.).

³ leukokortikalne – koje obuhvaćaju korteks i jukstakortikalnu bijelu tvar

⁴ intrakortikalne – unutar korteksa

1.8.3.2. KLINIČKA SLIKA MOGAD

MOGAD se često prezentira sa optičkim neuritisom i/ ili mijelitisom u odraslih te sa akutnim diseminiranim encefalomijelitisom (ADEM) u djece. Iako se u nekih pacijenata (najčešće djece) spominje monofazni tijek bolesti, većinom se javljaju relapsne faze.

Za razliku od MS, gdje je ON obično unilateralan uz kraće oštećenje optičkog živca, kod MOGAD se kao i kod NMOSD ističe bilateralan ON, zajedno sa longitudinalno ekstenzivnim transverznim mijelitisom (LETM). ON se javlja u 41 – 63 % slučajeva uz sekundarne napade koji se javljaju ranije nego u MS i NMOSD pri čemu se prognoza smatra boljom u odnosu na NMOSD (različiti patološki mehanizmi – u NMOSD se demijelinizacija veže uz aksonalnu ozljedu, dok kod MOGAD – a autori koriste termin „čista demijelinizacija“) (Messias & sur., 2022.).

Optička hijazma je zahvaćena u 0 – 15 % slučajeva u MOGAD pacijenata, dok kod NMOSD taj postotak iznosi 44 – 64% (Tajfirouz & sur., 2021.).

Idući najzastupljeniji pokazatelj je mijelitis (18 – 47%) te se uključenost conusa medullarisisa sa erektilnim i disfunkcijama mokraćnog sustava više veže uz MOGAD, nego uz MS i NMOSD pacijente. Zbog lezija moždanog debla također dolazi do areja postrema sindroma koji se očituje mučninom, povraćanjem i štucajem (Messias & sur., 2022.).

Cerebralni kortikalni encefalitis (CCE) je također jedan od manje zastupljenih pokazatelja MOGAD – a, a na njega ukazuju lezije sive tvari koje većinski obuhvaćaju cerebralni korteks i sulkus, no ne i subkortikalnu i duboku bijelu tvar. Uz vrućicu i glavobolju, CCE doprinosi simptomima poput afazije, paralize te gubitka pamćenja (Shu & sur., 2022.).

1.9. RAZLIČITI TERAPIJSKI PRISTUPI

Određivanje anti-AQP4 i anti-MOG antitijela koje doprinosi diferencijalnoj dijagnostici demijelinizirajućih bolesti važno je u prvom redu kako bi se oboljelima pružila prikladna terapija koja se razlikuje kod ovih različitih entiteta.

Dok se imunomodulatorni lijekovi preferiraju kod MS, kod MOGAD-a i NMOSD-a se koriste imunosupresivni lijekovi. Imunomodulatorni lijekovi utječu na dijelove imunskog sustava, dok imunosupresivni lijekovi djeluju na njegovu cjelokupnu aktivnost..

1.10. LABORATORIJSKE METODE ZA DOKAZIVANJE ANTITIJELA

Uz pripadne kliničke slike pacijenata i slikovne tehnike, laboratorijske metode su postale neizostavan faktor u postavljanju dijagnoze MOGAD-a i NMOSD-a. Određivanje antitijela na MOG i AQP4 pomaže i u razlučivanju ovih bolesti od drugih demijelinizirajućih bolesti.

Neke od laboratorijskih metoda za dokazivanje antitijela na AQP4 i MOG su: radioimunoprecipitacija, imunoprecipitacija na Western blotu, protočna citometrija, imunoenzimski test – ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay), fluorescentna imunoprecipitacija i indirektna imunofluorescencija uz fiksirane rezove tkiva, žive ili fiksirane stanice.

Danas se najčešće koriste ELISA te metode indirektno imunofluorescencije (IIF) temeljene na fiksiranim stanicama transficiranim ljudskim AQP4 i MOG.

1.10.1. NAČELO ELISE

ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) je posredna imunokemijska metoda kod koje se antitijela ili antigeni obilježavaju. Kod takvih metoda prvotno nastaje nevidljiv kompleks analita i antitijela, dok se nakon toga osnovna reakcija nastoji vizualizirati uz pomoć detekcijskog, obilježenog antitijela ili antigena. Kod ELISA metode se na specifičnu reakciju nadovezuje enzimski reakcija pri čemu je enzimski aktivnost razmjerna koncentraciji analita. Dodatkom supstrata enzima dolazi do promjene boje ili količine emitiranog svjetla.

1.10.2. NAČELO INDIREKTNE IMUNOFLUORESCENCIJE

Imunofluorescencija (IF) je metoda koja se koristi specifičnim fluorescentno obilježenim antitijelima kako bi se odredila količina i položaj molekula u fiksiranim djelićima tkiva te fiksiranim ili živim stanicama što ju definira kao histokemijsku i citokemijsku tehniku. Fluorescentno obilježena antitijela se potom vizualiziraju i dokazuju fluorescentnim mikroskopom. Kod ove metode osjetljivost ovisi o količini vezanih protutijela koja mogu biti monoklonska (vežu pojedinačne epitope) ili poliklonska (vežu brojne epitope). Obilježavanje se vrši fluoroforima koji su poliaromatski ugljikovodici poput korištenih fluorescein izotiocijanata (FITC) koji emitira zeleno svjetlo ili tetrametil rodamin izotiocijanata (TRITC) koji emitira crveno svjetlo.

Direktna imunofluorescencija (DIF) je jednostupanjski proces koji obuhvaća detektiranje antigena sa specifičnim fluorescentno obilježenim antitijelima te se ti antigeni dokazuju u tkivima.

Indirektna imunofluorescencija (IIF) je postupak koji se odvija u dva koraka pri čemu se antitijela otkrivaju u serumu ili u likvoru bolesnika. Prvotno dolazi do vezanja neobilježenog antitijela na antigene, a potom obilježeno anti – antitijelo prepoznaje antitijelo vezano za antigen. Indirektna imunofluorescencija se koristi u rutinskom dokazivanju autoantitijela. (Cuffari, 2021.)

1.10.2.1. INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENCIJA TEMELJENA NA TRANSFICIRANIM STANICAMA

Indirektna imunofluorescencija temeljena na transficiranim stanicama (CBA IIF) je metoda u kojoj se kao antigeni supstrati koriste žive ili fiksirane stanice transficirane antigenom od interesa.

Ispitivanjem metoda kojima su se određivala antitijela na AQP4 pokazano je kako CBA koji se koriste živim stanicama pokazuju veću osjetljivost u odnosu na prethodno korištene metode za dokazivanje ovih antitijela. Gospe III i suradnici navode u svom istraživanju kako su pozitivni rezultati dobiveni u 3/4 NMOSD slučajeva pri čemu se postiže specifičnost > 99% (Gospe III & sur., 2021.). Istraživanjem i uspoređivanjem komercijalnih CBA testova nije pokazana razlika u osjetljivosti M1 i M23 AQP4 izoformi, iako se u nekim studijama navodi kako se korištenjem M23 izoforme povećava omjer signala i pozadinskih šumova (Waters & sur., 2014.).

CBA IIF bazirani na živim stanicama smatraju se i dijagnostičkim zlatnim standardom u određivanju antitijela na MOG (Waters & sur., 2019.). Razlog navedenom je što su antitijela na MOG osjetljiva na konformacijske promjene epitopa pa se uz žive stanice te nativnu konformaciju MOG-a osigurava njihovo bolje vezanje. (Tea & sur., 2020.)

Princip pripremanja CBA testa temelji se na kloniranju dijela ljudske DNK koji sadrži gene za AQP4 u plazmid kako bi se dobio kompleks AQP4 i zelenog fluorescentnog proteina (EGFP – engl. enhanced green fluorescent protein). Stanice ljudskog embrionalnog bubrega (HEK – engl. human embryonic kidney) se zatim transficiraju sa AQP4 – EGFP kompleksom i fiksiraju na stakalca te koriste kao antigeni supstrat (Kang & sur., 2012.). Na isti način stanice

se transficiraju i MOG – EGFP kompleksom čime se omogućava istovremeno kombinirano određivanje antitijela na AQP4 i MOG.

Problem koji se zna rijetko javiti kod CBA testova je vezanje antitijela na druge antigene na ciljnim stanicama. Kako bi se navedeno spriječilo antigeni se obilježavaju fluorescentnim proteinom što opet može dovesti do promjene u njihovoj konformaciji (Kang & sur., 2012.). Važno je naglasiti kako i samo fiksiranje stanica može dovesti do promjene u konformaciji antigena čime se smanjuje osjetljivost testa. Dijagnoza se ne smije postavljati na temelju rezultata jednog testa (važno je ponoviti testiranje), a kako bi došlo do pravovremene i točne dijagnoze potrebno je u obzir uzeti i kliničku sliku pacijenta (Granieri & sur., 2012.).

Uz navedena ograničenja koja su velikim dijelom rezultat neizostavnog ljudskog faktora, CBA test sa fiksiranim stanicama se ističe svojim brojnim prednostima.

Testovi sa fiksiranim stanicama u odnosu na one sa živim stanicama omogućavaju lakši prijevoz i pohranu zbog čega ih je lakše koristiti u rutinskim laboratorijima (Waters & sur., 2019.). Uglavnom su komercijalni te stoga i mnogo dostupniji od određenih „in house“⁵ testova korištenih u nekolicini specijalističkih laboratorija. Varijabilnost u rezultatima smanjuje se standardizacijom, a korištene stanice spremaju se u tekućem dušiku do konačnog uklapanja u test čime se smanjuje varijabilnost tijekom transficiranja stanica ljudskim AQP4 i MOG.

⁵ „in house“ - razvijeni u pojedinim laboratorijima

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Dokazivanje antitijela na AQP4 i antitijela na MOG omogućilo je razlučivanje različitih demijelinizirajućih entiteta i postavljanje dijagnostičkih kriterija. Zbog razvoja novih lijekova i različitih načina liječenja pojedinih demijelinizirajućih bolesti važno je postaviti dijagnozu u najkraćem mogućem roku, a određivanje antitijela na AQP4 i MOG omogućuje ranu diferencijalnu dijagnostiku ovih bolesti.

Osim poboljšanja osjetljivosti i specifičnosti, razvojem novih metoda za dokazivanje antitijela nastoji se povećati točnost, pojednostavniti postupak provođenja testa te smanjiti mogućnost ljudske pogreške (Baratloo & sur., 2015.).

Cilj ovog rada je usporediti dvije metode za dokazivanje antitijela na AQP4, ranije korištenu ELISA metodu i novu metodu CBA IIF, ispitati njihovu dijagnostičku osjetljivost, specifičnost i točnost te usporediti dobivene rezultate s podacima iz literature. Komercijalno dostupan Euroimmunov CBA IIF test je namijenjen za kombinirano određivanje antitijela na AQP4 i MOG, pa je svrha ovog rada bila u laboratorijskim uvjetima ispitati i novu metodu CBA IIF za dokazivanje antitijela na MOG.

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb na uzorcima seruma pacijenata u sklopu rutinske obrade.

Antitijela na AQP4 određena su u serumima 87 pacijenata od kojih su 62 pacijenta ženskog te 25 muškog spola. Antitijela su određena metodom ELISA proizvođača RSR Aquaporin-4 Ab te metodom CBA IIF proizvođača Euroimmun, Njemačka.

Antitijela na MOG su određena u ukupno 66 uzoraka seruma od kojih su 20 uzoraka pacijenata muškog i 46 ženskog spola (prikazano u Tablici 1.) metodom CBA IIF proizvođača Euroimmun, Njemačka.

Tablica 1. Podaci o ispitivanim uzorcima

Vrsta antitijela	n	Spol	
		muški	ženski
antitijela na AQP4	87	26	61
antitijela na MOG	66	20	46

n = ukupan broj ispitanih uzoraka

3.1. MATERIJALI KORIŠTENI ZA IZVOĐENJE CBA IIF

- nosači reagensa (svaki nosač sadrži 10 polja) uz BIOCHIP stakalca na kojima se nalaze pomoću vektora transficirane HEK 293 stanice sa AQP4 i MOG te stanice koje služe kao kontrola (stanice su fiksirane uz formaldehid te korištene kao antigeni supstrat (Kang & sur., 2012.))
- FITC obilježeni anti – humani IgG (podrijetlom iz koze) – konjugirano sekundarno antitijelo
- ljudska autoantitijela za pozitivnu kontrolu te negativna kontrola
- pufer za razrjeđivanje uzorka
- PBS (fosfatni pufer – phosphate buffer saline) pH 7.2
- Tween 20
- medij za učvršćivanje (glicerol)

- predmetna stakalca
- serum, plazma (uz EDTA, citrat ili heparin kao antikoagulans) ili likvor
- fluorescentni mikroskop BX51
- automatska pipeta (10 μ L, 100 μ L i 1 mL)

3.1.1. OPIS POSTUPKA

- Prije samog određivanja priprema se otopina PBS – Tween na način da se jedno pakiranje PBS – a doda u 1 L destilirane vode te se tome nadodaju 2 mL Tween – a 20. Svi ostali reagensi spremni su za uporabu.
- Uzorci se prvotno vorteksiraju. Ako je uzorak serum ili plazma (uz EDTA, citrat ili heparin kao antikoagulans) potrebno ga je razrijediti puferom za razrijeđivanje u omjeru 1: 10 (11.1 μ L uzorka uz 100 μ L pufera). Ako se kao uzorak koristi likvor nije ga potrebno razrijediti.
- Analitička faza započinje nanošenjem 30 μ L razrijeđenih uzoraka na svako polje nosača prilikom čega se pazi da ne dođe do stvaranja mjehurića.
- BIOCHIP stakalce se postavlja na postolje na način da svako polje dolazi u dodir sa uzrokom. Potom slijedi 30 minutna inkubacija na sobnoj temperaturi nakon čega se uzorci pomoću Pasteur pipete lagano ispiru pripremljenom otopinom PBS – Tween. BIOCHIP stakalce se zatim uranja 5 minuta u otopinu PBS – Tween – a.
- Idući korak je nanošenje konjugata na čista polja nosača reagensa. Prije nanošenja konjugat se mora promiješati te ga je potrebno zaštititi od sunčeve svjetlosti zbog osjetljivosti. Nakon vađenja BIOCHIP stakalaca iz otopine PBS – Tween i sušenja stražnjeg dijela, stakalca se postavljaju na postolje na način da dolaze u dodir sa konjugatom. Potom slijedi inkubacija od 30 minuta koju je, kao i daljnje korake, važno provoditi u mraku.
- Ponovno se uzorci ispiru otopinom PBS – Tween te uranjaju u otopinu na 5 minuta.
- Slijedi vađenje BIOCHIP – a iz PBS – Tween – a i sušenje stražnjeg dijela stakalca.
- Na BIOCHIP stakalca se nanosi kap glicerola te se prekrivaju predmetnim stakalcem.
- Gotovi preparati se odmah analiziraju fluorescentnim mikroskopom ili se mogu pohraniti u hladnjaku na 4° C do idućeg dana.

3.1.2. INTERPRETACIJA REZULTATA CBA IIF

Na pozitivnu reakciju na anti AQP4 antitijela ukazuje ravan, gladak do fino granuliran obrazac fluorescencije, dok na pozitivnu reakciju na anti MOG antitijela ukazuje grubo granulirana fluorescencija. Fluorescencija je naglašenija na membrani stanice što je u skladu sa položajem samih molekula AQP4 i MOG na membranama.

Proizvođač testa u svojim specifikacijama navodi stupnjevanje intenziteta fluorescencije od 0 do 5, pri čemu 0 znači da nema specifične fluorescencije, a 5 označava izrazito jaku fluorescenciju.

Semikvantitativnom evaluacijom može se procijeniti titar antitijela koji je definiran kao dilucijski faktor kod kojeg je identificirana specifična fluorescencija, pri čemu bi se dobiveni rezultati trebali usporediti sa reakcijom dobivenom u serumu/likvoru u kojemu nema antitijela na AQP4 ili antitijela na MOG.

3.2. MATERIJALI KORIŠTENI ZA IZVOĐENJA ELISA TESTA

- komplet testa u koji su uključeni reagensi (otopina biotiniliranih AQP4, peroksidazom obilježen streptavidin, TMB supstrat peroksidaze (3,3',5,5' tetrametilbenzidin), STOP otopina), kalibratori, kontrole te mikrotitarska pločica
- pufer za ispiranje
- ELISA Sunrise čitač pločica
- mješalica
- automatska pipeta (25, 50 i 100 μ L)
- multipipeta
- reagensi za održavanje uređaja
- serum

3.2.1. OPIS POSTUPKA

- 50 μ L kalibratora, kontrola i uzoraka pacijenata se pipetira u jažice čija je stijenka obložena s AQP4. Reagensi, kalibratori, kontrole i uzorci seruma pacijenata se prije upotrebe moraju stabilizirati na sobnoj temperaturi, a uzorci seruma i vorteksirati.

- U svaku jažicu se potom dodaje 25 μL otopine sa biotiniliranim AQP4 pri čemu se antitijela iz uzoraka (ako su prisutna) vežu u sendvič, nakon čega slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi 120 minuta na mješalici.
- Slijedi ispiranje sa 300 μL pufera koje se ponavlja tri puta.
- U svaku jažicu se zatim pipetira po 100 μL otopine peroksidazom obilježenog streptavidina za koji se veže biotin te se dobiveno inkubira ponovno na mješalici 20 minuta i ispire puferom.
- Potom se u svaku jažicu dodaje 100 μL supstrata peroksidaze – TMB (tetrametilbenzidina) čijim cijepanjem dolazi do plavog obojenja (inkubira se 20 minuta u mraku).
- U sve jažice se pipetira po 100 μL STOP otopine koja zaustavlja reakciju te plava boja pritom prelazi u žutu.
- Posljednji korak je očitavanje apsorbancije na ELISA Sunrise čitaču na 450 nm uz referentni (kontrolni) filtar na 620 nm unutar 60 minuta.

3.2.2. INTERPRETACIJA REZULTATA ELISA TESTA

Na temelju kalibracijske krivulje uređaj izračunava te prikazuje dobivene vrijednosti antitijela na AQP4 u uzorcima pri čemu su kao granične vrijednosti preuzete one iz specifikacija proizvođača i iznose 3 U/mL.

Rezultat se prema tome izražava kao „negativan“ ako su vrijednosti manje od 3 U/mL, odnosno „pozitivan“ ukoliko su one veće od 3 U/mL.

3.3. KLINIČKA PROCJENA DIJAGNOSTIČKIH POSTUPAKA

Kako bi se provela klinička procjena dijagnostičkih postupaka – osjetljivost, specifičnost i točnost matematički su izražene i izračunate pomoću idućih formula:

$$\text{OSJETLJIVOST} = \frac{TP}{TP+FN}$$

$$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{TN}{TN+FP}$$

$$\text{TOČNOST TESTA} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN}$$

pri čemu je TP – broj stvarno pozitivnih uzoraka (engl. true positive), TN – broj stvarno negativnih uzoraka (engl. true negative), FP – broj lažno pozitivnih uzoraka (engl. false positive) te FN – broj lažno negativnih uzoraka (engl. false negative).

4. REZULTATI

4.1. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTITIJELA NA AQP4

U Tablici 2. prikazani su rezultati određivanja antitijela na AQP4 u uzorcima seruma pacijenata dvjema metodama. Vrijednosti dobivene određivanjem antitijela pomoću ELISA RSR Aquaporin-4 Ab V2 testa su: 50 negativnih, 10 granično pozitivnih te 27 pozitivnih nalaza AQP4 antitijela. EUROIMMUN CBA IIF testom su dobiveni sljedeći rezultati (prikazano u Tablici 3.): 60 negativan rezultat (od kojih je 4 pozitivno, a 5 granično pozitivno na ELISI) te 27 pozitivnih (od kojih je 5 granično pozitivno na ELISI). Od 5 pacijenata s granično pozitivnim nalazom AQP4 antitijela na ELISI koji nisu pozitivni na CBA testu, svih 5 imaju drugu pripadnu dijagnozu, dok od 5 granično pozitivna rezultata ELISA testa koji su pozitivni i na CBA testu dva pripadaju pacijentima s drugom pripadnom dijagnozom, dok jedan pripada pacijentu čiji su podaci nepoznati.

Tablica 2. Rezultati određivanja anti AQP4 antitijela u uzorcima seruma pacijenata pomoću dvije metode (CBA IIF i ELISA)

	Pacijent	Spol	ELISA	CBA IIF	Postavljena dijagnoza NMOSD
1.	A.I.	M	-	-	ne
2.	B.M.	Ž	+/-	+	DA
3.	B.P.	M	-	-	ne
4.	B.D.	M	+	+	DA
5.	B.L.	Ž	-	-	ne
6.	B.R.	Ž	-	-	ne
7.	B.V.	Ž	-	-	ne
8.	B.E.	Ž	+/-	+	DA
9.	B.L.	M	-	-	nema podataka
10.	B.M.	Ž	-	-	ne
11.	B.M.	M	-	-	ne
12.	B.LJ.	Ž	+	+	DA
13.	C.M.	M	+	+	DA
14.	C.S.	Ž	-	-	ne
15.	D.M.	Ž	+	+	DA
16.	D.Š.	Ž	-	-	ne
17.	D.B.	M	+/-	-	ne
18.	F.Š.	M	-	-	ne
19.	F.V.	Ž	+	+	DA
20.	F.Ž.	Ž	+/-	+	ne
21.	G.S.	M	+	+	DA

22.	G.I.	Ž	-	-	DA
23.	G.P.	M	-	-	nema podataka
24.	H.G.	M	-	-	ne
25.	H.M.	Ž	-	-	ne
26.	H.A.	Ž	+	+	DA
27.	J.LJ.	Ž	-	-	ne
28.	J.M.	Ž	+	-	ne
29.	J.H.	M	-	-	ne
30.	J.S.	Ž	-	-	ne
31.	J.A.	Ž	-	-	ne
32.	K.I.	M	+	+	DA
33.	K-J.	Ž	-	-	ne
34.	K.Ž.	Ž	-	-	ne
35.	K.Ž	Ž	+	+	DA
36.	K.S.	Ž	-	-	ne
37.	K.G.	Ž	+	+	DA
38.	K.J.	Ž	-	-	ne
39.	K.N.	Ž	+/-	-	ne
40.	K.A.	Ž	+	-	DA
41.	K.P.	Ž	-	-	ne
42.	K.N.	Ž	-	-	DA
43.	K.A.	Ž	+	+	DA
44.	L.V.	M	-	-	ne
45.	M.A.	Ž	+	+	ne
46.	M.N.	M	+	-	nema podataka
47.	M.I.	Ž	-	-	ne
48.	M.A.	Ž	-	-	ne
49.	M.A.	Ž	+/-	+	nema podataka
50.	M.G.	Ž	+	+	DA
51.	N.Đ.	Ž	-	-	nema podataka
52.	N.K.	Ž	+/-	+	ne
53.	N.M.	Ž	+	+	DA
54.	N.L.	Ž	-	-	ne
55.	O.M.	M	-	-	ne
56.	O.J.	M	-	-	nema podataka
57.	O.D.	M	-	-	ne
58.	P.Ž.	Ž	-	-	ne
59.	P.N.	Ž	+	+	DA
60.	P.M.	Ž	-	-	ne
61.	P.Z.	Ž	-	-	ne
62.	R.D.	Ž	+	+	DA
63.	R.S.	Ž	-	-	ne
64.	S.D.	M	-	-	ne
65.	S.G.	M	-	-	ne
66.	S.V.	Ž	-	-	ne
67.	S.N.	Ž	+	+	DA
68.	S.A.	Ž	+	+	DA
69.	Š.H.	M	-	-	ne

70.	Š.K.	Ž	-	-	nema podataka
71.	Š.K.	Ž	-	-	ne
72.	T.D.	M	+/-	-	ne
73.	T.M.	Ž	+	-	nema podataka
74.	T.I.	Ž	-	-	ne
75.	T.M.	M	+/-	-	ne
76.	T.M.	Ž	+	+	DA
77.	V.I.	Ž	-	-	ne
78.	V.N.	Ž	+	+	nema podataka
79.	V.M.	Ž	-	-	ne
80.	V.B.	Ž	+	+	DA
81.	V.B.	M	-	-	ne
82.	V.R.	Ž	-	-	nema podataka
83.	V.V.	M	+	-	DA
84.	W.Z.	Ž	+	+	nema podataka
85.	Z.Z.	M	-	-	ne
86.	Z.M.	Ž	-	-	nema podataka
87.	Z.A.	Ž	+/-	-	ne

M – muški spol, Ž – ženski spol,

„+“ – pozitivni rezultati, „+/-“ – granično pozitivni rezultati, „-“ – negativni rezultati

Tablica 3. Prikaz razlika u rezultatima dobivenim metodom CBA IIF te ELISA

rezultati CBA IIF	„+“ na ELISI	„-“ na ELISI	„+/-“ na ELISI sa NMOSD dijagnozom	„+/-“ na ELISI sa drugom dijagnozom	„+/-“ bez podataka o dijagnozi
pozitivni (27)	22	/	2	2	1
negativni (60)	5	50	/	5	/

„+“ – pozitivni rezultati, „+/-“ – granično pozitivni rezultati, „-“ – negativni rezultati

4.1.1. OSJETLJIVOST, SPECIFIČNOST I TOČNOST ELISA RSR AQUAPORIN-4 AB V2 TESTA

U Tablici 4. prikazani su rezultati ELISA RSR Aquaporin-4 Ab V2 testa. Istraživanjem su dobivena 23 stvarno pozitivna rezultata (TP), 41 stvarno negativan rezultat (TN), 9 lažno pozitivnih rezultata (FP) i 2 lažno negativna rezultata (FN).

Tablica 4. Prikaz TP, FP, FN i TN rezultata temeljem određivanja antitijela na AQP4 ELISA Aquaporin-4 Ab V2 testom

		postavljena dijagnoza NMOSD	
		da	ne
rezultati ELISA Aquaporin-4 Ab V2 testa	pozitivni	TP = 23	FP = 9
	negativni	FN = 2	TN = 41

Na temelju navedenih podataka moguće je izračunati dijagnostičku osjetljivost, specifičnost i točnost korištenog ELISA testa:

$$\text{OSJETLJIVOST} = \frac{TP}{TP+FN} = 92\%$$

$$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{TN}{TN+FP} = 82\%$$

$$\text{TOČNOST TESTA} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} = 85,33\%$$

4.1.2. OSJETLJIVOST, SPECIFIČNOST I TOČNOST EUROIMMUN CBA IIF TESTA

U Tablici 5. su prikazani rezultati EUROIMMUN CBA IIF testa. Dobiven je 21 stvarno pozitivan (TP) rezultat, 47 stvarno negativnih (TN), 3 lažno pozitivna (FP) te 4 lažno negativna rezultata (FN).

Tablica 5. Prikaz TP, FP, FN i TN rezultata temeljem određivanja antitijela na AQP4 EUROIMMUN CBA testom

		postavljena dijagnoza NMOSD	
		da	ne
rezultati EUROIMMUN CBA testa	pozitivni	TP = 21	FP = 3
	negativni	FN = 4	TN = 47

Na temelju navedenih podataka izračunavaju se dijagnostička osjetljivost, specifičnost i točnost korištenog EUROIMMUN testa prema:

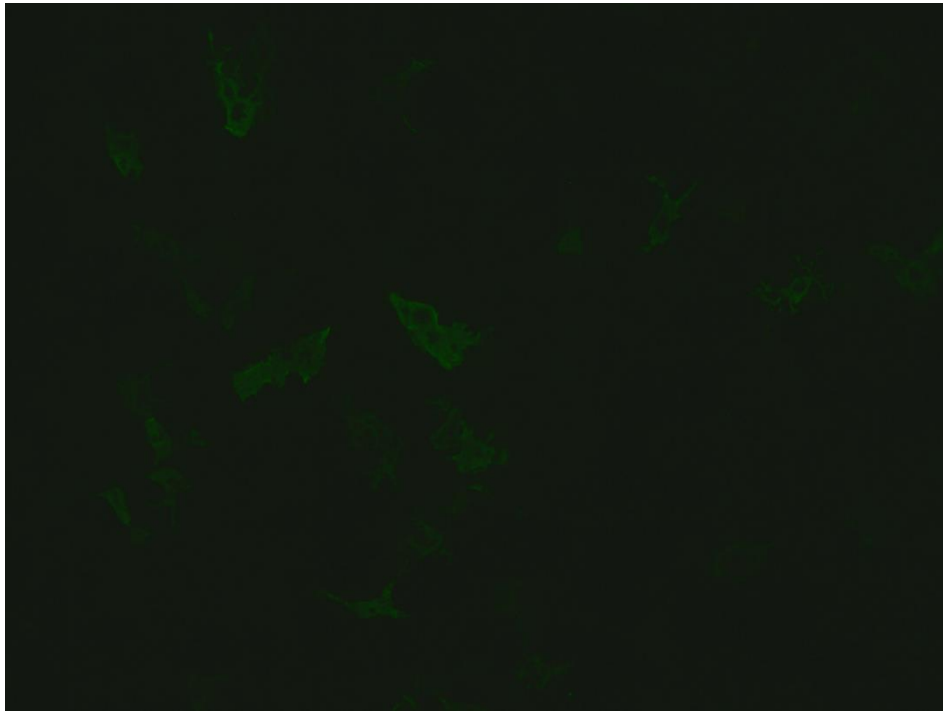
$$\text{OSJETLJIVOST} = \frac{TP}{TP+FN} = 84\%$$

$$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{TN}{TN+FP} = 94\%$$

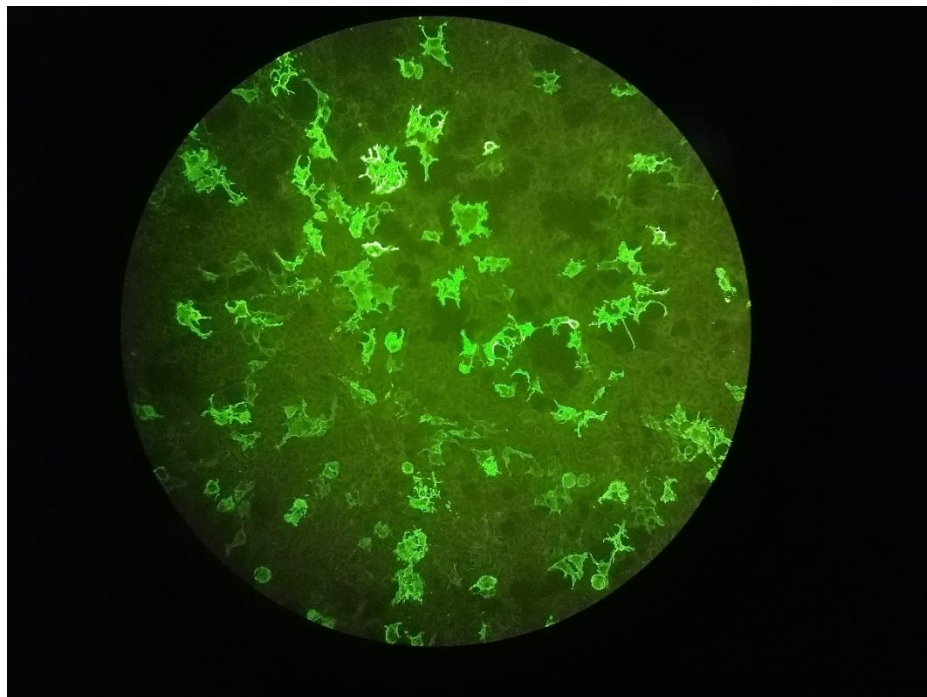
$$\text{TOČNOST TESTA} = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} = 90,67\%$$

4.1.3. PRIMJERI NALAZA ANTITIJELA NA AQP4 DOBIVENIH METODOM CBA IIF

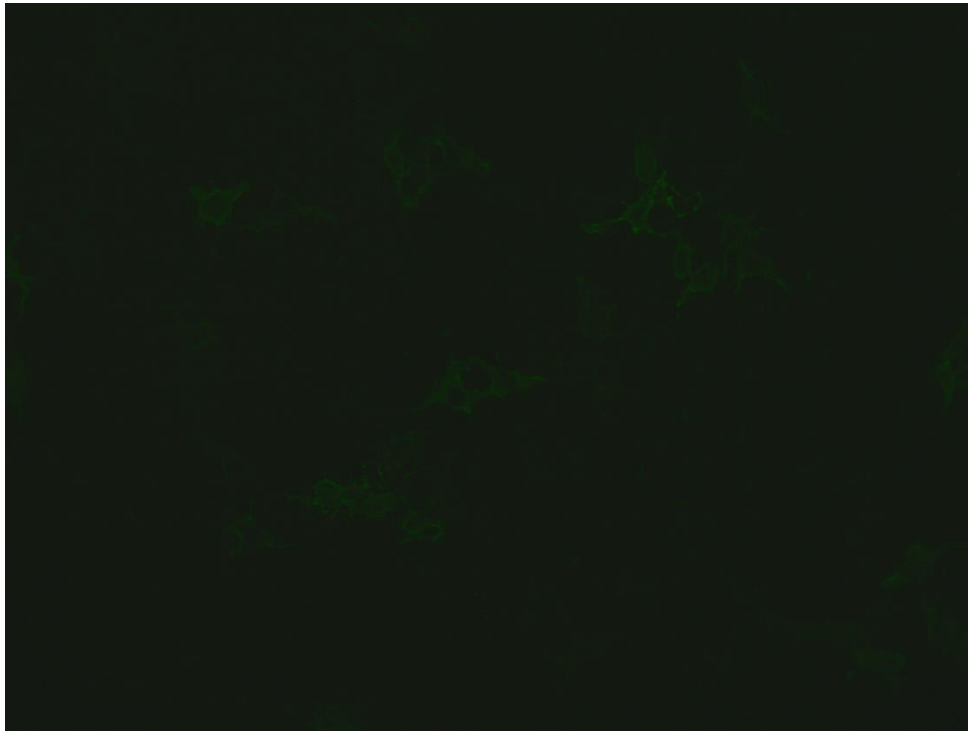
Na slikama 4. i 5. su prikazani rezultati pozitivne kontrole antitijela na AQP4, dok su na slikama 6. i 7. prikazani rezultati pozitivnih nalaza antitijela na AQP4 kod dva pacijenta (N.P. i K.I.). Vidljiv je ravan, fino granuliran obrazac fluorescencije.



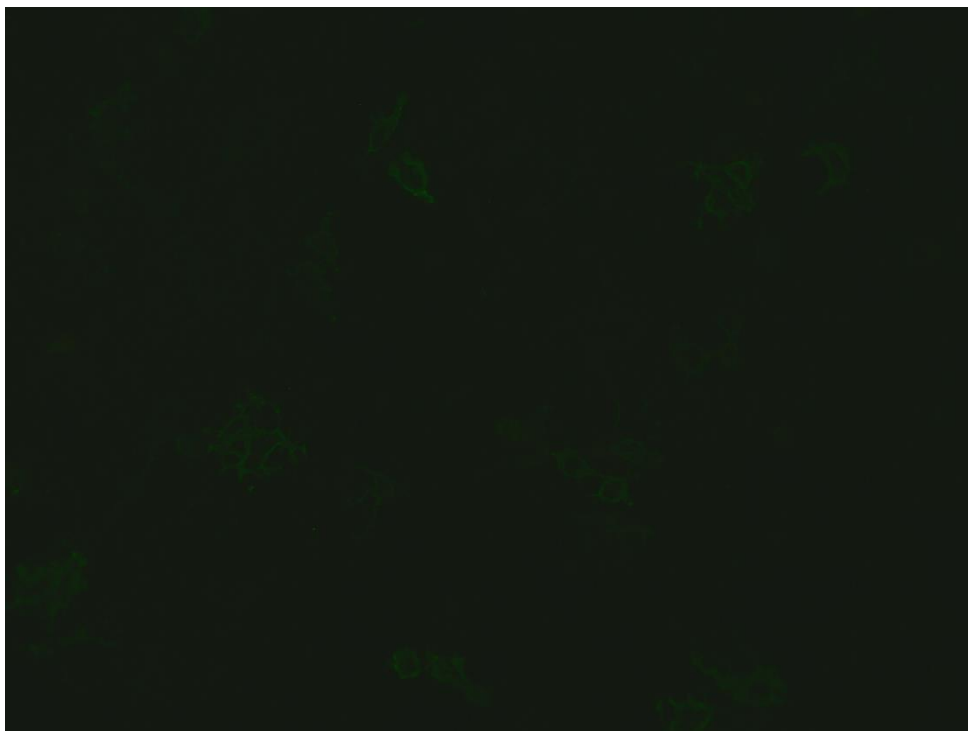
Slika 4. Pozitivna kontrola na anti AQP4 antitijela (slikano 20.05.2021. u KBC Zagreb)



Slika 5. Pozitivna kontrola na anti AQP4 antitijela (slikano 1.2.2022. u KBC Zagreb)



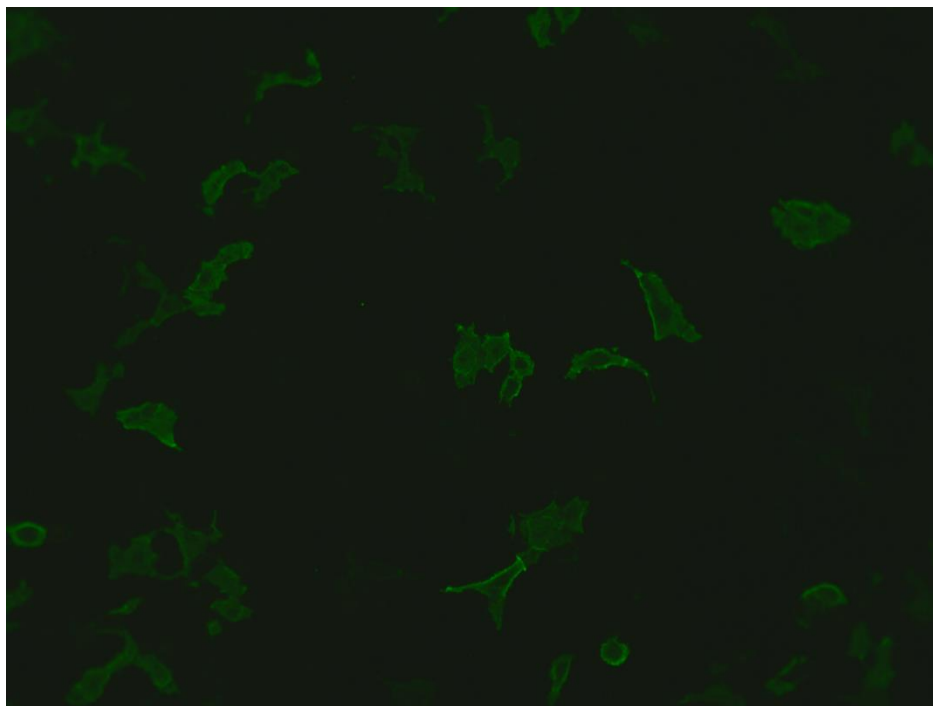
Slika 6. Pozitivan nalaz antitijela na AQP4 kod pacijentice N.P. (slikano 20.05.2021. u KBC Zagreb)



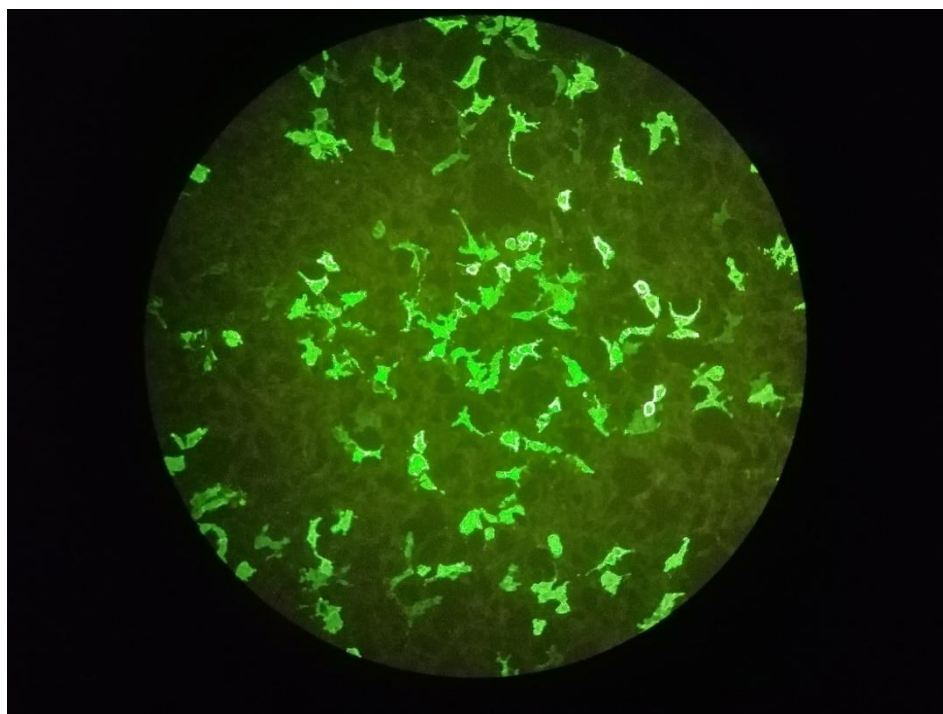
Slika 7. Pozitivan nalaz antitijela na AQP4 pacijenta K.I. (slikano 20.05.2021. u KBC Zagreb)

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA ANTI MOG ANTITIJELA

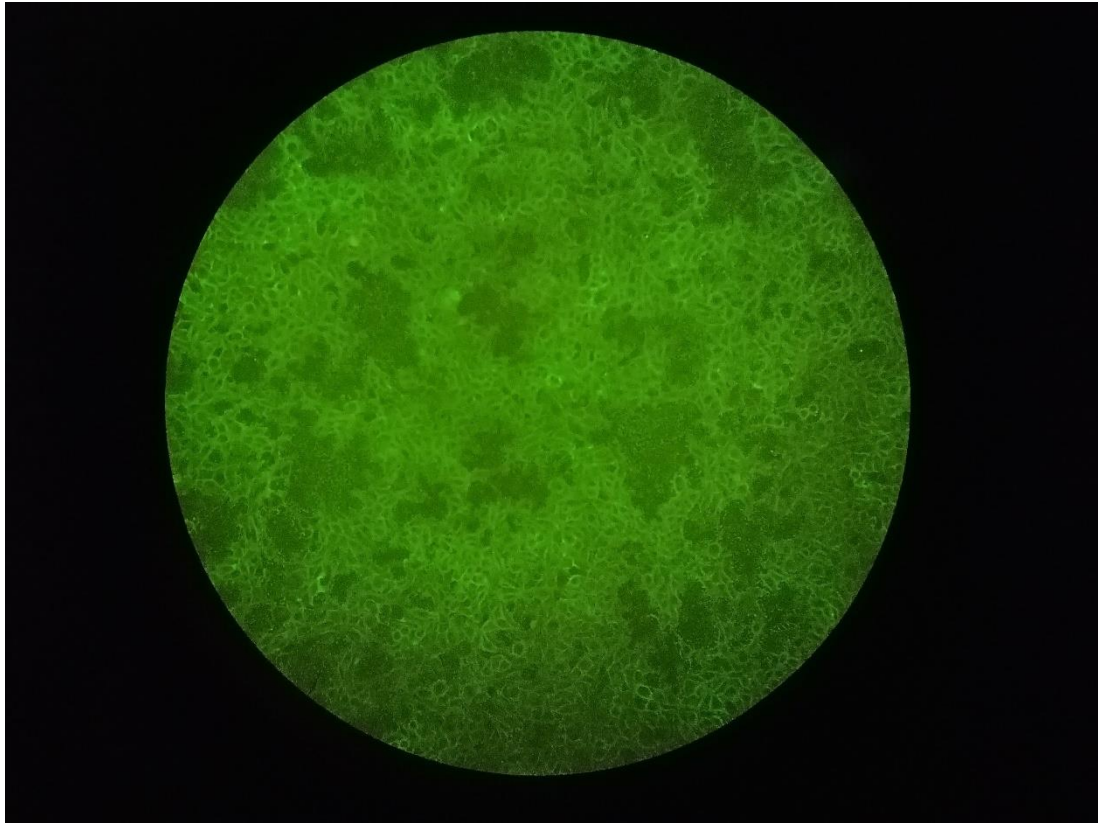
Na slikama 8. i 9. su prikazani rezultati pozitivne kontrole antitijela na MOG (obrazac grubo granulirane fluorescencije), dok su na slici 10. rezultati negativne kontrole antitijela na MOG.



Slika 8. Pozitivna kontrola na anti MOG antitijela (slikano 20.05.2021. u KBC Zagreb)



Slika 9. Pozitivna kontrola na anti MOG antitijela (slikano 1.2.2022. u KBC Zagreb)



Slika 10. Negativna kontrola na anti MOG antitijela (slikano 1.2.2022. u KBC Zagreb)

Od ukupno 66 uzoraka u kojima su se određivala antitijela na MOG, metodom CBA IIF su samo kod jednog pacijenta dokazana pozitivna antitijela na MOG.

5. RASPRAVA

Zbog vrlo slične kliničke slike i često preklapajućih simptoma između MS i NMOSD te MOGAD vrlo je teško i komplicirano postaviti dijagnozu u ranom stadiju bolesti. Rano postavljanje dijagnoze je ključno za pravilan odabir terapije jer u nekim slučajevima terapija za MS nije samo neučinkovita već može i pogoršati stanje bolesnika s NMOSD. Otkrićem antitijela na AQP4 te MOG napravio se značajan korak u diferencijalnoj dijagnostici ovih bolesti. Laboratorijski testovi koji se koriste za dokazivanje antitijela na AQP4 i MOG moraju zadovoljiti visoke kriterije osjetljivosti, specifičnosti i točnosti da bi se mogli primjenjivati u rutinskom radu.

U posljednjih nekoliko godina razvijene su vrlo osjetljive i specifične metode za dokazivanje antitijela bazirane na transficiranim stanicama koje za vizualizaciju koriste indirektnu imunofluorescenciju (Pittock & sur., 2019.).

U ovom radu su uspoređene dvije metode za dokazivanje antitijela na AQP4, ranije korištena ELISA metoda i nova metoda CBA IIF te je ispitana njihova dijagnostička osjetljivost, specifičnost i točnost. Kako je test koji je korišten u ovom istraživanju namijenjen za kombinirano određivanje antitijela na AQP4 i MOG, u ovom je radu u laboratorijskim uvjetima ispitana i nova metoda CBA IIF za dokazivanje antitijela na MOG.

5.1. ANTITIJELE NA AQP4

Antitijela na AQP4 otkrivena su u tkivu miša zbog čega su se kao prvi testovi za određivanje ovih antitijela koristili upravo testovi bazirani na tkivima. S obzirom da na specifičnost i osjetljivost utječe vrsta korištenog tkiva takvi su testovi pokazivali slabu osjetljivost (48 – 54 %) (Kang & sur., 2012.). Uslijedio je razvoj drugih metoda poput imunoprecipitacije, a potom i ELISE. U konačnici su se antitijela počela dokazivati testovima baziranim na stanicama (Pittock & Sean, 2021.). Brojnim je istraživanjima pokazana znatno bolja osjetljivost i specifičnost CBA IIF gdje su AQP4 eksprimirani u nativnoj konformaciji na površini stanice, u odnosu na IIF metode bazirane na tkivima ili ELISU koja koristi rekombinantne peptide ili proteine (Kang & sur., 2012.).

U ovom istraživanju antitijela na AQP4 i MOG određivana su EUROIMMUN CBA testom koji se bazira na fiksiranim stanicama. Provođenje testa je jednostavno, traje kraće u odnosu na ELISU, a dovoljan je maleni volumen uzorka (11,1 µL). S obzirom da se titar

antitijela povezuje sa stopom aktivnosti bolesti, semikvantitativni rezultati ovog testa mogu uputiti na stadij bolesti u kojem se pacijent nalazi.

U specifikacijama proizvođača korištenog CBA testa navodi se kako hemoliza, lipemija i ikterija ne utječu na analizu, dok se u specifikacijama proizvođača korištenog ELISA testa navodi kako te interferencije mijenjaju rezultate analize uz naglasak izdavanja takvih rezultata sa opaskom.

Kako bi se ispitala dijagnostička osjetljivost, specifičnost i točnost nove CBA IIF metode i prethodno korištene ELISA metode u ovom su istraživanju antitijela na AQP4 određivana u ukupno 87 uzorka (62 uzorka pripadala su osobama ženskog spola, dok je 25 pripadalo osobama muškog spola). 12 od ovih 87 osoba nema postavljenu dijagnozu ili je ona nepoznata stoga su u ukupan izračun osjetljivosti i specifičnosti uključeni rezultati 75 uzoraka. Kod 25 osoba postavljena je NMOSD dijagnoza, dok je ostalim pacijentima dijagnosticirana neka od drugih demijelinizirajućih bolesti (kod 13 osoba dijagnosticirana je MS).

Od 10 uzoraka koji su granično pozitivni na ELISA testu sedmero njih kao dijagnozu ima postavljenu drugu demijelinizirajuću bolest, dok za jedan od uzoraka ne postoje podaci. Pet granično pozitivnih uzoraka na ELISA testu negativno je na CBA IIF testu te su osobama kojima pripadaju ti uzorci dijagnosticirane druge demijelinizirajuće bolesti. Od 5 granično pozitivnih pacijenata na ELISA testu koji su pozitivni i na CBA IIF testu dvoje ima dijagnosticiranu drugu bolest, dok za jednu osobu ne postoje podaci. Prema navedenom moguće je zaključiti kako 100% osoba (5/5) granično pozitivnih na ELISA testu, a negativnih na CBA IIF nema NMOSD, dok isto vrijedi za 50% osoba (2/4) granično pozitivnih na ELISA testu koji su pozitivni i na CBA IIF. Osjetljivost i specifičnost dobivene za ELISA test ovise o definiranoj graničnoj vrijednosti koja u ovom slučaju iznosi 3 U/mL (ukoliko je granična vrijednost visoka biti će više lažno negativnih rezultata, dok ako je ona niska će biti više lažno pozitivnih rezultata (Čepelak & Štraus, 2009.)). Ovi rezultati upućuju na to da bi se granični rezultati dobiveni ELISA testom trebali dodatno potvrditi CBA IIF metodom.

U studiji provedenoj 2012. ispitivana je usporedivost CBA IIF te ELISE. Antitijela na AQP4 su dokazana kod 19 pacijenata pri čemu su pomoću sva tri testa (uključena i IIF bazirana na tkivima) dokazana u samo 6 osoba. Poznato je kako je pacijentima kod kojih su antitijela na AQP4 dokazana ELISOM i CBA IIF metodom postavljena NMOSD dijagnoza. Kod sedam ELISA pozitivnih, a CBA IIF negativnih uzoraka autori pretpostavljaju da je došlo do nespecifičnog vezanja serumskog IgG koji uzrokuje lažno pozitivne rezultate na ELISI. Zbog

navedenog upućuju na doprinos potvrde rezultata dobivenih ELISOM CBA IIF metodom. Studija je, međutim, provedena prije postavljanja dijagnostičkih kriterija koji objedinjuju NMO i NMOSD, a kao jedno od ograničenja Yoon – Joo Kim i suradnici naglašavaju mali broj NMOSD pacijenata (ukupno su ispitana 124 uzorka) (Kim & sur., 2012.).

Ovim istraživanjem ELISA RSR Aquaporin-4 Ab V2 testom dobiveno je 9 lažno pozitivnih rezultata (FP – false positive; pacijenti koji nemaju dijagnozu NMOSD, a test je ukazivao na pozitivne rezultate) te su također dobivena 2 lažno negativna rezultata (FN – false negative; pacijentima je postavljena dijagnoza NMOSD, a test je pokazao negativne rezultate). Stvarno pozitivnih rezultata (TP – true positive, sa postavljenom dijagnozom i pozitivnim testom) je 23, dok je stvarno negativnih (TN – true negative, bez NMOSD dijagnoze i sa negativnim rezultatima) ukupno 41.

Ispitivanjem dijagnostičke osjetljivosti, specifičnosti i točnosti ELISA testa za određivanje antitijela na AQP4 dobiveni su rezultati za osjetljivost 92%, specifičnost 82% i točnost 85,33%.

Osjetljivost od 92% ukazuje kako će 92% osoba sa postavljenom NMOSD dijagnozom biti seropozitivne na testu, dok će 8% osoba biti lažno negativno. Specifičnost od 82% ukazuje kako će 82% osoba kojima nije postavljena NMOSD dijagnoza biti ELISA testom klasificirane kao negativne, dok će 17% osoba biti lažno pozitivne. Točnost od 85,33% ukazuje kako će 85,33% osoba temeljem ove pretrage biti ispravno svrstano u skupinu oboljelih od NMOSD ili skupinu bez NMOSD dijagnoze.

Određivanjem antitijela na AQP4 CBA testom dobiven je 21 stvarno pozitivan (TP) rezultat (i dijagnosticiranih i seropozitivnih na EUROIMMUN testu), dok je stvarno negativnih (TN) 47 (negativnih na testu bez NMOSD dijagnoze). Dobivena su 3 lažno pozitivna rezultata (FP) te 4 lažno negativna rezultata (FN).

Ispitivanjem dijagnostičke osjetljivosti, specifičnosti i točnosti CBA IIF testa za određivanje antitijela na AQP4 dobiveni su rezultati za osjetljivost 84%, specifičnost 94% i točnost 90,67%.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da je korišteni ELISA test osjetljiviji u odnosu na CBA IIF test (92% u odnosu na 84%), dok se CBA IIF test pokazao specifičnijim (94% u odnosu na 82%). Točnost testa veća je kod CBA IIF testa (90,67%) u odnosu na ELISA test (85,33%).

Rezultati ovog istraživanja su u skladu s rezultatima dobivenima od strane proizvođača korištenih testova. U specifikacijama proizvođača ELISA testa (RSR, 2021.) ranije korištenog u KBC Zagreb navodi se kako se antitijela na AQP4 određuju sa osjetljivošću od 77%, specifičnošću od 99% te točnošću od 96%, dok se u specifikacijama proizvođača CBA IIF testa (Euroimmun, 2018.) navodi određivanje sa osjetljivošću od 75% (manje od ELISA testa) specifičnošću od 99,9% te točnošću od 97%.

Dobiveni pojedinačni rezultati ovog istraživanja za specifičnost, osjetljivost i točnost nisu potpuno identični onima koje su deklarirali proizvođači što se može objasniti relativno malim brojem ispitivanih uzoraka (ukupno 75 uzoraka pacijenata s potvrđenim dijagnozama), te selektivnim odabirom grupe pacijenata kod kojih su antitijela na AQP4 određivana (samo osobe s potvrđenom neurološkom bolesti). No, svrha ovog istraživanja je i bila ispitati test u stvarnim laboratorijskim uvjetima na populaciji pacijenata kod kojih se u ovoj bolničkoj ustanovi traži određivanje antitijela na AQP4.

Osim visoke osjetljivost i specifičnosti koja se zahtijeva od novouvedenog testa, u odabiru testa važan je i niz drugih faktora pri čemu se ističu vrsta i volumen korištenog uzorka ali i vrijeme te kompleksnost izvedbe. Iako se smatra kako je u slučaju probiranja na neku bolest važnija visoka dijagnostička osjetljivost (kako bi se dobio čim manji broj lažno negativnih rezultata), a u slučaju ispitivanja nove terapije specifičnost (Čepelak & Štraus, 2009.), EUROIMMUN CBA IIF test se unatoč nižoj osjetljivosti prikazanoj u ovom radu u odnosu na ranije korišten ELISA test (84% naprema 92%) može prikazati kao visokoosjetljiv i visokospecifičan test koji će u budućnosti zbog svojih brojnih prednosti postepeno zamjenjivati kompleksnije metode čije provođenje zahtijeva više vremena i koje za razliku od IIF metode daju rezultate manje točnosti.

5.2. ANTITIJELA NA MOG

Prve metode kojima su se određivala antitijela na MOG neposredno nakon njihova otkrivanja bile su ELISA i Western blot. Studija koja se bavila proučavanjem tih testova pokazala je kako su ELISA i Western blot češće pokazivali pozitivne rezultate i kod zdravih osoba i u pacijenata sa širokim spektrom simptoma (nisu razlikovali pozitivne i negativne uzorke pacijenata) te se zbog istog ne preporučaju u određivanju ovih antitijela. Unatoč tome u nekim laboratorijima ELISA se još uvijek koristi (Reindl & sur., 2020.). Kao zlatni standard u

dijagnostici antitijela na MOG s vremenom se razvila i visokom osjetljivošću i specifičnošću istaknula CBA IIF metoda bazirana na živim stanicama (Waters & sur., 2019.).

S obzirom na preklapajuću kliničku sliku MOGAD-a i NMOSD-a i činjenicu da je u 40-50% pacijenata u kojih se ne mogu dokazati antitijela na AQP4 prisutno antitijelo na MOG, EUROIMMUN CBA IIF kombinirani (mozaik) test je dobar izbor za ranu diferencijalnu dijagnostiku ova dva klinička entiteta. Test za dokazivanje antitijela na MOG je napravljen na identičan način kao i za dokazivanje antitijela na AQP4 uz korištenje stanica transficiranih s MOG-om. Time je na istom nosaču reagensa omogućeno istovremeno određivanje oba antitijela iz jednog uzorka pacijenta.

U ovom istraživanju su analizirani uzorci pacijenata metodom CBA IIF za kombinirano određivanje AQP4/MOG u stvarnim laboratorijskim uvjetima.

Dobiven je samo jedan pozitivan rezultat antitijela na MOG (ukupno je ispitano 66 uzoraka seruma od kojih 20 uzoraka pripada pacijentima muškog i 46 ženskog spola) što je u skladu sa niskom stopom prevalencije MOGAD bolesti (Ambrosius & sur., 2020.). Zbog ovako malog broja pozitivnih nalaza antitijela na MOG u radu nije bilo moguće prikazati i interpretirati rezultate osjetljivosti i specifičnosti testa jer je broj ispitivanih uzoraka bio premalen.

Proizvođač testa navodi u specifikacijama kako je u svrhu ispitivanja specifičnosti i osjetljivosti određivanja antitijela na MOG metodom CBA IIF provedena studija na ukupno 167 uzorka. Dobivena specifičnost iznosila je 84,1%, osjetljivost 95%, a točnost 88%. Visoka osjetljivost EUROIMMUN CBA IIF testa koja je navedena u specifikacijama proizvođača (95%) dovodi do zaključka kako bi se ovim testom dobio minimalan broj lažno negativnih rezultata.

S obzirom da se antitijela na MOG prije ovog istraživanja nisu određivala u KBC Zagreb, nije bilo moguće usporediti dobivene rezultate EUROIMMUN CBA IIF testa s nekom drugom metodom (npr. ELISA).

Prilikom provođenja testiranja i interpretacije rezultata potrebno je pripaziti na određena ograničenja CBA IIF testa. Važno je obratiti pozornost na moguće predanalitičke pogreške koje se mogu dogoditi zbog pogrešnog pipetiranja, a automatizirane korake je potrebno validirati. Ako se prilikom izvođenja testa nosači reagensa osuše nastaju pozadinske mrlje koje mogu smetati u interpretaciji rezultata. Posuđe koje se koristi u svrhu izvođenja testa mora biti čisto

kako strane tvari ne bi uzrokovale interferenciju, a prilikom mikroskopiranja važnu ulogu imaju izvor svjetlosti i optičke podjedinice mikroskopa. Uz semikvantitativnu prirodu ovakvih testova, interpretacija rezultata koji se procjenjuju mikroskopom ovisi i o samom promatraču (Tea & sur., 2020.), stoga je dobro osposobljeno osoblje ključno za izdavanje pouzdanih i točnih nalaza.

Zaključno, dobiveni rezultati ispitivanja dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti CBA IIF testa za dokazivanje antitijela na AQP4 imaju veliku kliničku vrijednost za populaciju bolesnika koja se liječi i kontrolira u KBC Zagreb. Kako je laboratorij u KBC Zagreb trenutno jedina ustanova u Hrvatskoj u kojoj se rutinski određuju antitijela na AQP4 i ovu pretragu radi za pacijente iz cijele zemlje, ovi se rezultati mogu primijeniti na cijelu Hrvatsku. No, u svrhu dobivanja točnijih i pouzdanijih podataka ovo bi se istraživanje trebalo proširiti na veći broj ispitanika te obuhvatiti i zdrave osobe. Na isti način istraživanje treba provesti i za antitijela na MOG.

6. ZAKLJUČAK

Multipla skleroza (MS), poremećaji iz spektra optičkog neuritisa (NMOSD) i bolesti vezane uz antitijelo na MOG (MOGAD) često imaju preklapajuće simptome i sličnu kliničku sliku pa je određivanje specifičnih antitijela od velikog značaja za diferencijalnu dijagnostiku, primjenu odgovarajuće terapije te praćenje odgovora na terapiju.

Postoji više metoda za dokazivanje specifičnih antitijela na AQP4 i MOG, no u najnovije vrijeme metoda izbora je CBA IIF temeljena na stanicama transficiranim humanim AQP4 i MOG.

Rezultati usporedbe CBA IIF i ELISA testa za dokazivanje antitijela na AQP4 dobiveni ovim istraživanjem pokazali su kako je ELISA RSR Aquaporin-4 Ab V2 test osjetljiviji u odnosu na EUROIMMUN CBA IIF test (92% naprema 84%), dok se EUROIMMUN CBA IIF test pokazao specifičnijim (94% u odnosu na 82%). Točnost testa je veća kod EUROIMMUN CBA IIF testa (90,67%) u odnosu na ELISA RSR Aquaporin-4 Ab V2 test (85,33%).

Semikvantitativni CBA IIF test za kombinirano dokazivanje antitijela na AQP4 i MOG tvrtke EUROIMMUN koji je korišten u ovom radu je lako dostupan i jednostavan za izvođenje. Važno je pritom imati dobro educirano osoblje koje mikroskopski analizira uzorke kako bi dobiveni rezultati bili točni i konzistentni.

7. POPIS KRATICA

ADEM – akutni diseminirani encefalomijelitis

ANA – antinuklearna antitijela

CBA – test baziran na stanicama (eng. cell based assay)

CIIFA – indirektna imunofluorescencija bazirana na stanicama (eng. cell based indirect immunofluorescence assay)

CSF – likvor (eng. cerebrospinal fluid)

DIF – direktna imunofluorescencija

DIS – diseminacija u prostoru

DIT – diseminacija u vremenu

DMT – lijekovi koji modificiraju tijek bolesti (eng. disease modifying therapies)

EGFP – zeleni fluorescentni protein (engl. enhanced green fluorescent protein)

ELISA – enzim – imunokemijska metoda (eng. enzyme – linked immunosorbent assay)

FITC – fluorescein izotiocijanat

FN – lažno negativne (false negative)

FP – lažno pozitivne (false positive)

GFAP – glijalni fibrilarni kiseli glikoprotein

IF – imunofluorescencija

IIF – indirektna imunofluorescencija

KMB – krvno – moždana barijera

LETM – longitudinalno ekstenzivan transverzni mijelitis

MAG – glikoprotein vezan za mijelin

MBP – mijelinski bazični protein

MOG – mijelinski oligodendrocitni glikoprotein

MOGAD – bolesti vezane uz antitijelo na MOG

MS – multipla skleroza

MR – magnetska rezonancija

NMOSD – poremećaji iz spektra optičkog neuromijelitisa

NSC – neuronalne progenitorne stanice

OCT – optička koherentna tomografija

ON – optički neuritis

OPC – oligodendrocitne prekursorne stanice

OSP – oligodendrocitni specifični protein

PBS – fosfatni pufer (eng. phosphate buffer saline)

PLP – proteolipidni protein

PŽS – periferni živčani sustav

RRMS – relapsno remitirajuća multipla skleroza

SŽS – središnji živčani sustav

TMB – tetrametilbenzidin

TN – stvarno negativne (true negative)

TP – stvarno pozitivne (true positive)

TRITC – tetrametil rodamin izotiocijanat

VEP – vizualno evocirani potencijali

8. LITERATURA

1. Ambrosius, W., & sur. (24. prosinac 2020.). Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disease: Current Insights into the disease Patophysiology, Diagnosis and Management. *International Journal of Molecular Sciences*, str. 2, 6-12.
2. Baratloo, A., & sur. (ožujak 2015.). *Part 1: Simple Definition and Calculation of Accuracy, Sensitivity and Specificity*. Dohvaćeno iz PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4614595/#:~:text=Sensitivity%3AThe%20sensitivity%20of%20a%20test%20is%20its%20ability,its%20ability%20to%20determine%20the%20healthy%20cases%20correctly.>
3. Bašić - Kes, V., & sur. (2018.). Optički neuromijelitis i diferencijalna dijagnostika optičkog neuromijelitisa. *Acta Medica Croatica*, str. 373-377.
4. Benjak, T., & sur. (2018.). Prevalence of multiple sclerosis in Croatia: data from national and non-governmental organization registries. *Croatian Medical Journal*, str. 65-70.
5. Burgos - Blasco, B., & sur. (siječanj 2022.). Natural history and optic neuritis in multiple sclerosis. *Anales de Pediatría (English Edition)*, str. 66-68.
6. Cabrera - Gomez, J. A., & sur. (siječanj 2009.). An epidemiological study of neuromyelitis optica in Cuba. *Journal of Neurology*, str. 35-44.
7. Cahill, J. F. (2020.). Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. U S. A. Rizvi, & sur., *Clinical Neuroimmunology - Multiple Sclerosis and Related Disorders* (str. 227). Boston: Humana Press.
8. Chan, K. H., & sur. (7. rujanj 2010.). Aquaporin-4 autoantibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders: comparison between tissue-based and cell-based indirect immunofluorescence assays. *Journal of Neuroinflammation*, str. 6-7.
9. Cuffari, B. (18. ožujak 2021.). *An Overview of Immunofluorescence*. Dohvaćeno iz NEWS - Medical and Life Sciences: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Immunofluorescence-An-Overview.aspx>
10. Čepelak, I., & Štraus, B. (2009.). Uvodni dio. U B. Štraus, & sur., *Štrausova medicinska biokemija* (str. 14). Zagreb: Medicinska naklada.
11. Dadgostar, E., & sur. (1. lipanj 2021.). Aquaporin 4 and brain-related disorders: Insights into its apoptosis roles. *Excli Journal*, str. 984-985.
12. Deffner, F., & sur. (24. siječanj 2022.). Aquaporin-4 expression in the human choroid plexus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, str. 10.
13. Denis, M., & sur. (9. ožujak 2022.). Optic Nerve Lesion Length at the Acute Phase of Optic Neuritis Is Predictive of Retinal Neuronal Loss. *Neurology, Neuroimmunology and Neuroinflammation*, str. 2.
14. Dinoto, A., & sur. (22. studeni 2021.). Risk of disease relapse following COVID - 19 vaccination in patients with AQP4 - IgG positive NMOSD and MOGAD. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, str. 2-3.

15. Elkama, A., & Karahalil, B. (ožujak 2018.). Role of gene polymorphisms in vitamin D metabolism and in multiple sclerosis. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, str. 25.
16. Euroimmun. (2018.). *IIFT: NMOSD Screen 1 - Instructions for the indirect immunofluorescence test*. Lubeck: Euroimmun limited.
17. Gospe III, S. M., & sur. (ožujak 2021.). Neuromyelitis optica spectrum disorder and myelin oligodendrocyte glycoprotein associated disorder-optic neuritis: a comprehensive review of diagnosis and treatment. *Eye - The Scientific Journal of The Royal College of Ophtalmologist*, str. 758-761.
18. Granieri, L., & sur. (12. lipanj 2012.). Evaluation of a Multiparametric Immunofluorescence Assay for Standardization of Neuromyelitis Optica Serology. *PLoS ONE*, str. 3-7.
19. Gruchot, J., & sur. (3. Kolovoz 2019.). The Mulecular Basis for Remyelination Failure in Multiple Sclerosis. *Cells*, str. 1.
20. Habek, M. (2020.). Liječenje multiple skleroze za vrijeme COVID - 19 pandemije. *Medicus, Vol. 29 No. 2*, str. 225-232.
21. He, S., & sur. (10. siječanj 2022.). Comparative Study of Brain fMRI of Olfactory Stimulation in Neuromyelitis Optica Spectrum Disease and Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*, str. 2.
22. Hegen, H., & Markus, R. (31. srpanj 2020.). Recent developments in MOG-IgG associated neurological disorders. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, str. 1.
23. Höftberger, R., & sur. (4. studeni 2013.). An Optimized Immunohistochemistry Technique Improves NMO-IgG Detection: Study Comparison with Cell-Based Assays. *PLoS ONE*, str. 4-5.
24. Jakimovski, D., & sur. (23. prosinac 2022.). Multiple Sclerosis in Children: Differential Diagnosis, Prognosis and Disease-Modifying Treatment. *CNS Drugs*, str. 45.
25. Jarius, S., & sur. (8. rujan 2010.). Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *Journal of Neuroinflammation*, str. 3-5.
26. Johns, T., & Bernard, C. C. (18. siječanj 2002.). The Structure and Function of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein. *Journal of Neurochemistry*, str. 2.
27. Johnson, J. H., & Khalili, Y. A. (10. svibanj 2021.). *Histology, Myelin*. Dohvaćeno iz NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541009/>
28. Jorgačevski, J., & sur. (7. prosinac 2020.). Insights into Cell Surface Expression, Supramolecular Organization, and Functions of Aquaporin 4 Isoforms in Astrocytes. *Cells*, str. 1.
29. Judaš, M., & Kostović, I. (1997.). Temelji neuroznanosti. U M. Judaš, & I. Kostović, *Temelji neuroznanosti* (str. 5-7,10-11). Zagreb: MD.
30. Kang, E. s., & sur. (13. kolovoz 2012.). Clinical Usefulness of Cell-based Indirect Immunofluorescence Assay for the Detection of Aquaporin-4 Antibodies in Nuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Annals of Laboratory Medicine*, str. 332 - 335.

31. Kim, M., & sur. (11. siječanj 2022.). Free-water diffusion tensor imaging detects occult periependymal abnormality in the AQP4-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorder. *Scientific Reports*, str. 2.
32. Kim, Y. -J., & sur. (26. svibanj 2012.). Detection of Anti-Aquaporin-4 Antibodies in Neuromyelitis Optica: Comparison of Tissue-Based and Cell-Based Indirect Immunofluorescence Assays and ELISA. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, str. 188.
33. Knapp, R. K., & sur. (11. listopad 2021.). Evaluating the Economic Burden of Relapses in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder: A Real World Analysis Using German Claims Data. *Neurology and Therapy*, str. 249.
34. Kunchok, A., & sur. (28. listopad 2019.). Coexistence of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein and Aquaporin-4 Antibodies in Adult and Pediatric Patients. *JAMA Neurology*, str. 257.
35. Mason, P. (2017.). Neurons are characterised by collectively unique traits. U P. Mason, *MEDICAL NEUROBIOLOGY* (str. 43). New York: Oxford University Press.
36. Messias, K., & sur. (14. veljača 2022.). Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated optic neuritis: an update. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, str. 2-3, 6.
37. Neumann, B., & sur. (22. Rujan 2019.). Remyelination and ageing: Reversing the ravages of time. *Multiple Sclerosis Journal*, str. 1835-1836.
38. Pan, Q.-L., & sur. (prosinac 2021.). The role of aquaporin 4 (AQP4) in spinal cord injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, str. 1-2.
39. Paul, F., & sur. (17. travanj 2007.). Antibody to Aquaporin 4 in the Diagnosis of Neuromyelitis Optica. *PLoS Medicine*, str. 673.
40. Pittock, & Sean. (2021.). *Update 2021: AQP4-IgG FACS assay*. Dohvaćeno iz Mayo Clinic Laboratories: <https://news.mayocliniclabs.com/2021/07/05/update-2021-aqp4-igg-facs-assay/>
41. Pittock, S. J., & sur. (28. listopad 2019.). Seroprevalence of Aquaporin-4-IgG in a Northern California Population Representative Cohort of Multiple Sclerosis. *JAMA Neurology*, str. 1434.
42. Racke, M. K., & sur. (13. siječanj 2022.). Pain in Multiple Sclerosis: Understanding Pathophysiology, Diagnosis, and Management Through Clinical Vignettes. *Frontiers in Neurology*, str. 2-3.
43. Rasband, M. N., & Macklin, W. B. (2012.). Myelin Structure and Biochemistry. U S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Albers, & D. R. Price, *Basic Neurochemistry* (str. 181). Waltham: Elsevier Inc.
44. Reed, M. M., & sur. (9. veljača 2022.). Channels and Transporters in Astrocyte Volume Regulation in Health and Disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, str. 13, 16.
45. Reindl, M., & sur. (ožujak 2020.). International multicenter examination of MOG antibody assays. *Neurology, Neuroimmunology and Neuroinflammation*, str. 1 - 2, 9.
46. Ringelstein, M., & sur. (16. studeni 2021.). Interleukin - 6 Receptor Blockade in Treatment - Refractory MOG - IgG - Associated Disease and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Neurology, Neuroimmunology and Neuroinflammation*, str. 10.

47. Rosenthal, J. F., & sur. (2020.). Clinical Features, Symptom Management, and Diagnosis. U S. A. Rizvi, & i. sur., *Clinical Neuroimmunology - Multiple Sclerosis and Related Disorders* (str. 98). Boston: Humana Press.
48. RSR, L. (2021.). *ElisaRSR AQP4 Ab Version 2 Aquaporin-4 (AQP4) Autoantibody (ELISA Version 2 Kit - Instructions for use)*. Cardiff: RSR Limited.
49. Sepulveda, M., & sur. (1. siječanj 2022.). *Epidemiology of neuromyelitis optica spectrum. New and old challenges*. Dohvaćeno iz Revista de Neurologia: https://neurologia.com/articulo/2021163/eng#info_epidemiological-studies-based-on-2015-criteria
50. Sertić, J. (2009.). Multipla skleroza. U J. Sertić, & sur., *Katalog dijagnostičkih laboratorijskih pretraga s primjerima iz kliničke prakse* (str. 709). Zagreb: Medicinska naklada.
51. Shu, H., & sur. (3. siječanj 2022.). Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody Associated Cerebral Cortical Encephalitis: Case Reports and Review of Literature. *Frontiers in Human Neuroscience*, str. 2.
52. Shumway, C. L., & sur. (11. veljača 2021.). *Neuromyelitis Optica (NMO, Devic's Disease)*. Dohvaćeno iz StatPearls: <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/130642>
53. Solomon, A. J., & sur. (1. siječanj 2019.). Misdiagnosis of multiple sclerosis. *Neurology*, str. 26-30.
54. Stadelmann, C., & sur. (8. svibanj 2019.). Myelin in the central nervous system: structure, function, and pathology. *Physiological reviews*, str. 1396, 1398, 1402.
55. Staugaitis, S. M., & Trapp, B. D. (2012.). Diseases Involving Myelin. U S. T. Brady, & i. sur., *Basic Neurochemistry* (str. 692). Waltham: Elsevier Inc.
56. Šendula - Jengiđ, V., & Gušćić, I. (2012.). Multipla skleroza - od psihotraume do oporavka. *Medicinski vjesnik*, str. 103-110.
57. Tafti, D., & sur. (4. rujanj 2022.). *StatPearls*. Dohvaćeno iz Multiple Sclerosis: <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/25363>
58. Tajfirouz, D., & sur. (12. svibanj 2021.). Optic Chiasm Involvement in AQP-4 Antibody Positive NMO and MOG Antibody Associated Disorder. *Multiple Sclerosis Journal*, str. 2.
59. Tea, F., & sur. (6. veljača 2020.). Effects of the Positive Threshold and Data Analysis on Human MOG Antibody Detection by Live Flow Cytometry. *Frontiers in Immunology*, str. 6.
60. Vukasović, I., & Mikula, I. (2018.). Neurološke bolesti. U E. Topić, & i. sur., *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi* (str. 251). Zagreb: Medicinska naklada.
61. Wang, C., & sur. (2018.). Lipidomics Profiling of Myelin. U A. Woodhoo, *Myelin - Methods and Protocols* (str. 38). New York: Humana Press.
62. Waters, P. J., & sur. (22. travanj 2014.). Evaluation of aquaporin-4 antibody assays. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, str. 5-6.
63. Waters, P. J., & sur. (6. veljača 2019.). A multicenter comparison of MOG-IgG cell-based assays. *Neurology*, str. 1-3.

64. Wingerchuk, D. M., & sur. (14. srpanj 2015.). International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*, str. 179.
65. Yong, K. P., & sur. (15. prosinac 2021.). Demystifying MOGAD and Double Seronegative NMOSD Further With IL - 6 Blockade. *Neurology, Neuroimmunology and Neuroinflammation*, str. 1.
66. Zalc, B., & Rosier, F. (2018.). A highly sophisticated substance. U B. Zalc, & F. Rosier, *MYELIN - The Brain's Supercharger* (str. 68 - 69, 77). New York: Oxford University Press.

9. SAŽETAK

U autoimune, kronične demijelinizirajuće bolesti SŽS-a opisane u ovom radu spadaju multipla skleroza (MS), poremećaji iz spektra optičkog neuromijelitisa (NMOSD) te bolesti vezane uz antitijela na MOG (MOGAD). Diferencijalnu dijagnostiku ovih bolesti olakšalo je otkriće visokospecifičnih antitijela pronađenih u NMOSD pacijenata, anti-AQP4 antitijela te visokospecifičnih antitijela pronađenih u MOGAD pacijenata, anti-MOG antitijela. Rano postavljanje dijagnoze je ključno za pravilan odabir terapije, a određivanjem antitijela na AQP4 i MOG može se znatno ubrzati i olakšati postavljanje dijagnoze. Laboratorijski testovi koji se koriste za dokazivanje antitijela moraju zadovoljiti visoke kriterije osjetljivosti, specifičnosti i točnosti da bi se mogli primjenjivati u rutinskom radu. Od mnogih metoda koje su opisane za određivanje navedenih antitijela ističe se metoda indirektna imunofluorescencije temeljene na stanicama (CBA IIF) transficiranim antigenima AQP4 i MOG.

U radu su uspoređene dvije metode za dokazivanje antitijela na AQP4, ranije korištena ELISA metoda i nova metoda CBA IIF te je ispitana njihova dijagnostička osjetljivost, specifičnost i točnost u stvarnim laboratorijskim uvjetima. CBA IIF test za kombinirano određivanje antitijela na AQP4 i MOG proizvođača EUROIMMUN pokazao se kao visoko osjetljiv i visoko specifičan te jednostavan za izvođenje uz minimalno utrošeno vrijeme i resurse. Rezultati ovog rada su potvrdili veću osjetljivost ELISA testa za određivanje antitijela na AQP4 u odnosu na CBA IIF test (92% naprema 84%) dok je CBA IIF test specifičniji (94% u odnosu na 82%). Točnost testa je veća kod CBA IIF testa (90,67%) u odnosu na ELISA test (85,33%). Zbog samo jednog pozitivnog nalaza antitijela na MOG nije bilo moguće prikazati i interpretirati rezultate osjetljivosti i specifičnosti testa jer je broj ispitanih uzoraka bio premalen. Istraživanje bi trebalo proširiti na veći broj ispitanika te obuhvatiti i zdrave osobe kako bi se dobili potpuno vjerodostojni podaci za našu populaciju.

SUMMARY

The autoimmune, chronic demyelinating diseases of the CNS described in this thesis include multiple sclerosis (MS), neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD), and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease (MOGAD). Differential diagnosis of these diseases was facilitated by the discovery of highly specific antibodies found in NMOSD patients, anti-AQP4 antibodies, and highly specific antibodies found in MOGAD patients, anti-MOG antibodies. Early diagnosis is key for the selection of the right therapy and determination of antibodies to AQP4 and MOG can bring to a significantly faster and much easier diagnosis. Laboratory tests used to determine antibodies must meet high criteria of sensitivity, specificity, and accuracy to be used in the routine. Of the many methods described for determining these antibodies, the cell-based indirect immunofluorescence (CBA IIF) with cells transfected with AQP4 and MOG stands out.

In this thesis two methods for the determination of anti-AQP4 antibodies, the previously used ELISA method and the new CBA IIF method are compared, and their diagnostic sensitivity, specificity, and accuracy in real laboratory conditions are also examined. The CBA IIF test for the combined determination of antibodies to AQP4 and MOG made by EUROIMMUN has proved to be highly sensitive, highly specific, and easy to perform with minimal time and resources spent. The results of this research confirmed a higher sensitivity of the ELISA test for determining antibodies to AQP4 compared to the CBA IIF test (92% to 84%) while the CBA IIF test is more specific (94% vs. 82%). The CBA IIF test has higher accuracy (90.67%) than the ELISA test (85.33%). Due to only one positive result of anti-MOG antibodies, it was not possible to present and interpret the results of the sensitivity and specificity of the test because of the too small number of examined samples. The research should be extended to a larger number of respondents and include healthy controls to obtain fully credible data for our population.

10. Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb
Kišpatičeva 12, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ODREĐIVANJE ANTI-AQP4 I ANTI-MOG ANTITIJELA U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI DEMIJELINIZIRAJUĆIH BOLESTI

Helena Kanižić

SAŽETAK

U autoimune, kronične demijelinizirajuće bolesti SŽS-a opisane u ovom radu spadaju multipla skleroza (MS), poremećaji iz spektra optičkog neuromijelitisa (NMOSD) te bolesti vezane uz antitijela na MOG (MOGAD). Diferencijalnu dijagnostiku ovih bolesti olakšalo je otkriće visokospecifičnih antitijela pronađenih u NMOSD pacijenata, anti-AQP4 antitijela te visokospecifičnih antitijela pronađenih u MOGAD pacijenata, anti-MOG antitijela. Rano postavljanje dijagnoze je ključno za pravilan odabir terapije, a određivanjem antitijela na AQP4 i MOG može se znatno ubrzati i olakšati postavljanje dijagnoze. Laboratorijski testovi koji se koriste za dokazivanje antitijela moraju zadovoljiti visoke kriterije osjetljivosti, specifičnosti i točnosti da bi se mogli primjenjivati u rutinskom radu. Od mnogih metoda koje su opisane za određivanje navedenih antitijela ističe se metoda indirektno imunofluorescencije temeljene na stanicama (CBA IIF) transficiranim antigenima AQP4 i MOG. U radu su uspoređene dvije metode za dokazivanje antitijela na AQP4, ranije korištena ELISA metoda i nova metoda CBA IIF te je ispitana njihova dijagnostička osjetljivost, specifičnost i točnost u stvarnim laboratorijskim uvjetima. CBA IIF test za kombinirano određivanje antitijela na AQP4 i MOG proizvođača EUROIMMUN pokazao se kao visoko osjetljiv i visoko specifičan te jednostavan za izvođenje uz minimalno utrošeno vrijeme i resurse. Rezultati ovog rada su potvrdili veću osjetljivost ELISA testa za određivanje antitijela na AQP4 u odnosu na CBA IIF test (92% naprema 84%) dok je CBA IIF test specifičniji (94% u odnosu na 82%). Točnost testa je veća kod CBA IIF testa (90,67%) u odnosu na ELISA test (85,33%). Zbog samo jednog pozitivnog nalaza antitijela na MOG nije bilo moguće prikazati i interpretirati rezultate osjetljivosti i specifičnosti testa jer je broj ispitanih uzoraka bio premalen. Istraživanje bi trebalo proširiti na veći broj ispitanika te obuhvatiti i zdrave osobe kako bi se dobili potpuno vjerodostojni podaci za našu populaciju.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 10 grafičkih prikaza, 5 tablica i 66 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: MOG, AQP-4, MS, NMOSD, MOGAD, EUROIMMUN, indirektna imunofluorescencija

Mentor: **Dr. sc. Željka Vogrinc**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vogrinc**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dunja Rogić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ksenija Fumić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study of Medical Biochemistry
Department of Laboratory Diagnostics University Hospital
Centre Zagreb
Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DETERMINATION OF ANTI-AQP4 AND ANTI-MOG ANTIBODIES IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF DEMYELINATING DISEASES

Helena Kanižić

SUMMARY

The autoimmune, chronic demyelinating diseases of the CNS described in this thesis include multiple sclerosis (MS), neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD), and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease (MOGAD). Differential diagnosis of these diseases was facilitated by the discovery of highly specific antibodies found in NMOSD patients, anti-AQP4 antibodies, and highly specific antibodies found in MOGAD patients, anti-MOG antibodies. Early diagnosis is key for the selection of the right therapy and determination of antibodies to AQP4 and MOG can bring to a significantly faster and much easier diagnosis.. Laboratory tests used to determine antibodies must meet high criteria of sensitivity, specificity, and accuracy to be used in the routine. Of the many methods described for determining these antibodies, the cell-based indirect immunofluorescence (CBA IIF) with cells transfected with AQP4 and MOG stands out. In this thesis two methods for the determination of anti-AQP4 antibodies, the previously used ELISA method and the new CBA IIF method are compared, and their diagnostic sensitivity, specificity, and accuracy in real laboratory conditions are also examined. The CBA IIF test for the combined determination of antibodies to AQP4 and MOG made by EUROIMMUN has proved to be highly sensitive, highly specific, and easy to perform with minimal time and resources spent. The results of this research confirmed a higher sensitivity of the ELISA test for determining antibodies to AQP4 compared to the CBA IIF test (92% to 84%) while the CBA IIF test is more specific (94% vs. 82%). The CBA IIF test has higher accuracy (90.67%) than the ELISA test (85.33%). Due to only one positive result of anti-MOG antibodies, it was not possible to present and interpret the results of the sensitivity and specificity of the test because of the too small number of examined samples. The research should be extended to a larger number of respondents and include healthy controls to obtain fully credible data for our population.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Thesis

includes: 50 pages, 10 figures, 5 tables and 66 references. Original is in Croatian language.

Keywords: MOG, AQP-4, MS, NMOSD, MOGAD, EUROIMMUN, indirect immunofluorescence

Mentor: **Željka Vogrinc, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vogrinc, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dunja Rogić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ksenija Fumić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.