Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych
Instytut Nauk Medycznych

lek. Julia Rudnicka-Czerwiec

Analiza populacji komórek NK u nieleczonych pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do zdrowej kontroli

Rozprawa na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Halina Bartosik-Psujek

Promotor pomocniczy: Dr n. biol. Edyta Kopera

Zakład Neurologii, Instytut Nauk Medycznych,
Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego

RZESZÓW 2024

Składam serdeczne podziękowania

Pani prof. dr hab. n. med. Halinie Bartosik-Psujek – za wskazanie mi kierunku drogi zawodowej, inspiracje do ciągłego rozwoju oraz nieocenioną pomoc i zaangażowanie na każdym etapie tworzenia niniejszej pracy;

Pani dr n. biol. Edycie Koperze – za wiele godzin wspólnej pracy w laboratorium oraz wprowadzenie mnie do fascynującego świata komórek;

Panu prof. dr. hab. n. med. Jackowi Tabarkiewiczowi – za umożliwienie mi prowadzenia badań oraz wielkie wsparcie merytoryczne;

Mojemu Mężowi – za to, że nigdy nie pozwolił mi się poddać;

Moim Rodzicom – za wsparcie i nieskończoną wiarę we mnie;

Przyjaciołom – za pomoc i obecność zawsze, gdy tego potrzebowałam;

Mojej Córeczce Gai – która była i jest moją największą motywacją.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI 3
Wykaz skrótów 7
1. Wstęp 10
1.1. Stwardnienie rozsiane 10
1.1.1. Stwardnienie rozsiane – epidemiologia 10
1.1.2. Stwardnienie rozsiane – czynniki ryzyka i patogeneza 11
1.1.3. Stwardnienie rozsiane – postacie choroby 15
1.1.4. Stwardnienie rozsiane – rozpoznanie 17
1.2. Odporność wrodzona 20
1.2.1. Odporność wrodzona – informacje ogólne 20
1.2.2. Rola komórek efektorowych odporności wrodzonej w patogenezie stwardnienia rozsianego 22
1.2.2.1. Naturalne komórki limfoidalne 23
1.2.2.1.1. Naturalne komórki limfoidalne typu 1 – ILCs1 24
1.2.2.1.2. Naturalne komórki limfoidalne typu 2 – ILCs2 25
1.2.2.1.3. Naturalne komórki limfoidalne typu 3 – ILCs3 26
1.2.2.1.4. Komórki T indukujące tkankę limfoidalną – LTi 26
1.2.2.1.5. Komórki NK 27
1.2.2.1.6. Markery powierzchniowe i wewnątrzkomórkowe komórek NK . 32
1.3. Aktualna wiedza na temat roli komórek NK w ośrodkowym układzie nerwowym i w patogenezie MS 34
1.3.1. Komórki NK w ośrodkowym układzie nerwowym 34
1.3.2. Komórki NK w patogenezie MS 36
2. Cel pracy i pytania badawcze 39
2.1. Cel pracy 39
2.2. Pytania badawcze 39
3. Pacjenci, materiał i metody 40

3.1. Dobór pacjentów do grupy badanej 40
3.2. Dobór osób zdrowych do grupy kontrolnej 40
3.3. Materiał do badań 41
3.4. Analiza materiału 41
3.4.1. Izolacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 41
3.4.2. Zakładanie hodowli komórkowych 43
3.4.3. Oznaczanie markerów powierzchniowych komórek 44
3.4.4. Oznaczanie markerów wewnątrzkomórkowych 46
3.4.5. Analiza cytometryczna 46
3.5. Analiza statystyczna 49
3.6. Zgoda Komisji Bioetycznej 49
4. Wyniki 50
4.1. Charakterystyka grupy badanej 50
4.2. Charakterystyka grupy kontrolnej 51
4.3. Analiza różnic w immunofenotypie komórek NK 52
4.3.1. Porównanie odsetka komórek NK oraz głównych subpopulacji: $CD56^{bright}$ i $CD56^{dim}$ 52
4.3.2. Porównanie subpopulacji komórek NK charakteryzowanych na podstawie obecności lub braku markerów powierzchniowych CD335, CD27, CD274, CD73 53
4.4. Analiza różnic w zakresie wewnątrzkomórkowej zawartości enzymów cytolitycznych i cytokin w obrębie poszczególnych subpopulacji komórek NK 57
4.4.1. Analiza wewnątrzkomórkowej zawartości enzymów cytolitycznych 58
4.4.1.1. Granzym B 58
4.4.1.2. Granzym K 61
4.4.1.3. Perforyna 66
4.4.2. Analiza wewnątrzkomórkowej zawartości cytokin 69
4.4.2.1. TGF-β 69

4.4.2.2. IFN-γ ... 76
4.4.2.3. IL-10 ... 82
4.4.2.4. IL-4 ... 89
4.4.2.5. IL-13 ... 96
5. Dyskusja ... 100
5.1. Fenotyp komórek NK ... 100
5.1.1. Odsetek komórek NK ... 100
5.1.2. Subpopulacje komórek NK CD56^{bright} i NK CD56^{dim} ... 101
5.1.3. Subpopulacje komórek NK CD335+ i CD335- ... 102
5.1.4. Subpopulacje komórek NK CD27+ i NK CD27- ... 104
5.1.5. Subpopulacje komórek NK CD274+ i NK CD274- ... 105
5.1.6. Subpopulacje komórek NK CD73+ i NK CD73- ... 107
5.2. Funkcje komórek NK ... 108
5.2.1. Wewnątrzkomórkowa zawartość granzymu B ... 109
5.2.2. Wewnątrzkomórkowa zawartość granzymu K ... 110
5.2.3. Wewnątrzkomórkowa zawartość perforyny ... 111
5.2.4. Wewnątrzkomórkowa zawartość TGF-β ... 112
5.2.5. Wewnątrzkomórkowa zawartość IFN-γ ... 114
5.2.6. Wewnątrzkomórkowa zawartość IL-10 ... 116
5.2.7. Wewnątrzkomórkowa zawartość IL-4 ... 118
5.2.8. Wewnątrzkomórkowa zawartość IL-13 ... 120
6. Podsumowanie wyników i wnioski ... 122
6.1. Podsumowanie wyników ... 122
6.2. Wnioski ... 127
7. Streszczenie w języku polskim ... 128
8. Streszczenie w języku angielskim ... 134
9. Piśmiennictwo ... 140
10. Spis tabel ... 166

11. Spis rycin 169

12. Uchwała Komisji Bioetycznej 173

Wykaz skrótów

ADCC	cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał	(ang. antibody dependent cellular cytotoxicity)
ADP	adenozynodifosforan	(ang. adenosine diphosphate)
AHR	arylowy receptor węglowodorowy	(ang. aryl hydrocarbon receptor)
Areg	amfiregulina	(ang. amphiregulin)
ATP	adenozynotrifosforan	(ang. adenosine triphosphate)
Bcl11B	-	(ang. B cel lymphoma/leukemia 11B)
CIS	klinicznie izolowany zespół	(ang. clinically isolated syndrome)
CLRs	receptory lektynopodobne typu C	(ang. C-type lectin receptors)
cNK	konwencjonalne komórki NK	(ang. conventional NK cells)
CNS	ośrodkowy układ nerwowy	(ang. central nervous system)
CSF	płyn mózgowo-rdzeniowy	(ang. cerebrospinal fluid)
DIS	rozsianie w przestrzeni	(ang. dissemination in space)
DIT	rozsianie w czasie	(ang. dissemination in time)
EAE	eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia	(ang. experimental autoimmune encephalomyelitis)
EBV	wirus Epsteina-Barr	(ang. Epstein – Barr Virus)
EDTA	kwas wersenowy	(ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
EOMES	eomezodermina	(ang. eomesodermin)
FSC	przedni detektor światła rozproszonego	(ang. forward scatter channel)
GATA3	wiążące GATA białko 3	(ang. GATA binding protein 3)
GFI1	niezależny czynnik wzrostu 1	(ang. Growth factor independence-1)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów	(ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HLA	ludzki antygen leukocytarny	(ang. human leukocyte antygen)
HSV-1	wirus opryszczki typu 1	(ang. herpes simplex virus type 1)
ID2	inhibitor wiązania DNA 2	(ang. inhibitor of DNA binding 2)
IFN-α	interferon alfa	(ang. interferon alfa)
IFN-γ	interferon gamma	(ang. interferon gamma)
IL	interleukina	(ang. interleukin)
ILCs	naturalne komórki limfoidalne	(ang. innate lymphoid cells)

ITIM	immunoreceptorowy motyw hamujący oparty o tyrozynę	(ang. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)
KIR	immunoglobulinopodobne receptory komórek NK	(ang. killer-cell immunoglobulin-like receptors)
KLR	lektynopodobne receptory komórek NK	(ang. killer lectin-like receptors)
komórki NK	naturalni zabójcy	(ang. natural killer cells)
LILR	immunoglobulinopodobne receptory leukocytów	(ang. leukocyte immunoglobulin-like receptors)
LTi	komórki T indukujące tkankę limfoidalną	(ang. lymphoid tissue inducer cells)
MFI	mediana intensywności fluorescencji	(ang. median fluorescence intensity)
MHC	główny układ zgodności tkankowej	(ang. major histocompatibility complex)
MRI	badanie metodą rezonansu magnetycznego	(ang. magnetic resonance imaging)
MS	stwardnienie rozsiane	(ang. multiple sclerosis)
NCR1	receptor naturalnej cytotoksycznosci 1	(ang. natural cytotoxicity receptor 1)
NFIL3	czynnik jądrowy indukowany przez interleukinę 3	(ang. nuclear factor IL3 induced)
NLRs	receptory Nod-podobne	(ang. nod-like receptors)
NSC	neuronalne komórki macierzyste	(ang. neuronal stem cells)
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem	(ang. phosphate-buffered saline)
PD-L1	ligand dla receptora programowanej śmierci 1	(ang. programmed death ligand 1)
PMA	octan mirystynianu forbolu	(ang. phorbol-12-myristate-13-acetate)
PPMS	pierwotnie postępująca postać stwardnienia rozsianego	(ang. primary progressive multiple sclerosis)
RLRs	receptory RIG-I-podobne	(ang. RIG-I-like receptors)
RORα	receptor sierocy α związany z RAR	(ang. RAR-related orphan receptor α)
RORγt	receptor sierocy γt związany z RAR	(ang. RAR-related orphan receptor γt)
RRMS	rzutowo-remisyjna postać SM	(ang. relapsing-remmiting multiple sclerosis)

RUNX3	związany z RUNT czynnik transkrypcyjny 3	(ang. runt-related transcription factor 3)
sCD27	rozpuszczalny marker CD27	(ang. soluble CD27)
SGZ	strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa	(ang. subgranular zone)
SNP	polimorfizm pojedynczych nukleotydów	(ang. single nucleotide polymorphism)
SPMS	wtórnie postępująca postać stwardnienia rozsianego	(ang. secondary progressive multiple sclerosis)
SSC	boczny detektor światła rozproszonego	(ang. side scatter channel)
SVZ	strefa podkomorowa komór bocznych	(ang. subventricular zone)
T-BET	czynnik transkrypcyjny T-box z ekspresją na limfocytach T	(ang. T-box expressed in T cells)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu beta	(ang. transforming growth factor beta)
Th	(limfocyty) T pomocnicze	(ang. T helper)
TLRs	receptory Toll-podobne	(ang. toll-like receptors)
TNF	czynnik martwicy nowotworów	(ang. tumor necrosis factor)
TOX	-	(ang. thymocyte selection associated high mobility group box protein)
trNK	tkankowe komórki NK	(ang. tissue-resident NK)

1. Wstęp

1.1. Stwardnienie rozsiane

Stwardnienie rozsiane (ang. multiple sclerosis, MS) jest najczęstszą zapalno-demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (ang. central nervous system, CNS). Dotyka ludzi na wczesnym etapie dorosłości i jest istotną przyczyną niesprawności w tej grupie wiekowej, co niesie za sobą poważne społeczne i ekonomiczne konsekwencje [1].

1.1.1. Stwardnienie rozsiane – epidemiologia

Dostępne dane epidemiologiczne dotyczące zachorowalności, rozpowszechnienia i śmiertelności w stwardnieniu rozsianym obrazują rosnącą w ostatnich latach skalę problemu. MS jest najczęstszą chorobą demielinizacyjną w krajach wysoko rozwiniętych – szacuje się, że na całym świecie choruje na nią około 2,9 mln ludzi. W roku 2023 największe rozpowszechnienie MS (>200/100 000 osób) odnotowano w Kanadzie, Stanach Zjednoczonych, Islandii, Norwegii, Szwecji, Finlandii, Danii, Niemczech i we Włoszech [2].

Polska należy do krajów o wysokim wskaźniku chorobowości stwardnienia rozsianego. Według najnowszych rządowych statystyk obejmujących dane z końca 2021 roku, w Polsce na MS chorowało wtedy 54 887 osób, tj. 14,4 na 10 tys. mieszkańców. Najwyższą chorobowość obserwuje się w województwach podkarpackim i lubelskim (16,6 i 16,1 chorych na 10 tys.), najniższą – w zachodniopomorskim i lubuskim (11,1 i 11,7 chorych na 10 tys.) [3]. Zapadalność na stwardnienie rozsiane jest zróżnicowana płciowo – choroba dotyka w większości kobiet. Na przestrzeni ostatnich 30 lat współczynnik zapadalności wśród płci zmienił się z 2:1 na 3:1 z przewagą kobiet [4].

Początkowe objawy MS występują zazwyczaj u młodych dorosłych pomiędzy 20 a 40 rokiem życia. W postaci rzutowo-remisyjnej szczyt zachorowalności przypada na okres między 20 a 35 rokiem życia, natomiast w postaci pierwotnie postępującej – około 40. roku życia [5].

1.1.2. Stwardnienie rozsiane – czynniki ryzyka i patogeneza

Bezpośrednia przyczyna stwardnienia rozsianego jest nieznana. Określono natomiast niemodyfikowalne i modyfikowalne czynniki ryzyka rozwoju choroby. Do czynników niemodyfikowalnych zalicza się płeć żeńską, wiek pomiędzy 20 a 35 rokiem życia [4, 5] oraz czynniki genetyczne i infekcje wirusowe – szczególnie wirusem Epsteina-Barr (ang. Epstein – Barr Virus, EBV).

Czynniki genetyczne

Badania epidemiologiczne, genetyczne i etniczne wyraźnie wskazują na występowanie podatności genetycznej na stwardnienie rozsiane, z dużym zróżnicowaniem etnicznym. Najwyższym ryzykiem zachorowania obarczone są populacje wywodzące się z północnej i centralnej Europy oraz Ameryki Północnej. Najrzadziej MS występuje w populacjach pochodzenia rdzennie azjatyckiego, a także u osób wywodzących się z Afryki i Nowej Zelandii [6].

Ostateczny dowód na genetyczne tło podatności na MS przedstawiono na podstawie badań nad bliźniakami. Stwierdzono, że u bliźniąt jednojajowych – czyli o jednakowej sekwencji genomu – MS współistnieje w 20-30%. Natomiast w przypadku bliźniąt dwujajowych, różniących się od siebie jak każde rodzeństwo, współwystępowanie MS stwierdzono jedynie w 2-5% [7].

Wieloletnie badania mające na celu zidentyfikowanie genów podatności na MS wykazały, że dziedziczenie ma charakter wybitnie poligenowy. Głównym genem podatności jest gen HLA-DRB1, zlokalizowany na chromosomie 6p21.32, kodujący łańcuch beta cząsteczki ludzkiego antygenu leukocytarnego klasy II (ang. human leukocyte antygen, HLA). Cząsteczki HLA klasy II są odpowiedzialne za prezentację antygenów limfocytom T typu pomocniczego (ang. T helper, Th) - T CD4+ [8]. Struktura HLA klasy II ma wpływ na rodzaj i stopień aktywacji limfocytów T CD4+, które pełnią główną rolę w rozwoju reakcji autoagresji. Najsilniejsze powiązanie z MS uzyskano dla allelu DRB1*1501 HLA klasy II. Jest on obserwowany najczęściej w populacjach Europy Północnej i Zachodniej, a prawie w ogóle nie występuje w populacjach wywodzących się z Turcji czy rdzennie azjatyckich [9].

Do pozostałych zidentyfikowanych wariantów chromosomów, które mogą odpowiadać za podatność na MS należą:

- warianty w obrębie chromosomu 10p15.1 – gen kodujący łańcuch alfa receptora dla interleukiny 2 (ang. interleukin 2, IL-2) [10],

- warianty w obrębie chromosomu 5p13.2 – gen kodujący receptor dla IL-7 [11],

- warianty w obrębie chromosomu 12p13.31 – gen kodujący receptor typu I dla czynnika martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor, TNF) [12],

- warianty w rejonach genów dla CD58, TYK2 i STAT3 [7].

Z powyżej przestawionych genów podatności na MS wynika, że są to głównie geny odpowiedzialne za funkcje limfocytów T i B [13].

Infekcja EBV

Badania epidemiologiczne wykazały, że u niemalże 100% pacjentów z MS stwierdza się serologiczne markery przebycia infekcji EBV. Przetrwała, nabyta w okresie młodocianym infekcja prowadzi do zmiany funkcji limfocytów B. Antygeny powstałe w wyniku obecności EBV nadmiernie stymulują układ immunologiczny u osób genetycznie predysponowanych, co prowadzi do autoreaktywności skierowanej przeciwko białkom osłonki mielinowej [14].

Do najbardziej istotnych modyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju MS zalicza się palenie papierosów, niski poziom witaminy D3 oraz otyłość w okresie dojrzewania.

Palenie papierosów

Zarówno bierna, jak i czynna ekspozycja na dym papierosowy zwiększa ryzyko wystąpienia MS ok. 1,6-krotnie i wiąże się z cięższym przebiegiem choroby. Szacuje się, że wpływ ten jest większy u mężczyzn niż u kobiet [15].

Niski poziom witaminy D3

Liczne badania dowodzą, że istnieje związek pomiędzy niskim poziomem witaminy D3 w surowicy a ryzykiem zachorowania na MS i cięższym przebiegiem choroby. Zależność

ta może tłumaczyć zwiększone ryzyko wystąpienia MS w populacjach zamieszkujących szerokości geograficzne oddalone od równika, o mniejszej ekspozycji na promienie słoneczne [16].

Otyłość w okresie dojrzewania

Udowodniono, że otyłość w okresie dojrzewania zwiększa ryzyko wystąpienia MS, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet, około dwukrotnie. Nie stwierdzono tego typu zależności dla otyłości występującej w dzieciństwie [17].

Inne modyfikowalne czynniki środowiskowe, które mogą wpływać na ryzyko rozwoju MS, to praca nocna oraz nadmierne spożywanie alkoholu i kawy [18].

Patogeneza MS

Stwardnienie rozsiane jest chorobą autoimmunologiczną. Podstawowy model jego patogenezy zakłada, że nieznany czynnik (infekcja wirusowa? zasadowe białko mieliny?) aktywuje układ immunologiczny i powoduje pojawienie się zaktywowanych limfocytów T. Autoreaktywne limfocyty T i B przechodzą przez barierę krew-mózg. W procesie tym biorą udział molekuły adhezyjne, chemokiny oraz metaloproteinazy [19]. Aktywacja dotyczy również rezydujących w mózgu limfocytów T i B oraz komórek mikrogleju i astrocytów. Jej następstwem jest zniszczenie osłonki mielinowej i oligodendrocytów, zarówno przez bezpośredni atak komórkowy, jak i pośrednio – przez wydzielane przez komórki chemokiny i cytokiny. Tak zainicjowana demielinizacja prowadzi do następczej dysfunkcji i utraty aksonów, a to skutkuje wytworzeniem plaki demielinizacyjnej [5].

Pomimo określonego podstawowego modelu, dokładna natura każdego z etapów inwazji komórek obwodowego układu immunologicznego na komórki CNS nie jest znana. Do wyjaśnienia pozostaje punkt inicjujący, czyli w jaki sposób antygeny CNS – najprawdopodobniej białko mieliny – pomimo bariery krew-mózg są w stanie stymulować komórki obwodowego układu immunologicznego [20]. Podkreśla się, że wywołana reakcja autoimmunologiczna wynika nie tyle z istnienia komórek autoagresywnych, co z zachwiania równowagi pomiędzy aktywnością zapalną –

efektorową i regulatorową. Takie przełamanie tolerancji najprawdopodobniej jest związane z podatnością genetyczną [5].

Głównymi grupami komórek biorącymi udział reakcji autoimmunologicznej są limfocyty T CD 4+, limfocyty T CD8+, limfocyty B oraz elementy odpowiedzi nieswoistej – komórki mieloidalne, astrocyty, mikroglej, komórki dendrytyczne i komórki NK.

Do najlepiej przebadanych populacji komórek zaangażowanych w proces demielinizacji należą elementy odporności nabytej – limfocyty T i B.

Wśród limfocytów T CD4 +, czyli limfocytów Th, największy udział w reakcji autoimmunologicznej mają populacje Th1 (które wydzielają m.in. interferon gamma) oraz Th17 (wydzielające m.in. interleukinę 17) [21]. Obecnie uważa się, że główną cytokiną produkowaną przez limfocyty T CD4+, która warunkuje rozwój autoimmunologicznej demielinizacji, jest czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Indukuje on naciek zapalnych komórek mieloidalnych [22]. Wśród limfocytów T, poza aktywacją populacji o potencjale autoagresywnym, zachodzą również zmiany w populacjach regulatorowych. U pacjentów z MS wykazano osłabioną funkcję takich populacji regulatorowych jak T FOXP3+, limfocyty Tr1 czy limfocyty CD39+ [23].

Przeprowadzone badania potwierdzają kluczową rolę limfocytów B w etiopatogenezie MS, choć nie udało się dotąd określić swoistego dla rozwoju choroby przeciwciała. U pacjentów z MS limfocyty B wykazują zmieniony profil produkcji cytokin, z przewagą wydzielania czynników prozapalnych, takich jak GM-CSF czy limfotoksyna alfa [24]. Ponadto limfocyty B pamięci mają zdolność do indukcji spontanicznej proliferacji limfocytów T – szczególnie Th1. Mają nieprawidłowy fenotyp i funkcję oraz przyczyniają się do promowania rozwoju prozapalnych, autoreaktywnych populacji limfocytów T [25].

Obecnie zwraca się coraz większą uwagę na udział komórek odporności nieswoistej w patogenezie MS, jak np. komórek NK (ang. natural killers, NK) czy komórek rezydujących w CNS. Zmienia się również podejście do rozumienia patogenezy MS. Zgodnie z obecnie promowaną koncepcją istoty chorób autoimmunologicznych, to

zaburzenie funkcji regulatorowych prowadzi do załamania tolerancji immunologicznej i rozwoju choroby [26].

1.1.3. Stwardnienie rozsiane – postacie choroby

Obecnie obowiązującym podziałem fenotypów MS jest klasyfikacja opracowana przez Lublina i wsp. w 2013 roku. Uwzględnia ona następujące postacie choroby:

- kliniczne izolowany zespół (ang. clinically isolated syndrome, CIS),
- postać rzutowo-remisyjną (ang. relapsing-remmiting multiple sclerosis, RRMS),
- postać pierwotnie postępującą (ang. primary progressive multiple sclerosis, PPMS),
- postać wtórnie postępującą (ang. secondary progressive multiple sclerosis, SPMS) [27, 28].

CIS – oznacza pierwszy epizod kliniczny, ostry lub podostry, silnie sugerujący chorobę demielinizacyjną CNS. Jego najczęstszą manifestacją jest pozagałkowe zapalenie nerwu wzrokowego [29]. Wyróżnia się CIS aktywny i nieaktywny. Za CIS nieaktywny uważa się taki, w którym oprócz typowego zespołu neurologicznego nie stwierdza się aktywności w badaniu metodą rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI). Z kolei za aktywny uważa się CIS, w którym w obrazie MRI są obecne typowe zmiany demielinizacyjne wzmacniające się po podaniu kontrastu gadolinowego. Jedynie aktywny CIS jest uznawany za fenotyp MS [27, 28].

RRMS jest najczęściej występującym fenotypem MS, stwierdzanym na początku choroby u około 85% chorych. Charakteryzuje się występowaniem naprzemiennych okresów aktywności choroby (rzutów) i względnej stabilności bez nowych objawów neurologicznych (remisji) [30]. RRMS można opisać jako aktywny lub nieaktywny. Aktywny RRMS rozpoznaje się, gdy w ostatnim roku choroby występowały rzuty i/lub pojawiły się nowe zmiany w MRI. O nieaktywnym RRMS mówi się, gdy w ostatnim roku u pacjenta nie wystąpiły rzuty ani nie pojawiły się nowe zmiany w MRI [28]. W naturalnym przebiegu, w wyniku postępu choroby, RRMS konwertuje do SPMS w czasie około 10-15 lat [32].

SPMS jest postacią, w której obserwuje się postępującą w czasie niesprawność bez ewidentnych rzutów choroby. Rozwija się ona po okresie około 10-15 lat od rozpoznania RRMS i jest wynikiem akumulacji niesprawności wskutek niepełnych

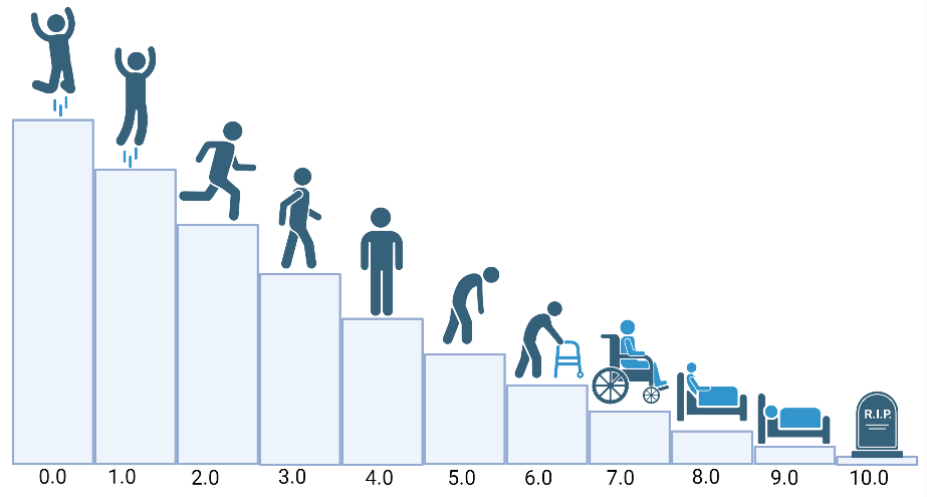
remisji po kolejnych rzutach choroby. SPMS wiąże się z niepewnym dalszym rokowaniem [32].

PPMS to postać MS charakteryzująca się postępującym przebiegiem od początku choroby. Dotyczy ona około 10-20% chorych na stwardnienie rozsiane. PPMS rozpoczyna się najczęściej około 40 roku życia i występuje z porównywalną częstością u mężczyzn i kobiet [33].

W każdej z postaci postępujących można wyróżnić następujące typy:

- aktywny z progresją,
- aktywny bez progresji,
- nieaktywny z progresją,
- nieaktywny bez progresji.

Aktywność definiuje się jako występowanie zaostrzeń i/lub zmian w MRI. Progresja oznacza pogłębianie się deficytu neurologicznego mierzonego rozszerzoną skalą niepełnosprawności – EDSS [27, 28]. Skalę wraz ze schematycznym opisem przedstawiono na Rycinie 1. [34].



Rycina 1. Rozszerzona skala niepełnosprawności – EDSS. Schemat. Opracowanie własne (BioRender.com)

Objaśnienia:

0.0 pkt. – prawidłowy wynik badania neurologicznego; 1.0 – brak niesprawności, minimalne upośledzenie funkcji w jednym układzie; 2.0 – niewielkie upośledzenie funkcji w jednym układzie; 3.0 – chodzący samodzielnie bez pomocy, umiarkowana niesprawność w jednym układzie; 4.0 – chodzący samodzielnie bez pomocy, nasilona niesprawność w jednym układzie; 5.0 – chodzi samodzielnie na dystansie ok. 500 m, nie jest samodzielny; 6.0 – chodzi z jednostronnym

podparciem na dystansie 100 m; 6.5 – chodzi z obustronnym podparciem na dystansie 20 m; 7.0 – porusza się na wózku inwalidzkim; 8.0 – siedzi w łóżku; 9.0 – leży w łóżku; 10.0 – śmierć z powodu MS.

1.1.4. Stwardnienie rozsiane – rozpoznanie

Obecnie obowiązującymi kryteriami rozpoznania MS są kryteria McDonalda opracowane w 2017 roku.

Postać rzutowo-remisyjna

Do rozpoznania postaci rzutowo-remisyjnej MS niezbędne jest stwierdzenie współistnienia rozsiania w czasie i przestrzeni. Rozsianie w czasie (ang. dissemination in time, DIT) jest rozumiane jako wystąpienie co najmniej dwóch rzutów choroby lub różnoczasowych zmian w MRI. Rozsianie w przestrzeni (ang. dissemination in space, DIS) oznacza wystąpienie rzutów z dwóch różnych ognisk w CNS lub stwierdzenie zmian w MRI w co najmniej dwóch typowych dla MS lokalizacjach.

Pełne kryteria rozpoznania postaci rzutowo-remisyjnej MS przedstawia Tabela 1. Rozpoznanie MS można postawić, jeśli spełnione są poniższe kryteria i nie ma lepszego wyjaśnienia objawów klinicznych [35].

Tabela 1. Kryteria McDonalda 2017 – rozpoznanie postaci rzutowo-remisyjnej MS

	Liczba zmian w MRI, które odpowiadają obiektywnym objawom klinicznym	**Dodatkowe dane konieczne do rozpoznania MS**
≥2 rzuty kliniczne	≥2	Żadne[1]
≥2 rzuty kliniczne	1 (w historii choroby rzut ze zmiany z ogniska o innej lokalizacji anatomicznej)[2]	Żadne[1]
≥2 rzuty kliniczne	1	Rozsianie w przestrzeni potwierdzone przez kolejny rzut z innego obszaru CNS lub MRI[3]
1 rzut kliniczny	≥2	Rozsianie objawów w czasie potwierdzone przez kolejny rzut lub badanie MRI[4] albo obecność prążków oligoklonalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. cerebrospinal fluid, CSF)
1 rzut kliniczny	1	Rozsianie w przestrzeni potwierdzone przez kolejny rzut z innego obszaru CNS lub MRI[3] lub Rozsianie objawów w czasie potwierdzone przez kolejny rzut lub badanie MRI[4] albo obecność prążków oligoklonalnych w CSF

Objaśnienia:

[1] Żadne dodatkowe testy nie są potrzebne, aby potwierdzić rozsianie procesu w czasie i przestrzeni. Jednakże, jeśli tylko to możliwe, badanie MRI powinno być wykonane u wszystkich z podejrzeniem MS. U pacjentów z nietypowym obrazem klinicznym (w tym nietypowym CIS) i radiologicznym należy rozważyć wykonanie badania MRI rdzenia kręgowego lub CSF. Jeśli te badania będą negatywne, należy wziąć pod uwagę inne rozpoznania.

[2] Rozpoznanie kliniczne bazujące na stwierdzeniu dwóch zmian w MRI w przebiegu dwóch rzutów jest najpewniejsze. W razie sugestywnych danych z wywiadu powinno się zawsze dążyć do

potwierdzenia w badaniu neurologicznym charakterystycznych objawów rezydualnych lub ewolucji ogniska uszkodzenia.

[3] Rozsianie w przestrzeni potwierdza obecność jednej lub więcej zmian T2-zależnych w dwóch lub więcej z czterech typowych lokalizacji – okołokomorowo, korowo lub przykorowo, podnamiotowo lub w rdzeniu kręgowym.

[4] Rozsianie w czasie potwierdza jednoczesna obecność w badaniu MRI zmian wzmacniających się i niewzmacniających się po podaniu kontrastu gadolinowego lub pojawienie się nowych zmian T2-zależnych w kolejnym MRI w porównaniu z pierwszym.

Postać pierwotnie postępująca

Do postawienia rozpoznania postaci pierwotnie postępującej MS należy stwierdzić progresję choroby niezależną od rzutów (ocena retrospektywna lub prospektywna) w ciągu 12 miesięcy oraz spełnienie dwóch z trzech poniższych kryteriów:

- wykazanie zmian w mózgu oparte na stwierdzeniu ≥ 1 ogniska w obrazach T2-zależnych w lokalizacji typowej dla MS (okołokomorowo, korowo/przykorowo lub podnamiotowo),

- wykazanie zmian w rdzeniu kręgowym (≥ 2 ogniska w obrazach T2-zależnych),

- obecność prążków oligoklonalnych w CSF.

Nie jest wymagane rozróżnienie między objawowymi i bezobjawowymi zmianami w MRI. Zarówno zmiany przykorowe, jak i korowe mogą służyć do spełniania kryteriów dotyczących rozsiania w przestrzeni w badaniu MRI [35].

Postać wtórnie postępująca

Nie została do tej pory określona jednoznaczna definicja i kryteria rozpoznania tej postaci MS. Jest to spowodowane trudnym do uchwycenia punktem przejścia z postaci rzutowo-remisyjnej w postać postępującą [27, 32]. Najczęściej używana jest definicja wg. Lorscheidera i wsp., według której SPMS można rozpoznać, jeśli stwierdzi się utrzymujący się co najmniej trzy miesiące postęp niesprawności o 1 punkt (przy EDSS < 5,5) lub 0,5 punktu (przy EDSS > 6,0), przy braku rzutów w ciągu ostatnich dwóch lat, minimalnym EDSS 4,0 i ocenie ≥ 2 w piramidowym systemie funkcjonalnym skali EDSS [36].

1.2. Odporność wrodzona

1.2.1. Odporność wrodzona – informacje ogólne

Układ odpornościowy składa się z dwóch głównych komponentów: odporności wrodzonej – nieswoistej oraz odporności nabytej, zwanej również odpornością swoistą. Odporność wrodzona polega na aktywacji istniejących w organizmie niespecyficznych mechanizmów i naturalnych barier. Odporność nabyta jest skierowana przeciwko wcześniej rozpoznanemu przez odporność wrodzoną mikroorganizmowi lub antygenowi [37]. Odporność wrodzona jest pierwszą linią obrony organizmu. Jej mechanizmy, w odróżnieniu od mechanizmów odpowiedzi nabytej, są szybkie i do ich aktywacji potrzeba od kilku minut do kilku godzin. Jej celem jest zapobieganie infekcji, eliminowanie obcych patogenów i stymulowanie nabytej odpowiedzi immunologicznej. Na odporność wrodzoną składają się: bariery fizyczne (skóra i błony śluzowe), komórki efektorowe (tj. granulocyty, monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK, naturalne komórki limfoidalne, komórki nabłonka i śródbłonka), a także cytokiny, białka ostrej fazy i receptory komórkowe [38, 39, 40, 41]. W Tabeli 2. przedstawiono elementy odpowiedzi wrodzonej wraz z ich podstawowymi funkcjami.

Tabela 2. Elementy odpowiedzi wrodzonej i ich funkcje. Przygotowano na podstawie: Aristizábal B., et.al. *Innate immune system* [42]

Element odpowiedzi wrodzonej	**Funkcja**
Bariery	
Skóra	Zapobieganie przedostaniu się patogenu do organizmu
Błona śluzowa	Zapobieganie przedostaniu się patogenu do organizmu, wydzielanie białek i enzymów, absorbcja produktów metabolizmu
Komórki efektorowe	
Granulocyty	Fagocytoza, produkcja cytokin, wydzielanie białek i enzymów, niszczenie patogenów

Monocyty/makrofagi	fagocytoza, produkcja cytokin, wydzielanie białek i enzymów, niszczenie patogenów, prezentacja antygenu
Komórki dendrytyczne	fagocytoza, produkcja cytokin, wydzielanie białek i enzymów, niszczenie patogenów, prezentacja antygenu
Komórki NK	Liza komórek zainfekowanych i komórek nowotworowych, produkcja cytokin, aktywacja makrofagów, prezentacja antygenu, funkcje regulatorowe
Naturalne komórki limfoidalne **(ang. innate lymphoid cells, ILCs)**	Pośredniczenie w odpowiedzi immunologicznej, funkcje regulatorowe
Komórki śródbłonka, komórki nabłonka	Rozpoznanie patogenu, produkcja cytokin
Rozpuszczalne elementy pośredniczące	
Cytokiny	
TNF-α, IL-1, chemokiny	Pośredniczenie w odpowiedzi immunologicznej i zapalnej
Interferon alfa (ang. Interferon-alfa, IFN-α)	Odporność przeciwwirusowa
Interferon gamma (ang. Interferon-gamma, IFN-γ)	Odporność przeciw wewnątrzkomórkowym patogenom i aktywacja makrofagów
Transformujący czynnik wzrostu beta (ang. Transforming growth factor beta, TGF-β)	Regulacja i kontrola procesu zapalnego
Interleukina 12 (IL-12)	Stymulacja wydzielania IFN-γ przez komórki NK i limfocyty T
Interleukina 15 (IL-15)	Stymulacja proliferacji komórek NK
Interleukina 10 (IL-10)	Regulacja i kontrola procesu zapalnego

Interleukina 4 (IL-4)	Regulacja procesu zapalnego, aktywacja innych komórek do funkcji regulatorowych lub efektorowych
Interleukina 13 (IL-13)	Regulacja procesu zapalnego, aktywacja innych komórek do funkcji regulatorowych lub efektorowych
Białka osocza	
Układ dopełniacza	Opsonizacja i destrukcja patogenów, aktywacja limfocytów T
Kolektyny	Opsonizacja patogenów, aktywacja układu dopełniacza
Biako C-reaktywne	Opsonizacja patogenów, aktywacja układu dopełniacza
Układ krzepnięcia	Lokalizacja uszkodzenia lub zainfekowanej tkanki
Receptory komórkowe	
Receptory Toll-podobne (ang. Toll-like receptors, tlrs)	Rozpoznawanie różnych składowych mikroorganizmów
Receptory Nod-podobne (ang. Nod-like receptors, NLRs)	Rozpoznawanie elementów bakterii obecnych w cytoplazmie
Receptory lektynopodobne typu C (ang. C-type lectin receptors, CLRs)	Rozpoznawanie wiązań cukrowych bakterii i grzybów
Receptory RIG-I-podobne (ang. RIG-I-like receptors, RLRs)	Rozpoznawanie wirusowego RNA

1.2.2. Rola komórek efektorowych odporności wrodzonej w patogenezie stwardnienia rozsianego

Udział układu immunologicznego w patogenezie MS jest niepodważalny i od lat stanowi przedmiot badań, głównie w obszarze odporności swoistej. Na podstawie udowodnionego istotnego wpływu jej elementów na rozwój choroby, opracowano wiele obecnie stosowanych, skutecznych terapii. W ostatnich latach wykazano, że również

odporność nieswoista jest zaangażowana w ten proces i coraz więcej badaczy skupia się na analizie jej roli w reakcji autoimmunologicznej leżącej u podłoża MS. Istnieją doniesienia dotyczące roli komórek dendrytycznych, komórek mikrogleju, astrocytów, monocytów i makrofagów w patogenezie MS. Uważa się, że istotną rolę w tym procesie mogą pełnić również naturalne komórki limfoidalne, w tym komórki NK [43, 44].

1.2.2.1. Naturalne komórki limfoidalne

Naturalne komórki limfoidalne są elementem odpowiedzi nieswoistej i istotnym źródłem cytokin efektorowych [45]. Przez swoje podobieństwo do limfocytów T, zostały uznane za ich wrodzone odpowiedniki, z czego każdy podtyp ILCs miałby odpowiadać innej subpopulacji limfocytów T.

ILCs można podzielić ze względu na pełnione funkcje na: cytotoksyczne ILCs, do których zaliczają się komórki NK i niecytotoksyczne ILCs, wśród których można wyróżnić subpopulacje: ILCs1, ILCs2, ILCs3 oraz komórki T indukujące tkankę limfoidalną (ang. lymphoid tissue inducer cells, LTi). Wymienione subpopulacje różnią się między sobą czynnikami transkrypcji, wydzielanymi cytokinami i w wyniku tego – potencjalną funkcją [45, 46, 47]. Podział ILCs z uwzględnieniem ich funkcji, czynników transkrypcji i wydzielanych cytokin przedstawia Tabela 3.

Tabela 3. Podział ILCs z uwzględnieniem ich funkcji, czynników transkrypcji i wydzielanych cytokin

Subpopulacja ILCs	Czynniki transkrypcji	Wydzielane cytokiny
Niecytotoksyczne ILCs		
ILCs1	T-BET, NFIL3, RUNX3	IFN-γ, TNF, IL-4
ILCs2	RORα, GATA3, Bcl11B, GFI1	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, Areg
ILCs3	RORγt, AHR, ID2	IFN-γ, TNF, IL-22, GM-CSF, IL-17A
LTi	RORγt, TOX, ID2	IL-22, GM-CSF, IL-17A
Cytotoksyczne ILCs		
Komórki NK	T-BET, EOMES	perforyna, granzymy, IFN-γ, TNF, IL-10, IL-4, IL-13

Objaśnienia:

T-BET – czynnik transkrypcyjny T-box z ekspresją na limfocytach T (ang. T-box expressed in T cells); EOMES – eomezodermina (ang. eomesodermin); NFIL3 – czynnik jądrowy indukowany przez interleukinę 3 (ang. nuclear factor IL3 induced); RUNX3 – związany z RUNT czynnik transkrypcyjny 3 (ang. runt-related transcription factor 3); RORα- receptor sierocy α związany z RAR (ang. RAR-related orphan receptor); GATA3 – wiążące GATA białko 3 (ang. GATA binding protein 3); Bcl11B – (ang. B cel lymphoma/leukemia 11B), GFI1 – niezależny czynnik wzrostu 1 (ang. growth factor independence-1) ; Areg – amfiregulina (ang. amphiregulin); RORγt –receptor sierocy γt związany z RAR (ang. RAR-related orphan receptor γt); AHR – arylowy receptor węglowodorowy (ang. Aryl hydrocarbon receptor); ID2 – inhibitor wiązania DNA 2 (ang. inhibitor of DNA binding 2); TOX – (ang. thymocyte selection associated high mobility group box protein).

1.2.2.1.1. Naturalne komórki limfoidalne typu 1 – ILCs1

ILCs1, dzięki zdolności do produkcji cytokin, chronią organizm przed wewnątrzkomórkowymi bakteriami i pasożytami oraz odgrywają rolę w walce z komórkami zmienionymi przez nowotwory i wirusy [45]. Ich identyfikacja nie jest łatwa, gdyż mają liczne cechy wspólne z komórkami NK – między innymi tak jak one

wydzielają IFN-γ i posiadają wiele takich samych markerów powierzchniowych – jak NK1.1, NKp44 i NKp46/CD335. Dodatkowe utrudnienie wynika z faktu, że specyficzne dla ILCs1 markery znikają z ich powierzchni po ich aktywacji. Od komórek NK odróżnia je brak zależności od czynnika transkrypcyjnego EOMES [46]. ILCs1 można podzielić na komórki z ekspresją markera CD127 i bez tej ekspresji. ILCs $CD127^-$ pod wpływem środowiska bogatego w interleukiny 12, 15 i 18 mogą wydzielać IFN-γ i TNF, a $CD127^+$ pod wpływem interleukin 12 i 18 produkują jedynie IFN-γ [45].

Za możliwym udziałem ILCs1 w patogenezie MS przemawiają badania eksperymentalne. U myszy z niedoborem czynnika transkrypcyjnego T-BET – niezbędnego do rozwoju ILCs1 – obwodowe podanie patogennych limfocytów Th17 CD4+ stosowanych celem wywołania eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (ang. experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), nie przyniosło zamierzonego efektu. Prawdopodobnie limfocyty Th17 nie zdołały przedostać się do mózgu. Nie udało się również wywołać EAE poprzez przeniesienie autoreaktywnych komórek CD4+ Th17 u myszy pozbawionych NK1.1 – istotnego markera ILCs1 [48]. O zaangażowaniu w proces zapalny w układzie nerwowym może świadczyć również fakt, że stwierdzono istotnie zwiększoną ilość ILCs1 w oponach mózgowych, splotach naczyniówkowych i w mózgu u myszy z wyindukowanym EAE, w porównaniu do zdrowych osobników [49, 50].

1.2.2.1.2. Naturalne komórki limfoidalne typu 2 – ILCs2

ILCs2 biorą udział w obronie przed pasożytami i są związane z patogenezą astmy i reakcji alergicznych. Wydzielają cytokiny zaangażowane w patogenezę alergii. W środowisku bogatym w interleukiny 23 i 33 wytwarzają IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13 oraz amfiregulinę, zarówno u myszy, jak i u ludzi. ILCs2 można zidentyfikować po markerze ST2, który jest składową receptora dla IL-33 [45].

ILCs2 są dominującą populacją ILCs stwierdzaną w mózgu zarówno u ludzi, jak i u myszy. Podobnie jak ILCs1, ILCs2 występują w oponach mózgowo-rdzeniowych [51]. Badania sugerują, że biorą one dział w patogenezie MS [50, 51]. Opisano eksperyment, w którym EAE było indukowane poprzez zakażanie myszy rekombinowanym wirusem opryszczki (ang. herpes simplex virus type 1, HSV-1) z ekspresją mysiej IL-2. Zaobserwowano, że myszy pozbawione ILCs2 nie rozwijały EAE, podczas gdy u myszy

bez ILCs1 i ILCs3 demielinizacja pojawiła się tak jak u myszy bez ingerencji w poziom ILCs. Transfer ILCs2 pochodzących ze szpiku kostnego zdrowych myszy do myszy z HSV-IL-2 powodował zapoczątkowanie demielinizacji [51].

1.2.2.1.3. Naturalne komórki limfoidalne typu 3 – ILCs3

Rozwój ILCs3 zależy od czynników transkrypcyjnych RORgt, AHR i ID2. Komórki te mają istotny udział w produkcji IL-17A, IL-22, GM-CSF i TNF. Wspomagają one odporność przeciwbakteryjną i promują występowanie przewlekłego stanu zapalnego [45]. Badania wykazały, że ILCs3, w szczególności te wytwarzające Il-17A, są obecne zarówno w zdrowym układzie nerwowym, jak i w warunkach zapalenia [49]. Podobnie jak wszystkie ILCs występują w oponach mózgowo-rdzeniowych. W badaniu nad EAE uwidoczniono zwiększoną ilość ILCs3 wytwarzających IFN-γ, GM-CSF i IL-17 w oponach mózgowo-rdzeniowych myszy chorych, w porównaniu do myszy zdrowych. Można zatem przypuszczać, że ta subpopulacja ILCs – poprzez promowanie stanu zapalnego i tworzenie środowiska sprzyjającego przetrwaniu i reaktywacji patogennych limfocytów T – również może odgrywać rolę w patogenezie MS [52].

1.2.2.1.4. Komórki T indukujące tkankę limfoidalną – LTi

LTi są komórkami zależnymi od czynnika transkrypcyjnego RORγt. Podczas rozwoju embrionalnego mają kluczowe znaczenie dla powstawania wtórnych grudek chłonnych i kępek Peyera. W sprzyjającym środowisku bogatym w IL-1β i IL-23 wydzielają cytokiny podobnie jak ILCs3, z wyjątkiem TNF [53]. W badaniu porównującym zawartość subpopulacji ILCs w CSF pacjentów ze stwardnieniem rozsianym i osób zdrowych stwierdzono zwiększoną ilość LTi w grupie chorych, podczas gdy poziomy pozostałych ILCs nie wykazywały istotnych różnic [54].

Podobnie jak w przypadku pozostałych ILCs, LTi występują w oponach mózgowo-rdzeniowych, a ich ilość zwiększa się podczas zaostrzenia EAE [49]. LTi są istotnymi producentami IL-22, która sprzyja zmniejszeniu szczelności bariery krew-mózg i rozwojowi stanu zapalnego CNS [54].

1.2.2.1.5. Komórki NK

Komórki NK to duże ziarniste limfocyty charakteryzujące się obecnością markera powierzchniowego CD56 i brakiem markera powierzchniowego CD3 ($CD56^+$ $CD3^-$). Stanowią one średnio 10% limfocytów krwi obwodowej i są jednym z głównych składników odporności wrodzonej. Są zaliczane do ILCs i przez długi czas były uważane za część ILCs1. Obecnie uznaje się, że ich funkcje efektorowe odpowiadają bardziej limfocytom T cytotoksycznym $CD8^+$ [55].

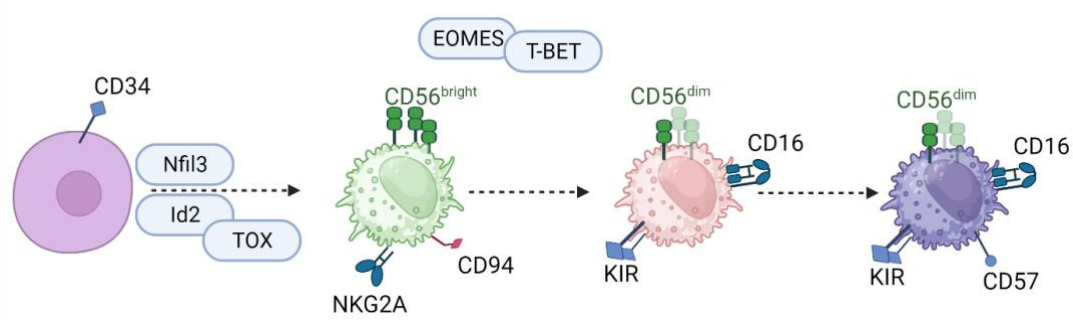
Komórki NK są częścią pierwszej linii obrony organizmu i odgrywają kluczową rolę w zabijaniu komórek zainfekowanych patogenem i komórek nowotworowych [56]. Oprócz swojej roli cytotoksycznej, komórki NK wytwarzają dużą liczbę cytokin i w ten sposób mogą regulować odpowiedź immunologiczną [57, 58]. Mają zdolność do odróżnienia nieprawidłowych komórek od zdrowych. Umożliwia im to celowe działanie, bez niszczenia prawidłowych komórek [59].

Rozwój komórek NK

Komórki NK różnicują się z hematopoetycznych komórek macierzystych $CD34^+$. Mimo częściowego funkcjonalnego podobieństwa do limfocytów T cytotoksycznych, fenotypowo odróżnia je brak markera CD3 na powierzchni. Ich przeżycie i rozwój zależą od cytokin (zwłaszcza IL-2 i IL-15) i czynników transkrypcyjnych. Czynniki Nfil3, Id2 i TOX odpowiadają za ich rozwój, a EOMES i T-bet – za dojrzewanie [60].

Etapy dojrzewania są charakteryzowane przez ekspresję specyficznych markerów. Mniej dojrzałe ludzkie komórki NK krwi obwodowej definiuje się jako $CD56^{bright}CD16^-$. Posiadają one również marker powierzchniowy CD94, receptor aktywujący NKp46/CD335 oraz receptor hamujący NKG2A [61]. W miarę dojrzewania komórki NK zmniejszają ekspresję CD56 i zwiększają ekspresję CD16, przyjmując fenotyp $CD56^{dim}CD16^+$. Tracą ekspresję NKG2A i nabywają ekspresję receptorów hamujących KIR. Ostatni etap dojrzewania komórek NK charakteryzuje się nabyciem markera CD57. Komórki NK $CD56^{dim}CD57^+$ uważane są za najbardziej dojrzałą i ostatecznie zróżnicowaną subpopulację [61]. Podczas rozwoju zachodzi również proces edukacji, który zależy od interakcji obecnych na komórkach NK receptorów hamujących z immunoreceptorowym motywem hamującym opartym o tyrozynę (ang. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM) z cząsteczkami głównego układu

zgodności tkankowej klasy I (ang. major histocompatibility complex class I, MHC-I). Dzięki temu komórki NK uczą się rozpoznawania komórek własnych [55, 59]. Schemat dojrzewania komórek NK przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Schemat dojrzewania komórek NK. Opracowanie własne (BioRender.com)

Objaśnienia:

Pod wpływem czynników transkrypcyjnych, z komórki macierzystej CD34^{+} różnicuje się komórka NK o niskim stopniu dojrzałości, charakteryzująca się dużą ekspresją CD56 – NK CD56^{bright}. Pod wpływem cytokin i czynników transkrypcyjnych zachodzi proces dojrzewania, przejawiający się zmniejszeniem ekspresji CD56 i zwiększeniem CD16 (CD56^{dim}). Pojawienie się markera CD57 świadczy o osiągnięciu dojrzałości przez komórkę NK.

Aktywacja i hamowanie komórek NK

Komórki NK są zdolne do zabijania komórek nowotworowych i komórek zakażonych wirusem na bardzo wczesnym etapie. W celu zapobiegania atakowaniu własnych komórek, komórki NK obierają dwie strategie działania: „missing self" oraz „induced self".

Strategia hamująca „missing self" polega na tym, że komórki NK – wyedukowane w trakcie dojrzewania do rozpoznawania cząsteczek MHC-I – nie atakują komórek, które te cząsteczki prezentują. Brak ekspresji własnych antygenów MHC lub zamaskowanie tej ekspresji, jak w przypadku zakażeń wirusowych lub komórek nowotworowych, sprawia, że komórki stają się wrażliwe na lizę za pośrednictwem komórek NK [62].

Strategia aktywująca „induced-self" zakłada interakcję receptorów aktywujących obecnych na komórkach NK (NKG2D) z odpowiednimi ligandami. Ligandy dla NKG2D nie są obecne na zdrowych komórkach, a ich ekspresja jest indukowana na powierzchni komórek w wyniku stresu oksydacyjnego, transformacji nowotworowej czy infekcji [63].

Na powierzchni komórek NK znajdują się zarówno receptory aktywujące, jak i

hamujące, co pozwala na bieżąco reagować na zmiany w organizmie. Do receptorów aktywujących zaliczyć można receptory wiążące cytokiny, integryny, receptory zabijające (CD16, CD335, NKp40, NKp30 i NKp44), receptory rozpoznające antygeny obce (Ly49H) i inne (np. NKp80, SLAM, CD18, CD2 i TLR3/9) [64]. Cząsteczki hamujące obejmują głównie receptory rozpoznające MHC-I, takie jak Ly49, NKG2A i LLT1. Można je podzielić w zależności od struktury i funkcji na 3 typy: receptory immunoglobulinopodobne komórek NK (ang. killer-cell immunoglobulin-like receptors, KIR), receptory lektynowe komórek NK (ang. killer lectin-like receptors, KLR) i receptory immunoglobulinopodobne leukocytów (ang. leukocyte immunoglobulin-like receptors, LILR) [65].

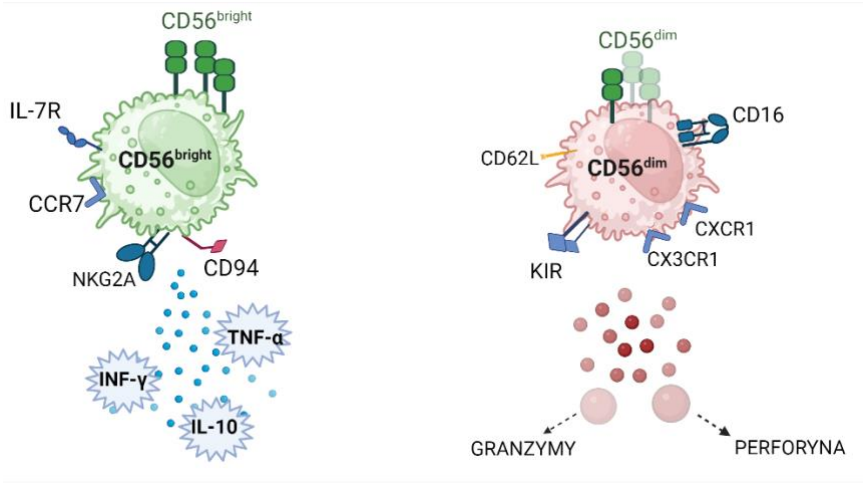
Subpopulacje komórek NK

Komórki NK można dzielić na różne subpopulacje pod względem fenotypu – czyli obecności lub braku receptorów powierzchniowych, rozmieszczenia w organizmie czy pełnionych funkcji [66, 67].

Podział komórek NK ze względu na fenotyp

Istnieje tradycyjny podział komórek NK na dwie główne subpopulacje ze względu na poziom ekspresji markera powierzchniowego CD56. Na tej podstawie wyróżnić można komórki NK $CD56^{bright}$ o dużej ekspresji CD56 i komórki NK $CD56^{dim}$, o małej ekspresji CD56. Subpopulacje te kształtują się podczas dojrzewania komórek NK. W krwi obwodowej i śledzionie komórki NK $CD56^{dim}$ stanowią one 90% całej populacji komórek NK. Wykazują ekspresję CD16, dzięki czemu są skutecznymi mediatorami cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ang. antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Na ich powierzchni występują licznie receptory KIR i LEA-1 oraz zawierają duże ilości ziaren cytolitycznych bogatych w enzymy, takie jak perforyna i granzymy. Te cechy sprawiają, że komórki NK $CD56^{dim}$ wykazują znacznie większą aktywność cytotoksyczną niż komórki $CD56^{bright}$ [68, 69]. Komórki o fenotypie $CD56^{bright}CD16^{-}$ dominują w węzłach chłonnych i migdałkach. Wykazują funkcje analogiczne do limfocytów Th. W zależności od warunków stymulacji, wydzielają cytokiny takie jak IFN-γ, TNF-β, GM-CSF, IL-10, Il-4 i IL-13 [70, 71, 72]. Schemat

głównych subpopulacji komórek NK określonych na podstawie poziomu ekspresji markera CD56 przedstawiono na Rycinie 3.



Rycina 3. Schemat głównych fenotypów komórek NK wraz z ich funkcjami. Opracowanie własne (BioRender.com)

Objaśnienia:

Komórki NK CD56^{bright} wywierają wpływ na otoczenie poprzez wydzielanie cytokin i pełnią głównie funkcje regulatorowe. NK CD56^{dim} magazynują i wydzielają granzymy i perforynę, co warunkuje ich działanie cytotoksyczne.

Stwierdzenie obecności lub braku markerów na powierzchni komórek NK może służyć do wyróżniania różnych subpopulacji komórek, zróżnicowanych pod względem funkcji. Wyróżnia się subpopulacje z ekspresją receptorów aktywujących – naturalnych receptorów cytotoksyczności (NKp30/CD337, NKp/CD336 i NKp46/CD335), aktywujących i hamujących receptorów CD94/NKG2, które rozpoznają nieklasyczne MHC oraz receptorów hamujących KIR, które rozpoznają klasyczne MHC. Różna ekspresja tych receptorów może świadczyć o różnych funkcjach efektorowych komórek [66].

Podział komórek NK ze względu na pełnione funkcje

Funkcja komórki NK jest determinowana przez potencjał do uwalniania ziarnistości cytotoksycznych, cytotoksyczność zależną od przeciwciał, interakcje z receptorami programowanej śmierci czy też zdolność do uwalniania cytokin. To czy komórka NK użyje swojej funkcji – czyli osiągnie określony efekt – zależy od warunków

środowiskowych, m.in. zawartości w środowisku odpowiednich cytokin, czynników transkrypcyjnych czy interakcji z innymi komórkami odpowiedzi immunologicznej [73]. Ze względu na efekt, jaki odnoszą, komórki NK można podzielić na dwie główne grupy: cytotoksyczne i regulatorowe [74].

Cytotoksyczne komórki NK

Standardowy fenotyp komórki NK pełniącej funkcje cytotoksyczne można określić jako NK $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ albo ze względu na obecność markerów CD 11b i CD27 na NK $CD11b^{+}$ $CD27^{-}$. Na ich powierzchni dominują receptory aktywujące – receptory naturalnej cytotoksyczności, takie jak np. CD335/NKp46/NCR1 (ang. natural cytotoxicity receptor 1, receptor naturalnej cytotoksyczności 1) [74]. O cytotoksyczności świadczy również ekspresja ligandów FASL i TRAIL, które indukują apoptozę komórek docelowych poprzez wiązanie się z odpowiadającymi im receptorami, odpowiednio FAS lub TRAILR oraz ekspresja markera CD16, który umożliwia zabijanie komórek w mechanizmie cytotoksyczności zależnej od przeciwciał. Funkcje cytotoksyczne przejawiają się również poprzez wytwarzanie i uwalnianie ziarnistości litycznych zawierających enzymy lityczne takie jak perforyna i granzymy, które indukują śmierć docelowych nieprawidłowych komórek [58].

Regulatorowe komórki NK

Regulatorowe komórki NK mogą prezentować fenotyp $CD56^{bright}$ lub CD27+. Podobnie jak komórki o funkcjach cytotoksycznych, mogą one zawierać w przewadze receptory aktywujące, ale ich działanie skierowane jest przeciwko komórkom prozapalnym [74]. Regulują one aktywność różnych komórek odporności wrodzonej i nabytej, jak na przykład komórek dendrytycznych, monocytów, makrofagów, limfocytów T i B poprzez produkcję cytokin lub bezpośredni kontakt komórka-komórka w sposób zależny od interakcji receptor-ligand.

Do wydzielanych przez regulatorowe komórki NK cytokin należą TGF-β, IFN-γ, IL-10, IL-4, IL-13. Aktywność regulacyjna może przejawiać się również w wydzielaniu cząsteczek litycznych, jak perforyna i granzymy. Regulatorowe funkcje komórek NK ujawniają się podczas infekcji wirusowych, bakteryjnych i pierwotniakowych oraz chorób nowotworowych i autoimmunologicznych [75].

Podział ze względu na lokalizację w organizmie

Ostatnie badania dowiodły, że poza komórkami NK krążącymi w krwi obwodowej i bytującymi w węzłach chłonnych zwanymi konwencjonalnymi komórkami NK (ang. conventional NK cells, cNK), występują również komórki NK tkankowe (ang. tissue-resident NK; trNK), zlokalizowane w poszczególnych organach. Znajdują się one w płucach, wątrobie, nerkach, macicy i mózgu. Komórki trNK funkcjonalnie przypominają $CD56^{bright}$ – wykazują zdolność do produkcji cytokin i słabą cytotoksyczność [76].

1.2.2.1.6. Markery powierzchniowe i wewnątrzkomórkowe komórek NK

Jak wspomniano wcześniej, fenotyp komórek NK można scharakteryzować na podstawie obecności lub braku markerów powierzchniowych. Poniżej przedstawiono charakterystykę niektórych z nich.

Markery CD3 i CD56 pozwalają na wydzielenie z populacji limfocytów komórek NK i zidentyfikowanie populacji $CD56^{bright}$ i $CD56^{dim}$ [75].

Marker CD335, czyli NKp46 lub NCR1, to marker pojawiający się na komórkach NK podczas dojrzewania, występujący zarówno na niedojrzałych komórkach NK – *bright* jak i dojrzałych *dim*. Jest to główny marker aktywujący komórek NK, który bierze udział w identyfikacji i eliminacji komórek atakowanych przez komórki NK. Do komórek, które posiadają ligandy dla tego receptora należą komórki uszkodzone przez wirusy, bakterie i grzyby, komórki nowotworowe, komórki beta trzustki, komórki tłuszczowe i wiele do tej pory niezidentyfikowanych [77]. Nie jest jednoznaczny efekt, jaki wywiera komórka NK poprzez obecność tego receptora. Prowadzone w onkologii badania wykazały, że stymulacja receptora CD335 powoduje uwolnienie przez komórkę NK IFN-γ, a jego blokada – zahamowanie aktywności cytolitycznej komórek NK. Na tej podstawie można przyjąć, że komórki NK CD335+ mają funkcje cytotoksyczne [64].

Marker CD27 należy do rodziny czynników martwicy nowotworu i jest obecny na komórkach NK, dojrzałych limfocytach B i limfocytach T. Komórki NK CD27+ mają zdolność do produkowania cytokin. Jest ich mniej niż CD27- we krwi obwodowej, a więcej w tkankach i uznaje się je za regulatorowe komórki NK [74]. Wykazano, że obniżenie ekspresji markera CD27 powoduje wzrost cytotoksyczności komórek NK i efektywniejsze usuwanie komórek nowotworowych. Połączenie markera CD27 z jego ligandem- CD70, znajdującym się na powierzchni komórek nowotworowych, stymuluje

aktywację limfocytów T regulatorowych i zmniejsza odpowiedź immunologiczną, co pogarsza rokowanie w chorobie [78]. Interakcja markera CD27 z CD70, który znajduje się na wielu zaktywowanych komórkach układu odpornościowego, ma znaczenie w patogenezie chorób autoimmunologicznych [79].

Marker CD274, czyli ligand dla receptora programowanej śmierci 1 (ang. programmed death ligand 1, PD-L1) może być obecny na limfocytach T i komórkach prezentujących antygen, takich jak komórki dendrytyczne, monocyty, makrofagi i komórki NK. Połączenie receptora programowanej śmierci z jego ligandem wywołuje efekt regulatorowy, zapewnia tolerancję immunologiczną i zapobiega reakcjom autoimmunologicznym [80].

Marker CD73 jest enzymem powierzchniowym obecnym na wielu komórkach układu odpornościowego, w szczególności na limfocytach Treg i komórkach NK. Enzym ten pośredniczy w stopniowej hydrolizie adenozynotrójfosforanu (ang. adenosine triphosphate, ATP) i adenozynodifosforanu (ang. adenosine diphosphate, ADP) do adenozyny o działaniu przeciwzapalnym. Supresja układu odpornościowego za pośrednictwem szlaków adenozynergicznych jest istotnym elementem homeostazy układu odpornościowego. Wysoka ekspresja CD73 świadczy o funkcjach regulatorowych komórki i hamuje jej aktywność cytotoksyczną [81].

Oznaczenie markerów wewnątrzkomórkowych pozwala na określenie potencjalnych funkcji komórek NK. Do istotnych markerów wewnątrzkomórkowych komórek NK należą granzymy B i K, perforyna, TGF-β, IFN-γ i interleukiny 10, 4 i 13.

Aktywność cytotoksyczna komórek NK w istotnej mierze zależy od uwalniania perforyny i granzymów – enzymów proteolitycznych obecnych w ziarnistościach litycznych w cytoplazmie komórek NK. Komórka NK łączy się z komórką docelową tworząc synapsę immunologiczną. To powoduje przemieszczanie się pęcherzyków wydzielniczych do błony presynaptycznej i uwolnienie enzymów do szczeliny synaptycznej. Następnie uwolniona perforyna powoduje wytworzenie porów w błonie komórki, która podlega atakowi, a przez wytworzone pory do środka komórki dostają się granzymy, powodując jej apoptozę [82].

Komórki NK wykazują aktywność regulatorową głównie poprzez sekrecję najważniejszych cytokin przeciwzapalnych – TGF-β i IL-10. TGF-β jest wydzielany przez komórki NK w sposób ciągły i odgrywa istotną rolę w immunomodulacji, procesie

zapalnym i naprawie tkanki. Powoduje hamowanie proliferacji limfocytów T i przeciwdziała cytotoksyczności innych komórek układu odpornościowego. Komórki NK stanowią istotne źródło IL-10 i mogą wydzielać ją bardzo szybko. Wysoki odsetek komórek NK mogących uwalniać te cytokiny stanowi dla organizmu zabezpieczenie przed reakcjami autoimmunologicznymi i jednocześnie pogarsza przebieg infekcji i chorób nowotworowych [83, 84].

IFN-γ charakteryzuje się przeciwwirusową, immunoregulacyjną i przeciwnowotworową aktywnością. Stymuluje transkrypcje ponad 30 genów warunkujących fizjologiczną i komórkową odpowiedź na różnorodne czynniki. Interferon gamma jest odpowiedzialny m.in. za: prezentację antygenów przez makrofagi, wzrost liczby enzymów litycznych w makrofagach, pobudzanie różnicowania się komórek Th1, inicjowanie ekspresji cząsteczek MHC klasy I, inicjowanie ekspresji cząsteczek MHC klasy II, aktywację komórek NK oraz aktywację syntezy tlenku azotu [85]. Mimo faktu, że jest określany jako cytokina prozapalna, jego funkcja w odpowiedzi immunologicznej nie jest jednoznaczna.

Interleukiny 4 i 13 są członkami rodziny cytokin Th2 i mogą być wydzielane przez liczne komórki odpowiedzi immunologicznej, w tym komórki NK. Biorą one udział w reakcji alergicznej i w odpowiedzi przeciwpasożytniczej. Antagonizują wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, IL-6, IL-17 i TNF-α [86]. Są również zaangażowane w hamowanie prozapalnych chemokin, jak np. IL-8 oraz innych czynników prozapalnych, jak GM-CSF, prostaglandyny, metaloproteinazy, czy wolne rodniki tlenowe [87]. Biorą udział w polaryzacji makrofagów w kierunku fenotypu przeciwzapalnego [88]. Dodatkowo cytokiny te hamują dojrzewanie limfocytów Th17 i wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych. Mają przez to działanie protekcyjne i zapobiegają rozwojowi chorób autoimmunologicznych [89, 90].

1.3. Aktualna wiedza na temat roli komórek NK w ośrodkowym układzie nerwowym i w patogenezie MS

1.3.1. Komórki NK w ośrodkowym układzie nerwowym

Liczne eksperymenty i badania potwierdzają obecność komórek NK w CNS. Stwierdzono występowanie komórek NK w CNS zdrowych myszy w oponach mózgowo-

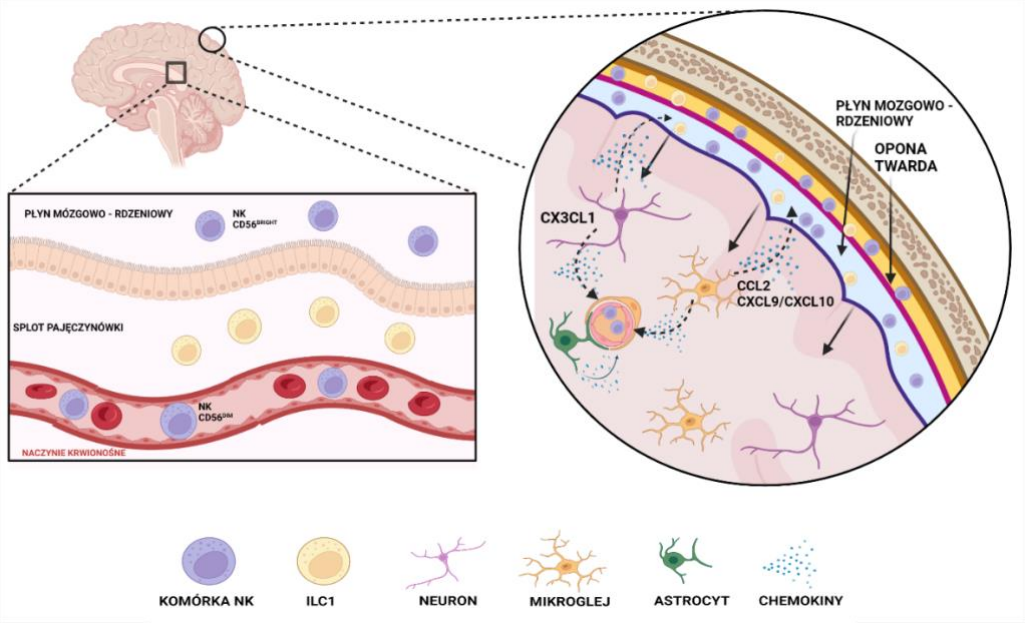
rdzeniowych i splotach naczyniówkowych, ale nie w samym mózgu [91, 92, 93]. Komórki te prezentują fenotyp z markerami powierzchniowymi IL-2R i CD27, co odpowiada ludzkiej subpopulacji $CD56^{bright}$ [92, 94]. U człowieka we krwi większość komórek NK stanowi fenotyp $CD56^{dim}$, a w płynie mózgowo-rdzeniowym $CD56^{bright}$. Dominacja w układzie nerwowym populacji $CD56^{bright}$ wynika prawdopodobnie z większej zdolności do adhezji i migracji, co pozwala na przekraczanie bariery krew-mózg [95, 96].

Nie jest jasne, w jaki sposób komórki NK docierają do CNS, ale wiadomo, że migracja zwiększa się w sytuacjach uszkodzenia bariery krew-mózg [97]. Ten złożony proces wymaga zaangażowania systemu adhezyn i chemokin. Stwierdzono, że zablokowanie interakcji pomiędzy cząsteczką adhezyjną VLA-4 obecną na komórce NK i VCAM-1 na komórkach śródbłonka skutkuje zahamowaniem przedostawania się komórek NK do CNS [98, 99]. Receptor CX3CR1, którego wysoką ekspresję przejawia subpopulacja $CD56^{dim}$, rozpoznaje zakotwiczoną w błonie komórek śródbłonka i neuronów chemokinę CX3CL1. Ich interakcja odpowiada za rekrutację komórek NK do CNS w przypadku udaru mózgu, infekcji pasożytniczej i EAE [100]. Komórki glejowe i naczyniowe również wydzielają chemokiny, takie jak CCL2, CXCL10 i CXCL12, które pośredniczą w chemoatrakcji komórek NK do mózgu [101]. Najnowsze dowody sugerują, że jamy szpikowe w czaszce mogą być niezależnym źródłem komórek mieloidalnych i limfocytów B. Istnieje więc możliwość, że komórki NK, stwierdzane w CNS, pochodzą bezpośrednio z komórek prekursorowych szpiku kostnego czaszki [102].

Oponowe naczynia limfatyczne stanowią system drenujący, umożliwiając cząsteczkom i komórkom układu odpornościowego krążenie pomiędzy przestrzenią podpajęczynówkową a szyjnymi węzłami chłonnymi. Stanowi to połączenie między obwodowym układem odpornościowym i CNS [103]. Możliwe, że obecne w CSF komórki NK $CD56^{bright}$ mogą patrolować CNS i poprzez wydzielanie cytokin wspierać prawidłowe funkcje mózgu, a na koniec opuszczać go przez naczynia limfatyczne opon mózgowo-rdzeniowych. Uszkodzenie oponowych naczyń limfatycznych, do którego dochodzi na przykład podczas starzenia i patologii układu nerwowego, powoduje upośledzenie funkcji komórek NK i ich pozostawanie w CNS [103].

Uważa się, że trNK, podobnie jak pozostałe typy komórek ILCs, mogą zasiedlać CNS, tworząc populacje komórek- rezydentów [104]. Mogą pełnić funkcję portiera CNS i zezwalać na wejście innym komórkom odpornościowym, w ten sposób inicjując proces

zapalny [105]. Do tej pory prowadzono badania nad trNK w mózgu jedynie u myszy. Scharakteryzowanie ich fenotypu i funkcji u ludzi może rzucić nowe światło na patogenezę chorób układu nerwowego i stanowić ważny punkt terapii. Schemat rozmieszczenia i podstawowych interakcji komórek NK w CNS przedstawia Rycina 4.



Rycina 4. Komórki NK w CNS. Opracowanie własne, na podstawie: Ning Z. et.al. *Natural killer cells in the central nervous system* [106], (BioRender.com)

Objaśnienia:

W CNS w stanie zdrowia można odnaleźć dwa rodzaje komórek NK – konwencjonalne i rezydujące w tkankach. Komórki cNK docierają do CNS drogą naczyń krwionośnych (fenotyp CD56^{dim}) i CSF (fenotyp CD56^{bright}) i lokalizują się w oponach mózgowo-rdzeniowych. Komórki trNK, podobnie jak zbliżone im funkcjonalnie ILCs1, bytują zarówno w oponach mózgowo-rdzeniowych, jak i splotach naczyniówki. W stanach chorobowych neurony, mikroglej, astrocyty i komórki śródbłonka uwalniają różnego rodzaju chemokiny, co powoduje naciek sąsiadujących komórek NK do mózgu.

1.3.2. Komórki NK w patogenezie MS

Wyniki wielu badań świadczą o udziale komórek NK w patogenezie MS, ale wnioski z nich wynikające nie są jednoznaczne. Wskazują bowiem na dwa przeciwstawne kierunki działania komórek NK: ochronny – regulatorowy, zmniejszający objawy MS i patogenny – wzmagający odpowiedź autoimmunologiczną, promujący zaostrzenia [106].

Fakt istotnego udziału komórek NK w hamowaniu reakcji autoimmunologicznych potwierdzono w badaniach in vitro. Poprzez wspólną hodowlę komórek NK z

autologicznymi komórkami T wyizolowanymi z krwi obwodowej wykazano, że komórki NK o fenotypie $CD56^{bright}$, dzięki receptorom takim jak NKp30/CD337, NKp46/CD335 i NKG2D, są w stanie odróżnić aktywowane limfocyty T od spoczynkowych limfocytów T i następnie zabić te aktywne poprzez uwolnienie granzymu A, granzymu K lub poprzez cytotoksyczność zależną od TRAIL [107, 108, 109].

W badaniach mających na celu identyfikację komórek zaangażowanych w patogenezę MS stwierdzono, że komórki NK $CD56^{bright}$ zdolne do wydzielania granzymu K występują w dużej ilości w okolicy okołokomorowej mózgu oraz w ogniskach demielinizacji chorych z MS. Dostają się w te rejony przez sploty naczyniówki, na skutek przyciągania przez aktywowane limfocyty T [95, 110]. Degranulacja granzymu K powoduje zaburzenia mitochondrialne i wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych w aktywowanych limfocytach T, co skutkuje ich śmiercią [111, 112]. W przeciwieństwie do NK $CD56^{bright}$, $CD56^{dim}$ wykazują cytotoksyczność zależną od przeciwciał (ADCC), zarówno w stosunku do aktywowanych jak i nieaktywnych limfocytów T [113]. Zaobserwowano, że zwiększenie tolerancji komórek NK w stosunku do limfocytów T oraz wytworzenie oporności limfocytów T na komórki NK może przyspieszać rozwój MS [107]. Na przykład obniżenie ekspresji receptora DNAM-1 na komórkach NK prowadzi do osłabienia ich reakcji, a zwiększona ekspresja HLA-E i zmniejszona ekspresja CD155 na komórkach T powoduje osłabienie ich wrażliwości na cytotoksyczność komórek NK – prowadzi to do niekontrolowanej autoimmunizacji [95, 107].

Ostatnie badania zidentyfikowały podtyp komórek NK $CD8^+$, których obecność u pacjentów z MS koreluje z niższym ryzykiem rzutu. Aktywowane limfocyty T $CD4^+$ zwiększają na swojej powierzchni ekspresję markera HLA-G, którego rolą jest hamowanie komórek NK. Komórki NK $CD8^+$ zmniejszają u siebie ekspresję ligandów dla tych receptorów (ILT2 i KIR2DL4) i w ten sposób uwalniają się spod tego hamującego wpływu [114]. Zaburzenia tej interakcji mogą potencjalnie prowadzić do zaostrzenia procesu chorobowego.

Również eksperymenty na EAE dowodzą, że komórki NK pełnią istotną rolę w ograniczeniu autoagresji. Zaobserwowano, że usunięcie komórek NK lub ograniczenie ich migracji do CNS zaostrza chorobę, a wzrost ich ekspansji prowadzi do złagodzenia objawów [100, 115]. Komórki NK mogą wpływać na limfocyty również pośrednio, na przykład poprzez zdolność do zabijania aktywowanych komórek mikrogleju. Działają

tak, żeby zahamować stymulowaną przez mikroglej aktywację limfocytów Th17 [115]. Ponadto znajdujące się w oponach mózgowo-rdzeniowych komórki NK wytwarzają IFN-γ, który stymuluje rozwój przeciwzapalnego fenotypu astrocytów, co może indukować apoptozę komórek T poprzez mechanizm zależny od TRAIL [116].

Niektóre prace prowadzą do odwrotnych wniosków i wskazują na możliwą szkodliwą rolę komórek NK w MS. Stwierdzono, że komórki te gromadzą się w pobliżu naczyń kory mózgu pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Przy udziale aktywowanych limfocytów T, komórki NK przenikają do zdemielinizowanej istoty szarej kory mózgu i w mechanizmie ADCC powodują korową okołonaczyniową demielinizację. Uznano, że w tym procesie biorą udział komórki NK $CD56^{dim}$ [117]. Udowodniono również, że u chorych z MS komórki NK upośledzają neurogenezę. Proces ten w ukształtowanym, dojrzałym mózgowiu, to złożony i wieloetapowy cykl, którego podstawą są neuronalne komórki macierzyste (ang. neuronal stem cells, NSC). W dojrzałym mózgowiu wyróżnia się dwie strefy aktywne podziałowo zawierające NSC: strefę podkomorową komór bocznych (ang. subventricular zone, SVZ) oraz strefę podziarnistą zakrętu zębatego hipokampa (ang. subgranular zone, SGZ) [118]. NSC wydzielają IL-15, stymulują komórki NK do migracji do SVZ, a następnie zmniejszają ekspresję Qa1 i zgodnie z koncepcją „missing self" stają się celem ich ataku. Skutkuje to upośledzeniem regeneracji tkanki nerwowej w fazie przewlekłej MS [119].

Te niejednoznaczne doniesienia wynikają ze złożoności natury komórek NK i faktu, że mogą pełnić w organizmie zupełnie różne funkcje – od cytotoksycznych po regulatorowe. Potrzebne są dalsze badania celem określenia roli komórek NK w patogenezie MS.

2. Cel pracy i pytania badawcze

2.1. Cel pracy

Ocena znaczenia komórek NK w patogenezie stwardnienia rozsianego.

2.2. Pytania badawcze

1. Czy występują różnice w fenotypie komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego a grupą kontrolną?
2. Jakie są różnice w wydzielaniu enzymów litycznych i cytokin przez komórki NK pomiędzy grupami pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego a grupą kontrolną?
3. Jakie są różnice w funkcji komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego, pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego a grupą kontrolną?

3. Pacjenci, materiał i metody

3.1. Dobór pacjentów do grupy badanej

Grupę badaną stanowiło 35 chorych na stwardnienie rozsiane, diagnozowanych w Klinice Neurologii z Pododdziałem Leczenia Udaru Mózgu oraz Poradni Neurologicznej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie. W oparciu o obowiązujące kryteria diagnostyczne, u 22 z tych pacjentów rozpoznano postać rzutowo-remisyjną a u 13 – postać pierwotnie postępującą stwardnienia rozsianego. Kryteriami włączenia do badania były:

- wiek powyżej 18 roku życia,

- możliwość wyrażenia świadomej zgody na badanie,

- brak jakiejkolwiek terapii immunomodulującej w przeszłości oraz obecnie,

- brak leczenia immunosupresyjnego w przeszłości oraz obecnie,

- odstęp od sterydoterapii wynoszący co najmniej 8 tygodni,

- brak rzutu choroby lub zaostrzenia w ciągu ostatnich 8 tygodni,

- brak aktywnej infekcji przewlekłej,

- brak jakiejkolwiek infekcji w ciągu ostatnich 4 tygodni.

3.2. Dobór osób zdrowych do grupy kontrolnej

Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób. Grupę dobrano pod względem struktury płci i wieku zbliżonej do grupy badanej. Zdrowi ochotnicy byli rekrutowani spośród pracowników Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie i Uniwersytetu Rzeszowskiego. Warunkami kwalifikacji do badania były:

- wiek powyżej 18 roku życia,

- możliwość wyrażenia świadomej zgody na badanie,

- brak stwierdzonych chorób autoimmunologicznych,

- brak stosowania leków mających wpływ na układ immunologiczny,

- brak aktywnej przewlekłej infekcji,

- brak infekcji w ciągu ostatnich 4 tygodni.

Wszystkich uczestników poinformowano o celu wykonywanych badań. Każda z osób wyraziła pisemną zgodę na udział w badaniu.

3.3. Materiał do badań

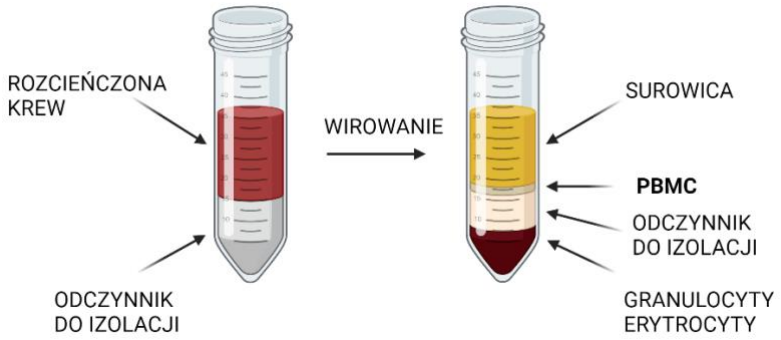
Materiałem do badań była krew żylna w ilości 5ml pobrana przez nakłucie żyły odłokciowej lub odpromieniowej, po wcześniejszej dezynfekcji miejsca wkłucia i krótkotrwałego założenia stazy. Do nakłucia użyto jednorazowej igły w rozmiarze 0,9 mm (KD Medical, 900130). Krew została pobrana techniką próżniową do dwóch probówek o pojemności 2,7ml, zawierających kwas wersenowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA; S-Monovette, Sarstedt).

3.4. Analiza materiału

Analizę materiału przeprowadzono w laboratorium Zakładu Immunologii Człowieka Instytutu Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

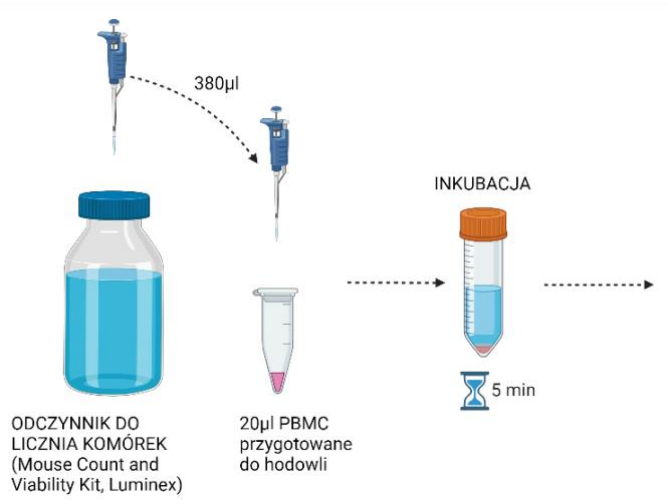
3.4.1. Izolacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells, PBMC)

Pobraną krew rozcieńczono roztworem buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (ang. Phosphate-buffered saline, PBS; EURx, E0282-01) w stosunku 1:1. Rozcieńczoną krew nawarstwiono na odczynnik do izolacji limfocytów o gęstości 1,077g/cm^3 (Lymphocyte Separation Media – Biowest, L0560) w proporcji 1 część odczynnika i 2 części rozcieńczonej krwi. Roztwór poddano wirowaniu (parametry wirowania: 5min, 500xg). Następnie zebrano powstały na granicy faz kożuszek leukocytarny (Rycina 5.).



Rycina 5. Izolacja PBMC. Opis w tekście. Opracowanie własne (BioRender.com)

Zebrane PBMC przeniesiono do probówki i dopełniono roztworem PBS a następnie poddano wirowaniu (parametry: 5min, 500xg) i zlano supernatant (pierwsze płukanie). Komórki zawieszono w 1ml roztworu PBS. Następnie celem pomiaru ilości i żywotności komórek, przeniesiono 20 µl zawiesiny komórkowej do probówki typu eppendorf, dodano 380 µl odczynnika do liczenia, inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej i przeanalizowano za pomocą urządzenia Guava® Muse® Cell Analyzer (Luminex). Schemat liczenia komórek przedstawiono na Rycinie 6.



Guava® Muse® Cell Analyzer, Luminex

Rycina 6. Proces liczenia komórek (objaśnienia znajdują się w tekście) – opracowanie własne (BioRender.com)

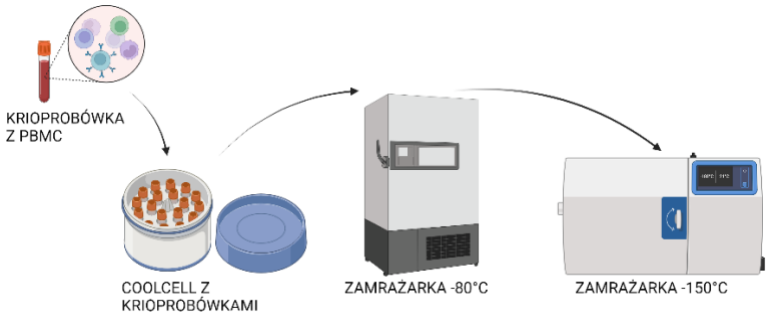
Pozostałą zawiesinę komórek po raz drugi przepłukano roztworem PBS. Następnie komórki zawieszono w medium do mrożenia komórek (Biofreeze freezing medium, Sigma Aldrich, F2270) i rozporcjowano do krioprobówek po 200 µL.

Krioprobówki opisano wg wzoru:

- grupa badana: numer kolejny/MS/data/PBMC

- grupa kontrolna: numer kolejny/K/data/PBMC

Krioprobówki umieszczono w pojemniku Coolcell obniżającym temperaturę o 1°C/minutę i włożono do zamrażarki w temperaturze -80°C. Po 4 godzinach probówki przeniesiono do zamrażarki o temperaturze -150°C. Proces przedstawia Rycina 7. Materiał do badań przechowywano w temperaturze -150^{0}C do czasu wykonywania oznaczeń, średnio około 60 dni.



Rycina 7. Mrożenie PBMC. Objaśnienia w tekście. Opracowanie własne (BioRender.com)

3.4.2. Zakładanie hodowli komórkowych

Krioprobówki zawierające komórki oraz medium do hodowli komórkowych (AIM V - Gibco, 12055083) umieszczono celem ogrzania w łaźni wodnej, w temperaturze 37°C. Następnie kolejne etapy zakładania hodowli prowadzono w warunkach sterylnych pracując pod komorą laminarną. Roztwór komórek przeniesiono do probówki typu falcon o objętości 15 mL. Krioprobówkę przepłukano 1 mL medium do hodowli komórkowych. Następnie komórki zawieszono w medium do końcowej objętości 6 mL. Roztwór komórek poddano wirowaniu (parametry: 400xg/5min, 24 °C), zlano supernatant, a komórki ponownie zawieszono w 6 mL medium i ponownie poddano wirowaniu**.** Po zlaniu supernatantu komórki zawieszono w 1mL medium. Pobrano 20 µl zawiesiny

komórkowej i umieszczono w probówkach typu eppendorf, celem przeprowadzenia pomiaru liczby komórek.

Następnie komórki wysiano na 6-dołkową, płytkę do hodowli (CellStar, non-treated, sterile).

Do każdego z dołków dodano:

- PBMC zawieszone w 1 mL pożywki,

- 1,8µl octanu mirystynianu forbolu (ang. Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) (Sigma Aldrich, 52440), o stężeniu 30ng/ml – celem stymulacji komórek do wzrostu,

- 1,5µl jonomycyny (Sigma, I0634) o stężeniu 1µg/ml – celem stymulacji komórek do produkcji interleukin,

- 3µl koktajlu aktywującego leukocyty GolgiPlug (BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™ - BD, 555028) o stężeniu 1µg/ml – celem zahamowania uwalniania do medium interleukin wyprodukowanych przez komórki,

- 2mL medium wzbogaconego o L- glutaminę, streptomycynę i gentamycynę (AIM V Gibco, 12055083).

Tak przygotowaną płytkę umieszczono w inkubatorze do hodowli komórek (Panasonic CO_2 Incubator MCO-170AICUVH-PE), (37°C, 5% CO_2). Czas stymulacji wynosił 6 godzin.

3.4.3. Oznaczanie markerów powierzchniowych komórek

Po 6 godzinach hodowli/stymulacji, komórki z poszczególnych studzienek przeniesiono do probówki cytometrycznej, a dołek płytki przepłukano 1 mL buforu PBS (EURx, E0282-01). Następnie poddano wirowaniu (500xg, 5min, 24°C). Po zlaniu supernatantu komórki przepłukano buforem Stain (Pharmingen ™ Stain Buffer (BSA) – BD, 554657) i ponownie poddano wirowaniu (500xg, 5min, 24°C). Komórki rozdzielono do dwóch probówek. Jedną pozostawiono jako kontrolę negatywną, a do drugiej, badanej, celem znakowania markerów powierzchniowych komórek NK, dodano koktajl przeciwciał monoklonalnych:

- Alexa Fluor Mouse Anti-Human CD3 (Klon OKT3, BD Pharmingen)

- FITC Mouse Anti-Human CD56 (Klon B159, BD Pharmingen)

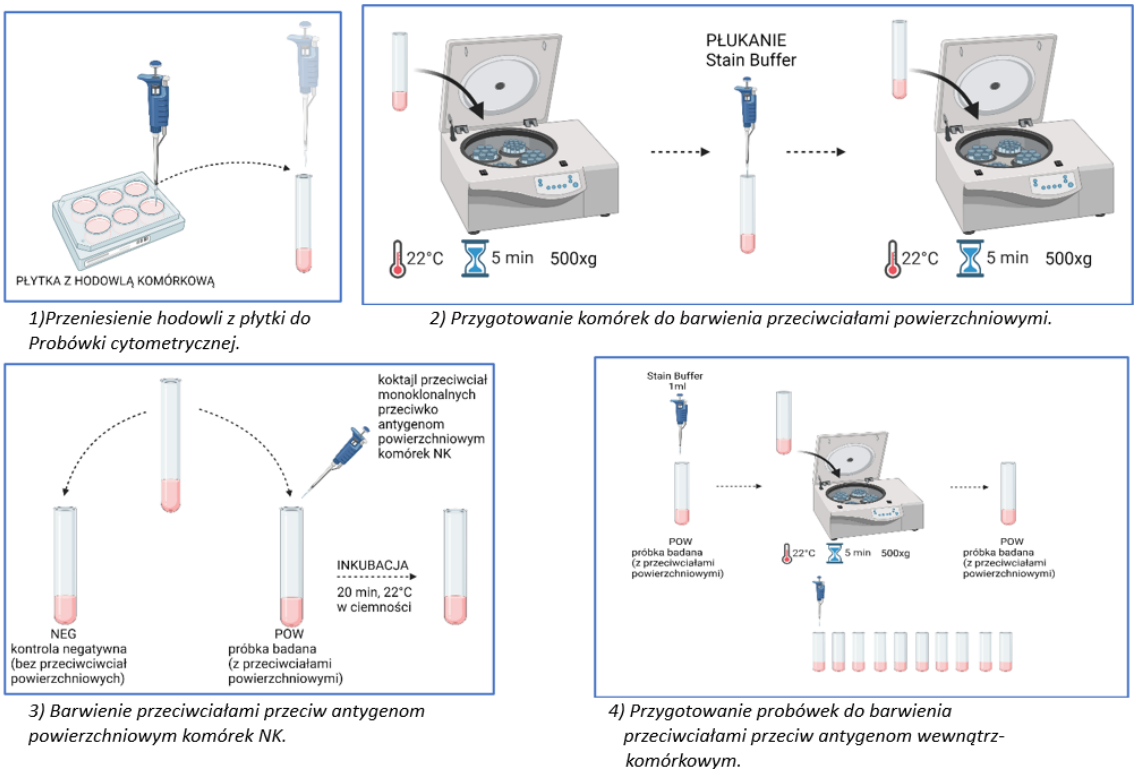
- PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD73 (Klon AD2, BD Pharmingen)

- APC-H7 Mouse Anti-Human CD27 (Klon M-T271, BD Pharmingen)

- BV605 Mouse Anti-Human CD274 (Klon MIH1, BD OptiBuild)

- V450 Mouse Anti-Human CD335 (Klon 9E2/NKp46, BD Horizon)

Próbki inkubowano w temperaturze pokojowej, przez 20 minut, w ciemności. W kolejnym etapie, w celu utrzymania żywotności komórek i maksymalizacji intensywności sygnału fluorescencji do próbek dodano Stain Buffer (Pharmingen™ Stain Buffer (BSA) – BD, 554657) w ilości 1ml/probówkę. Po procesie wirowania (500xg, 5 minut, temperatura pokojowa), probówki rozdzielono do 10 probówek cytometrycznych. Przebieg tego etapu przedstawiono na Rycinie 8.



1)Przeniesienie hodowli z płytki do Probówki cytometrycznej.

2) Przygotowanie komórek do barwienia przeciwciałami powierzchniowymi.

3) Barwienie przeciwciałami przeciw antygenom powierzchniowym komórek NK.

4) Przygotowanie probówek do barwienia przeciwciałami przeciw antygenom wewnątrz-komórkowym.

Rycina 8. Oznaczenie markerów powierzchniowych komórek. Objaśnienia w tekście. Opracowanie własne (BioRender.com)

3.4.4. Oznaczanie markerów wewnątrzkomórkowych

Jako etap wstępny, w celu przygotowania komórek do barwienia wewnątrzkomórkowego, przeprowadzono utrwalenie i permeabilizację komórek poprzez dodanie do każdej probówki cytometrycznej po 250µl roztworu do fiksacji i permeabilizacji Fix/Perm Solution (BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™, BD 555028). Po inkubacji (20 minut, 4°C, w ciemności), komórki dwukrotnie przepłukano w buforze Perm/Wash (BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™ - BD, 555028). W kolejnym etapie, do każdej odpowiednio oznaczonej probówki typu eppendorf dodano przeciwciała monoklonalne (skoniugowane z fluorochromem PE) skierowane przeciwko markerom wewnątrzkomórkowym:

- PE Mouse Anti-Human Granzyme B (Klon GB11, BD Pharmingen)

- PE Mouse Anti-Hu Granzyme K (Klon G3H69, eBioscience)

- PE Mouse Anti-Human Perforin (Klon δG9, BD Pharmingen)

- PE Mouse Anti-Human TGF-β1 (Klon TW4-9E7, BD Pharmingen)

- PE Mouse Anti-Human IFN-γ (Klon 4S.B3, BD Pharmingen)

- PE Rat Anti-Human and Viral Il-10 (Klon JES3-9D7, BD Pharmingen)

- PE Mouse Anti-Human IL-4 (Klon 8D4-8, BD Pharmingen)

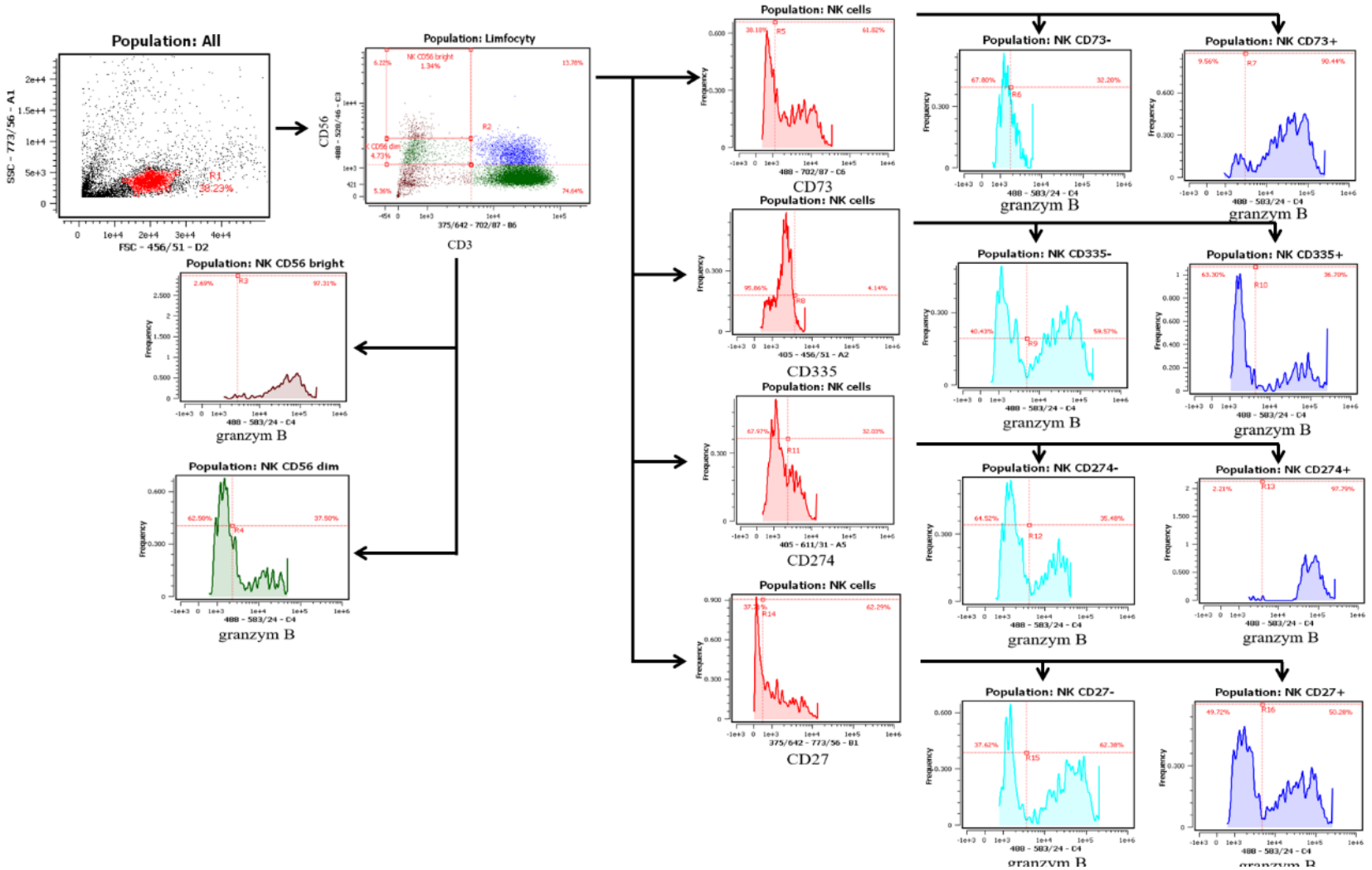
- PE Rat Anti-Human Il-13 (Klon JES10-5A2, BD Pharmingen)

Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 20 minut, w ciemności, w temperaturze pokojowej. Następnie każdą próbkę przepłukano w buforze Perm/Wash (Perm/Wash™ Buffer, BD Biosciences, 555028), poddano wirowaniu (500xg, 5 minut, temperatura pokojowa) i zawieszono w 100µl PBS (PBS; EURx, E0282-01). W ten sposób otrzymano próbki gotowe do analizy cytometrycznej.

3.4.5. Analiza cytometryczna

Analizę przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego Amnis® CellStream® (Cytek Biosciences). Do identyfikacji komórek użyto laserów: fioletowego o długości fali 405 nm, niebieskiego o długości fali 488 nm, oraz czerwonego o długości fali 642

nm. Za pomocą przedniego detektora światła rozproszonego (ang. forward scatter channel, FSC) i bocznego detektora światła rozproszonego (ang. side scatter channel, SSC) uzyskano informacje o względnej wielkości komórek (FSC) oraz ich ziarnistości (SSC). Analizę wyników przeprowadzono za pomocą oprogramowania Cell Stream Analyzer w wersji 1.5.17. Odnotowano odsetek poszczególnych subpopulacji komórek oraz medianę intensywności fluorescencji (ang. median fluorescence intensity, MFI). Strategię bramkowania na przykładzie granzymu B przedstawiono na Rycinie 9.



Rycina 9. Reprezentatywna analiza cytometryczna na przykładzie komórek pobranych od pacjenta ze stwardnieniem rozsianym i oceny ekspresji granzymu B

3.5. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wartości analizowanych zmiennych ilościowych przedstawiono przy pomocy wartości średniej, odchylenia standardowego, mediany, dolnego i górnego kwartyla oraz wartości minimalnych i maksymalnych. Sprawdzenie normalności rozkładu zmiennych w badanych grupach wykonano za pomocą testu normalności Shapiro-Wilk. Różnice w wynikach pomiędzy trzema grupami oceniano testem Kruskal-Wallis. Przyjęto poziom istotności $p<0,05$ wskazujący na istnienie istotnych statystycznie różnic lub zależności. Bazę danych i badania statystyczne przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie komputerowe Statistica 9.1 (StatSoft, Polska).

3.6. Zgoda Komisji Bioetycznej

Badania wykonano po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Izbie Lekarskiej w Rzeszowie zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Komisję (decyzja nr 85/2023/B).

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka grupy badanej

Do badania zakwalifikowano 35 pacjentów z rozpoznanym stwardnieniem rozsianym. W grupie badanej było 28 kobiet (80%) oraz 7 mężczyzn (20%). Wiek pacjentów w grupie badanej wynosił od 20 do 65 lat. Mediana dla wieku pacjentów wyniosła 41 lat. U 22 pacjentów rozpoznano rzutowo-remisyjną postać stwardnienia rozsianego (63%), u 13 postać pierwotnie postępującą stwardnienia rozsianego (37%).

W grupie pacjentów z rozpoznaną postacią rzutowo-remisyjną MS było 18 kobiet (82%) i 4 mężczyzn (18%) w wieku od 20 do 53 lat. Mediana dla wieku pacjentów w tej grupie wyniosła 33 lata.

W grupie pacjentów z rozpoznaną postacią pierwotnie postępującą MS było 10 kobiet (77%) i 3 mężczyzn (23%) w wieku od 40 do 65 lat. Mediana dla wieku pacjentów w tej grupie wyniosła 52 lata. U dwóch mężczyzn z tej grupy, z powodu błędu laboratoryjnego nie oznaczono markerów wewnątrzkomórkowych – ich wyniki poddano analizie uwzględniającej jedynie markery powierzchniowe komórek.

Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka grupy badanej

Badany parametr	**Liczba pacjentów (%)/ wiek pacjentów**
Płeć	
Kobiety (ogółem)	27 (77%)
Mężczyźni (ogółem)	8 (23%)
Mediana wieku (ogółem)	41 lat
Postać stwardnienia rozsianego	
Rzutowo-remisyjna	22 (63%)
Kobiety	18 (82%)
Mężczyźni	4 (18%)
Mediana wieku	33 lata
Pierwotnie postępująca	13 (37%)
Kobiety	10 (77%)
Mężczyźni	3 (23%)
Mediana wieku	52 lata

4.2. Charakterystyka grupy kontrolnej

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 15 zdrowych osób – 12 kobiet (80%) i 3 mężczyzn (20%) w wieku od 23 do 65 lat (mediana 40 lat). Na skutek awarii cytometru nie uzyskano danych z analizy 3 uczestników grupy. W skład grupy kontrolnej poddanej pełnej analizie ostatecznie weszło 12 zdrowych osób. Wśród nich 9 stanowiły kobiety (75%), a 3 mężczyźni (25%). Wiek uczestników grupy kontrolnej wynosił od 23 do 65 lat. Mediana dla wieku uczestników tej grupy wyniosła 41,5 roku.

Charakterystykę grupy kontrolnej przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka grupy kontrolnej

Badany parametr	Liczba pacjentów (%)/ wiek pacjentów (lata)
Płeć	
Kobiety	9 (75%)
Mężczyźni	3 (25%)
Wiek	
Mediana	41,5 roku

4.3. Analiza różnic w immunofenotypie komórek NK

Analizę danych rozpoczęto od porównania immunofenotypu komórek NK pomiędzy trzema grupami: pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS, pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS i zdrową kontrolą. Analiza ta miała na celu stwierdzenie, czy badane grupy różnią się w zakresie fenotypu subpopulacji komórek NK.

4.3.1. Porównanie odsetka komórek NK oraz głównych subpopulacji: $CD56^{bright}$ i $CD56^{dim}$

W Tabeli 6. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka populacji komórek NK i subpopulacji $CD56^{bright}$ i $CD56^{dim}$.

Tabela 6. Statystyki opisowe wartości odsetkowych [%] komórek NK oraz głównych subpopulacji: $CD56^{bright}$ i $CD56^{dim}$

Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NK cells [%]	**Kontrola**	7,47	5,13	2,15	19,33	6,02	3,72	9,90	H = 1,878 p = 0,391
	RR MS	6,89	3,39	1,46	15,55	5,68	4,72	9,49	
	PP MS	8,94	4,86	4,75	22,29	7,31	5,52	10,53	
NKCD56 bright [%]	**Kontrola**	0,92	0,77	0,15	2,33	0,59	0,28	1,60	H = 1,164 p = 0,559
	RR MS	1,00	0,83	0,05	2,89	0,73	0,40	1,46	
	PP MS	1,23	0,90	0,11	2,83	1,02	0,51	1,81	
NKCD56 dim [%]	**Kontrola**	6,51	4,63	1,90	17,66	5,05	3,11	8,79	H = 2,655 p = 0,265
	RR MS	6,02	2,94	1,65	13,22	5,27	3,95	7,05	
	PP MS	7,77	4,09	4,02	19,54	6,56	5,05	9,23	

Objaśnienia:

*M – średnia, Me – mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001*

Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie odsetka komórek NK w trzech porównywanych grupach. Nie wykazano również różnic w odsetku głównych subpopulacji komórek NK: $CD56^{bright}$ i $CD56^{dim}$.

4.3.2. Porównanie subpopulacji komórek NK charakteryzowanych na podstawie obecności lub braku markerów powierzchniowych CD335, CD27, CD274, CD73

W Tabeli 7. zestawiono statystyki opisowe odsetkowych wartości komórek NK, wykazujących ekspresję markerów powierzchniowych CD335, CD27, CD274 i CD73 (subpopulacja NK CD335+, NK CD27+, NK CD274+ i NK CD73+) oraz bez ekspresji powyższych markerów (subpopulacja NK CD335-, NK CD27-, NK CD274- i NK CD73-). Dla subpopulacji komórek NK CD335+, NK CD27+, NK CD274+ i NK CD73+ zestawiono również statystyki opisowe dla mediany intensywności fluorescencji. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 7. Statystyki opisowe wartości odsetkowych subpopulacji komórek NK CD335-, NK CD335+, NK CD27-, NK CD27+, NK CD274-, NK CD274+, NK CD73- i NK CD73+ oraz MFI subpopulacji komórek NK CD335+, NK CD27+, NK CD274+, NK CD73+ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

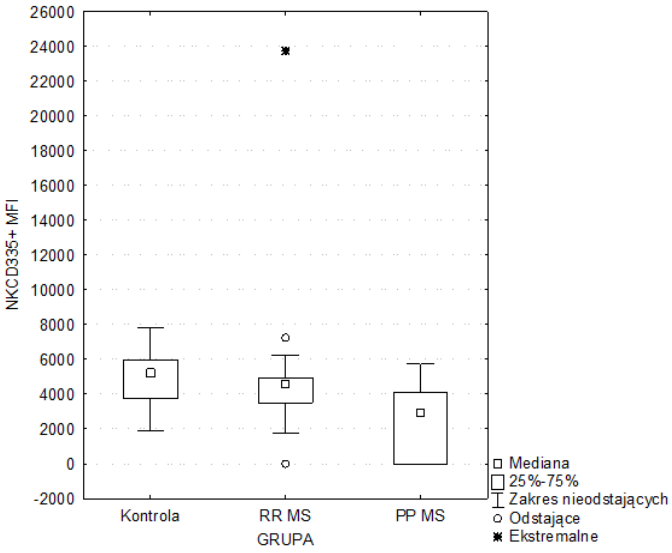
Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD335- [%]	Kontrola	91,88	16,97	38,43	99,65	97,12	94,13	98,01	H = 1,368
	RR MS	91,58	12,46	53,31	99,79	96,04	91,50	98,02	p = 0,505
	PP MS	90,08	14,34	58,88	100,00	97,85	81,31	99,68	
NKCD335+ [%]	Kontrola	8,13	16,97	0,35	61,57	2,89	1,99	5,88	H = 1,368
	RR MS	8,42	12,46	0,21	46,69	3,96	1,98	8,50	p = 0,505
	PP MS	9,92	14,34	0,00	41,12	2,15	0,32	18,69	
NKCD335+ MFI	Kontrola	4833,58	1802,42	1879,20	7857,40	5220,70	3742,80	5977,60	H = 8,858
	RR MS	5190,40	4454,13	0,00	23748,80	4566,90	3499,60	4951,60	p = 0,012
	PP MS	2553,32	1992,95	0,00	5778,30	2938,40	0,00	4081,20	K>PP* RR>PP*
NKCD27- [%]	Kontrola	43,40	16,47	17,59	67,02	40,89	30,69	57,37	H = 3,724
	RR MS	48,63	11,49	25,51	67,03	50,23	41,48	56,91	p = 0,155
	PP MS	54,68	9,64	36,32	68,72	57,89	52,25	60,36	
NKCD27+ [%]	Kontrola	56,60	16,47	32,98	82,41	59,12	42,64	69,32	H = 3,724
	RR MS	51,37	11,49	32,97	74,49	49,77	43,09	58,52	p = 0,155
	PP MS	45,32	9,64	31,28	63,68	42,11	39,64	47,75	
NKCD27+ MFI	Kontrola	2908,46	993,19	1818,20	5069,10	2724,45	2142,00	3233,80	H = 14,158
	RR MS	1913,28	502,40	1003,60	3013,50	1862,85	1542,30	2271,70	p = 0,001
	PP MS	1769,52	533,58	1054,00	3140,30	1637,00	1422,80	1964,50	K > RR** K > PP**
NKCD274- [%]	Kontrola	89,16	7,96	73,22	98,81	89,06	84,60	96,24	H = 3,672
	RR MS	92,80	8,54	59,15	99,39	95,97	91,16	97,07	p = 0,159
	PP MS	93,95	4,31	86,27	99,17	94,79	91,59	97,43	
NKCD274+ [%]	Kontrola	10,83	7,96	1,19	26,78	10,94	3,77	15,41	H = 3,672
	RR MS	7,20	8,54	0,61	40,85	4,03	2,93	8,84	p = 0,159
	PP MS	6,05	4,31	0,83	13,73	5,21	2,57	8,41	
NKCD274+ MFI	Kontrola	3610,46	2169,37	1315,00	9838,20	3476,95	2400,70	3930,45	H = 7,611
	RR MS	3400,40	1114,24	1433,50	6430,70	3331,10	2784,70	4087,90	p = 0,022
	PP MS	5362,18	2644,12	1514,40	10051,20	5032,00	3909,50	5720,00	PP>RR*
	Kontrola	89,10	4,74	83,05	97,38	88,39	85,16	93,22	H = 5,020

NKCD73- [%]	**RR MS**	93,45	4,68	80,58	99,72	93,31	90,46	97,30	p = 0,081
	PP MS	89,98	12,00	55,93	100,00	93,22	91,27	95,42	
NKCD73+ [%]	**Kontrola**	10,90	4,74	2,62	16,95	11,62	6,78	14,84	H = 5,020
	RR MS	6,55	4,68	0,28	19,42	6,70	2,70	9,54	p = 0,081
	PP MS	10,02	12,00	0,00	44,07	6,78	4,58	8,73	
NKCD73+ MFI	**Kontrola**	2337,52	2123,76	1343,60	8992,10	1747,80	1470,35	1903,30	H = 0,840
	RR MS	2436,91	1974,25	0,00	10268,90	1963,85	1645,30	2534,40	p = 0,657
	PP MS	2025,21	931,30	0,00	3497,70	2066,90	1666,50	2430,40	

Objaśnienia:

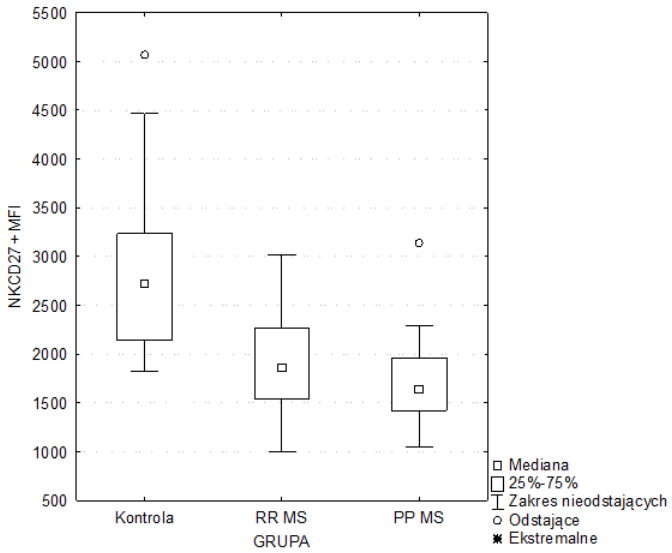
*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me – mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001*

Na podstawie wykonanych analiz nie wykazano istotnych różnic w odsetku subpopulacji komórek NK CD335-, NK CD335+, NK CD27-, NK CD27+, NK CD274-, NK CD274+, NK CD73- i NK CD73+ pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Nie stwierdzono również istotnych różnic w MFI subpopulacji komórek NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-, NK CD73- i NK CD73+ pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Stwierdzono statystycznie wyższe (p=0,012) MFI subpopulacji NK CD335+ w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS i w grupie pacjentów z RRMS względem grupy pacjentów z PPMS (Rycina 10).



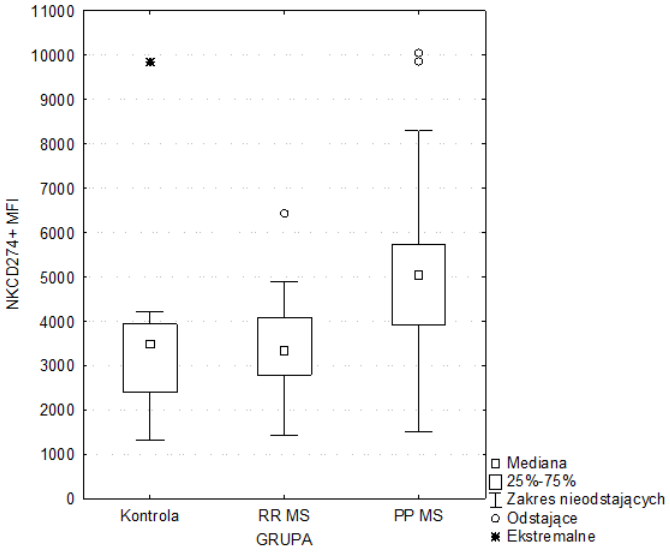
Rycina 10. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD335+ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotne statystycznie różnice w zakresie MFI subpopulacji komórek NK CD27+. W grupie kontrolnej mediana intensywności fluorescencji była istotnie wyższa (p=0,001) niż w grupach pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS i pierwotnie postępującą postacią MS (Rycina 11). Nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 11. Rozkład mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD27+ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie większą (p=0,022) wartość MFI subpopulacji komórek NK CD274+ w grupie pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS względem grupy pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS (Rycina 12). Nie stwierdzono różnic w zakresie tej populacji pomiędzy grupą kontrolną a grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 12. Rozkład mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD274+ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

4.4. Analiza różnic w zakresie wewnątrzkomórkowej zawartości enzymów cytolitycznych i cytokin w obrębie poszczególnych subpopulacji komórek NK

W drugim etapie analizy danych porównano odsetek i MFI subpopulacji komórek NK zawierających poszczególne enzymy lityczne (granzym B, granzym K, perforyna) i cytokiny (TGF-β, IFN-γ, IL-10, IL-4, IL-13) pomiędzy trzema grupami: pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS, pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS oraz kontrolą. Analiza ta miała na celu stwierdzenie czy badane grupy różnią się w zakresie funkcji komórek NK.

4.4.1. Analiza wewnątrzkomórkowej zawartości enzymów cytolitycznych

4.4.1.1. Granzym B

W Tabeli 8. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka i MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym B. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 8. Statystyki opisowe wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym B w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

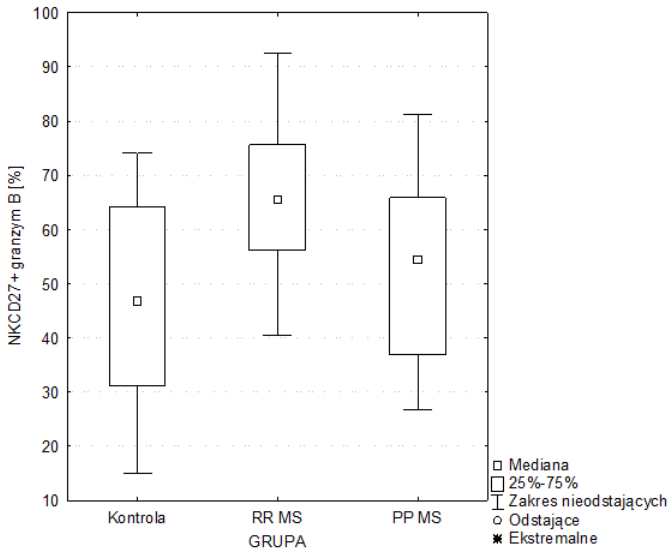
Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD56^{bright} granzymB [%]	**Kontrola**	92,40	8,70	74,07	100,00	96,30	87,77	97,87	H = 2,418 p = 0,298
	RR MS	97,21	2,12	93,14	100,00	97,64	95,96	98,90	
	PP MS	96,93	2,68	92,86	100,00	98,49	94,74	99,24	
NKCD56^{bright} granzymB MFI	**Kontrola**	90102,39	12761,37	59331,50	106355,10	93113,60	84390,20	97885,60	H = 1,457 p = 0,483
	RR MS	83986,20	31787,98	34583,50	158406,50	82702,70	65032,00	99739,60	
	PP MS	80609,42	22833,29	51832,40	110345,00	80541,30	56701,60	106573,40	
NKCD56^{dim} granzymB [%]	**Kontrola**	42,46	23,21	13,04	80,33	40,48	25,30	59,47	H = 3,798 p = 0,150
	RR MS	53,46	17,43	27,35	87,27	53,05	39,36	65,70	
	PP MS	57,08	19,43	17,31	82,46	54,63	47,78	73,57	
NKCD56^{dim} granzymB MFI	**Kontrola**	20162,48	6661,56	11782,90	32428,40	19719,70	14365,85	25048,00	H = 4,445 p = 0,108
	RR MS	24973,79	8753,50	7908,10	43130,50	25632,80	19259,30	29769,10	
	PP MS	18930,85	8451,64	4510,60	36389,70	16806,70	13795,90	24694,70	
NKCD335+ granzymB [%]	**Kontrola**	35,97	27,67	0,00	80,00	30,95	14,87	61,80	H = 3,401 p = 0,183
	RR MS	47,81	30,67	9,80	100,00	33,33	26,32	84,62	
	PP MS	28,40	32,47	0,00	100,00	16,67	0,00	57,14	
NKCD335+ granzymB MFI	**Kontrola**	24366,41	29487,88	0,00	78408,40	11827,40	0,00	47781,45	H = 1,582 p = 0,453
	RR MS	55951,61	88696,31	0,00	385372,70	25961,70	0,00	78243,30	
	PP MS	22247,25	31717,08	0,00	89149,10	3959,30	0,00	54499,60	
NKCD335- granzymB [%]	**Kontrola**	60,45	19,52	24,81	92,34	60,06	50,48	73,62	H = 5,488 p = 0,064
	RR MS	75,59	13,96	48,21	95,17	75,25	65,91	87,28	
	PP MS	68,78	16,54	35,73	88,04	67,25	59,99	85,29	
NKCD335- granzymB MFI	**Kontrola**	44929,13	20225,40	18658,80	80835,20	39820,05	31073,15	59324,40	H = 2,859
	RR MS	55740,91	26378,60	24036,20	122586,20	50507,50	37654,40	62063,30	p = 0,239

	PP MS	41726,00	23606,77	16275,50	82232,30	31796,00	18794,70	65363,20	
NKCD27+ granzymB [%]	**Kontrola**	46,77	18,86	14,95	74,14	46,83	31,16	64,19	H = 8,486
	RR MS	65,69	13,94	40,44	92,62	65,56	56,16	75,61	p = 0,014
	PP MS	51,84	18,24	26,84	81,20	54,43	36,84	65,85	K < RR*
NKCD27+ granzymB MFI	**Kontrola**	44018,05	21225,54	16534,20	82183,40	40407,30	28724,00	52956,00	H = 2,289
	RR MS	57370,82	31080,94	15216,50	136832,10	50761,15	38513,90	62966,10	p = 0,318
	PP MS	47199,40	21725,38	26103,00	82630,40	39815,20	28160,00	76026,50	
NK CD27- granzymB [%]	Kontrola	68,98	18,80	38,30	94,31	68,99	55,18	85,70	H = 2,762
	RR MS	79,76	13,41	50,86	95,59	83,52	69,68	91,67	p = 0,251
	PP MS	73,14	19,79	28,27	93,76	77,42	60,53	89,92	
NKCD274+ granzymB [%]	Kontrola	87,47	13,81	49,71	100,00	90,91	82,53	96,43	H = 3,865
	RR MS	95,97	4,55	79,17	99,45	97,64	93,64	98,89	p = 0,145
	PP MS	85,16	29,24	0,00	100,00	95,83	84,62	98,80	
NKCD274+ granzymB MFI	Kontrola	72380,37	24875,95	41244,20	126741,90	71719,60	51526,20	87818,15	H = 0,439
	RR MS	77040,49	24746,66	31169,40	140006,00	72838,00	62121,40	85514,30	p = 0,803
	PP MS	78509,88	50454,18	0,00	200390,40	62803,60	53281,80	94166,80	
NKCD274- granzymB [%]	Kontrola	39,13	21,83	12,14	70,21	34,24	20,13	59,03	H = 2,536
	RR MS	52,53	13,15	29,79	82,86	50,42	42,59	64,29	p = 0,281
	PP MS	49,83	19,08	16,29	79,74	52,63	36,76	63,79	
NKCD274- granzymB MFI	Kontrola	12667,27	7502,70	2178,90	27159,10	10545,90	7108,95	18431,85	H = 3,562
	RR MS	16028,40	6195,23	2536,50	25626,60	17729,75	13574,90	19996,60	p = 0,168
	PP MS	22204,05	16283,14	5741,10	64116,00	19871,00	11431,50	29392,80	
NKCD73+ granzymB [%]	Kontrola	82,91	14,99	52,08	97,88	87,24	73,74	95,36	H = 3,488
	RR MS	92,58	6,88	71,16	100,00	94,45	89,62	97,36	p = 0,175
	PP MS	86,34	19,71	35,64	100,00	94,77	74,07	98,67	
NKCD73+ granzymB MFI	Kontrola	50160,91	18893,46	24721,90	80835,20	46161,80	34947,15	65967,40	H = 1,107
	RR MS	60387,65	27300,36	25797,40	134306,80	54470,00	39916,70	71805,00	p = 0,575
	PP MS	55626,47	27221,44	27622,60	121129,10	45098,80	35945,80	75034,70	
NKCD73- granzymB [%]	Kontrola	14,93	11,66	0,00	41,67	15,31	5,49	21,07	H = 6,928
	RR MS	30,27	18,21	7,51	73,91	27,10	16,88	36,59	p = 0,031
	PP MS	28,74	16,94	0,00	48,18	35,00	14,23	40,00	K < RR*
NKCD73- granzymB MFI	Kontrola	3844,78	2108,19	0,00	7084,50	4304,40	3111,45	4986,80	H = 0,577
	RR MS	4796,33	2211,09	1610,80	10103,00	4452,80	3017,70	6223,80	p = 0,750
	PP MS	6533,85	6936,21	0,00	25908,20	4018,30	3520,50	7609,20	

Objaśnienia:

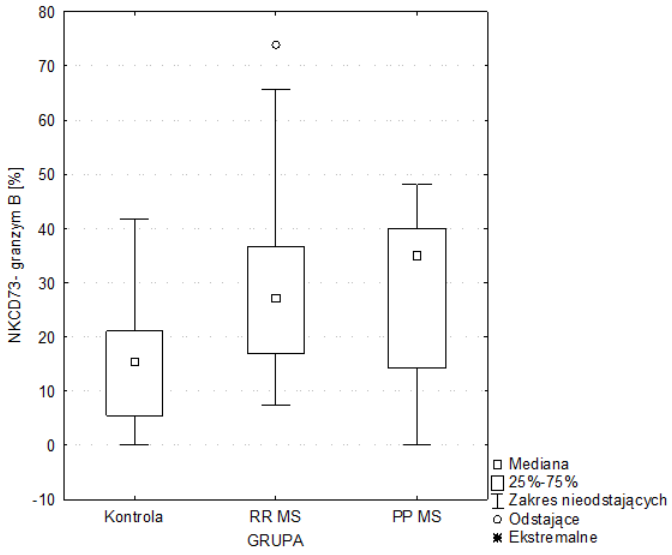
*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me – mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001, ~ na granicy istotności*

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka subpopulacji komórek NK CD56^{bright} , NK CD56^{dim} , NK CD335+, NK CD335-, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+ zawierających granzym B pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Wykazano istotnie większy (p=0,014) odsetek subpopulacji komórek NK CD27+ zawierającej granzym B w grupie pacjentów z RRMS względem grupy kontrolnej (Rycina 13). Nie stwierdzono różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą pacjentów z PPMS i grupą kontrolną oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 13. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27+ zawierającej granzym B w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Wykazano istotnie większy (p=0,031) odsetek subpopulacji komórek NK CD73- zawierającej granzym B w grupie pacjentów z RRMS względem grupy kontrolnej (Rycina 14). Nie stwierdzono różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą pacjentów z PPMS a grupą kontrolną oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 14. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD73- zawierającej granzym B w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym B pomiędzy analizowanymi trzema grupami.

4.4.1.2. Granzym K

W Tabeli 9. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka i MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym K. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 9. Statystyki opisowe wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym K w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD56^{bright} granzymK [%]	Kontrola	73,78	16,21	42,86	100,00	76,30	65,02	80,63	H = 7,563
	RR MS	54,54	20,41	14,06	97,27	56,38	39,67	70,00	p = 0,023
	PP MS	49,58	27,54	8,82	80,00	53,13	20,83	76,19	K > RR*
NKCD56^{bright} granzymK MFI	Kontrola	50074,41	29878,07	9217,90	105248,80	44734,25	28375,35	77943,30	H = 2,938
	RR MS	34789,10	28054,32	4166,60	98926,50	30096,60	8227,70	57978,20	p = 0,230
	PP MS	40959,93	33815,41	8999,80	103930,20	25775,20	18405,60	64853,90	
NKCD56^{dim} granzymK [%]	Kontrola	22,27	12,93	6,32	44,64	24,29	11,51	26,84	H = 2,682
	RR MS	22,89	15,28	3,61	56,25	18,25	11,84	33,02	p = 0,262
	PP MS	30,97	16,57	8,30	61,45	30,30	17,33	45,86	
NKCD56^{dim} granzymK MFI	Kontrola	8949,64	7165,88	2731,50	28978,10	6661,70	5316,70	9680,50	H = 6,019
	RR MS	8239,69	5906,19	2626,10	22964,50	5822,35	3464,30	10711,20	p = 0,049
	PP MS	4379,39	2267,46	2555,30	10611,90	3444,20	3064,80	4563,90	~K > PP
NKCD335+ granzymK [%]	Kontrola	33,48	34,23	0,00	100,00	18,81	11,96	47,22	H = 1,039
	RR MS	42,14	37,64	0,00	100,00	38,36	7,32	66,67	p = 0,595
	PP MS	30,39	38,06	0,00	100,00	14,29	0,00	50,00	
NKCD335+ granzymK MFI	Kontrola	11227,26	15382,04	0,00	52212,70	5941,85	0,00	15153,40	H = 0,355
	RR MS	17484,91	38350,00	0,00	155605,80	4685,45	0,00	7495,10	p = 0,837
	PP MS	7067,52	8529,87	0,00	21181,70	5601,70	0,00	16489,10	
NKCD335- granzymK [%]	Kontrola	28,68	15,51	8,37	62,92	27,36	16,85	35,04	H = 1,381
	RR MS	22,63	9,89	7,16	50,19	20,63	15,42	29,07	p = 0,501
	PP MS	26,37	15,27	6,15	55,20	24,44	13,68	35,85	
	Kontrola	18315,79	10126,15	4026,00	36958,80	16825,40	10547,80	24856,75	H = 2,846

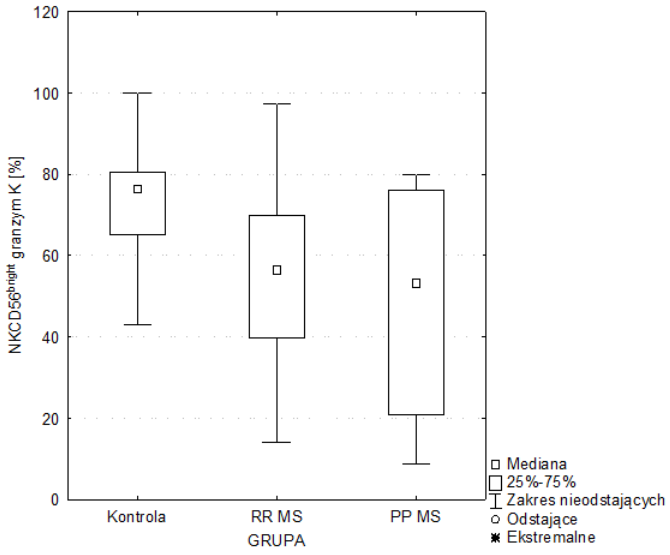
NKCD335-granzymK MFI	RR MS	13391,98	8240,75	2776,10	36442,20	11649,25	7105,10	16216,30	p = 0,241
	PP MS	12332,80	9161,81	2255,50	29868,60	10926,70	4548,60	18076,00	
NKCD27+ granzymK [%]	Kontrola	22,99	11,30	8,38	51,35	21,20	14,89	28,57	H = 0,264
	RR MS	22,83	14,06	4,91	58,62	20,48	12,24	28,24	p = 0,876
	PP MS	21,11	12,88	6,80	44,59	19,35	9,21	30,30	
NKCD27+ granzymK MFI	Kontrola	21272,73	14252,77	3468,10	45039,90	17738,00	9087,35	34004,80	H = 0,212
	RR MS	19764,51	15461,15	2769,70	57233,20	14813,35	7076,60	26274,00	p = 0,899
	PP MS	29614,78	33874,21	3493,10	118125,40	20591,50	6321,50	42600,90	
NK CD27-granzymK [%]	Kontrola	34,23	17,73	9,90	62,65	30,92	19,45	47,17	H = 6,023
	RR MS	24,34	13,96	8,06	61,54	20,52	13,00	34,15	p = 0,049
	PP MS	18,74	10,84	6,33	41,24	17,30	10,90	27,59	K > PP*
NKCD274+ granzymK [%]	Kontrola	71,89	25,96	35,95	100,00	74,34	45,77	100,00	H = 0,201
	RR MS	70,02	18,09	40,00	100,00	69,47	51,52	85,42	p = 0,905
	PP MS	66,79	31,84	0,00	100,00	76,92	50,00	90,60	
NKCD274+ granzymK MFI	Kontrola	54971,59	31348,99	16872,90	138707,70	48706,15	36056,20	65689,95	H = 2,895
	RR MS	63720,05	28161,61	8057,60	142568,10	60800,35	53814,10	79306,00	p = 0,235
	PP MS	59540,75	68268,22	0,00	228015,10	41861,00	11345,30	69328,50	
NKCD274-granzymK [%]	Kontrola	24,30	17,19	5,65	56,48	19,00	11,12	38,13	H = 0,513
	RR MS	26,78	20,18	6,14	71,35	17,65	12,30	40,02	p = 0,774
	PP MS	18,51	8,94	4,35	36,49	18,57	12,63	20,79	
NKCD274-granzymK MFI	Kontrola	7875,28	5470,20	2099,30	20419,20	6012,80	3610,10	11175,65	H = 0,308
	RR MS	7592,57	4633,00	1874,20	19066,50	6382,20	3975,50	10879,80	p = 0,857
	PP MS	8488,45	5049,95	2863,30	19407,40	7549,60	4167,20	11688,70	
NKCD73+ granzymK [%]	Kontrola	63,77	26,42	31,82	96,00	64,89	35,66	88,32	H = 0,173
	RR MS	65,91	19,50	26,67	99,00	60,92	55,44	87,88	p = 0,917
	PP MS	64,58	23,76	30,35	100,00	60,80	45,95	88,89	
	Kontrola	29335,48	12755,47	11332,20	51770,50	29815,90	18512,65	38399,35	H = 1,253

NKCD73+ granzymK MFI	RR MS	26067,92	17263,01	3004,80	77456,80	24748,55	11215,70	32444,20	p = 0,534
	PP MS	36871,09	41960,38	6149,40	135346,60	21838,30	8026,00	33497,40	
NKCD73- granzymK [%]	Kontrola	16,36	13,10	0,35	44,16	13,31	9,36	21,64	H = 3,098
	RR MS	28,22	21,12	2,74	74,88	20,03	11,86	38,87	p = 0,213
	PP MS	24,05	15,36	2,48	46,30	25,15	9,12	38,78	
NKCD73- granzymK MFI	Kontrola	3511,38	1737,46	0,00	7271,70	3204,10	2800,65	4227,70	H = 0,139
	RR MS	4008,52	1920,08	1679,20	9045,80	3325,00	2866,40	4293,30	p = 0,933
	PP MS	4311,26	3243,28	2378,80	13729,70	3334,50	2804,40	3818,40	

Objaśnienia:

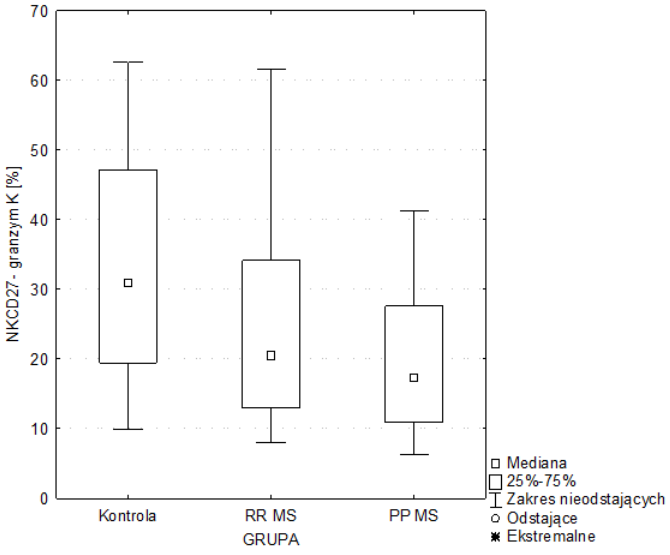
*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me –mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001, ~ na granicy istotności*

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka subpopulacji komórek NK $CD56^{dim}$, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym K pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,023) odsetek subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$ zawierającej granzym K w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z RRMS (Rycina 15). Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



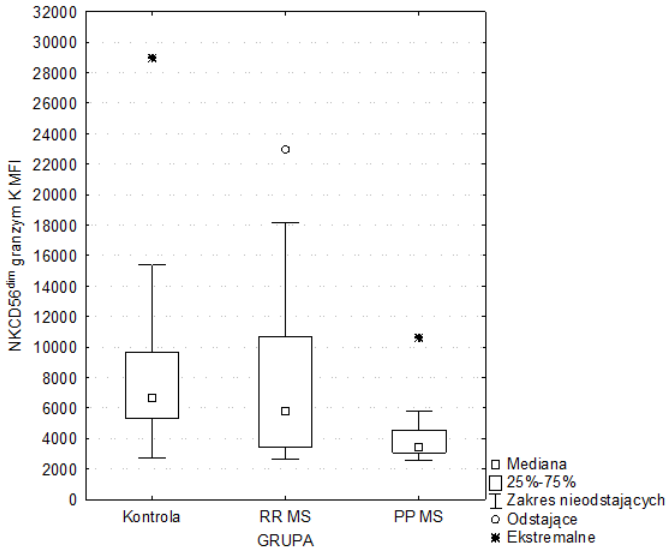
Rycina 15. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierającej granzym K w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,049) odsetek subpopulacji NK CD27- zawierającej granzym K w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z PPMS (Rycina 16). Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z RRMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 16. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierającej granzym K w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym K pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Stwierdzono wyższą (p=0,049) MFI subpopulacji NK CD56^{dim} zawierającej granzym K w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z PPMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 17). Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z RRMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 17. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD56^{dim} zawierającej granzym K w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

4.4.1.3. Perforyna

W Tabeli 10. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka i MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających perforynę. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 10. Statystyki opisowe wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright} , NK CD56^{dim} , NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających perforynę w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD56^{bright} perforyna [%]	Kontrola	76,78	22,98	12,00	98,08	85,05	70,21	89,39	H = 0,322 p = 0,851
	RR MS	82,18	15,39	33,33	98,58	84,58	76,19	94,74	
	PP MS	82,10	12,00	62,90	100,00	83,87	71,43	93,18	
NKCD56^{bright} perforyna MFI	Kontrola	32990,07	38833,52	4505,60	115538,60	13965,30	9878,60	50609,35	H = 1,662 p = 0,436
	RR MS	19493,45	33639,44	3818,90	165858,40	11623,35	8981,10	14386,40	
	PP MS	16176,12	16122,89	5489,70	62273,30	11045,50	7481,40	16632,20	
NKCD56^{dim} perforyna [%]	Kontrola	49,62	19,35	10,34	85,42	53,17	38,49	60,51	H = 3,218 p = 0,200
	RR MS	52,79	19,99	3,43	87,81	54,55	39,01	62,95	
	PP MS	62,17	21,84	18,05	87,98	71,17	47,11	79,45	
NKCD56^{dim} perforyna MFI	Kontrola	10010,98	4647,22	2409,60	21323,80	9244,95	7688,40	10935,75	H = 3,574 p = 0,168
	RR MS	9097,73	3054,31	4270,90	15458,40	8523,30	6749,70	11456,20	
	PP MS	7358,99	2081,81	4434,00	10849,80	7608,70	5515,50	8928,10	
NKCD335+ perforyna [%]	Kontrola	34,02	32,42	0,00	100,00	27,03	11,52	47,40	H = 0,102 p = 0,950
	RR MS	29,82	28,49	0,00	100,00	23,44	5,56	38,10	
	PP MS	32,98	35,17	0,00	100,00	22,22	11,43	37,85	
NKCD335+ perforyna MFI	Kontrola	10102,18	9349,35	0,00	26018,90	11870,80	0,00	17363,85	H = 1,956 p = 0,376
	RR MS	8310,35	10705,88	0,00	44224,20	5211,95	0,00	12564,30	
	PP MS	5815,18	7163,98	0,00	15063,00	0,00	0,00	14498,90	
NKCD335- perforyna [%]	Kontrola	54,14	18,00	19,82	75,10	57,51	39,50	67,62	H = 1,163 p = 0,559
	RR MS	60,20	21,71	7,06	93,21	63,85	48,80	73,09	
	PP MS	61,41	14,88	34,95	81,11	61,03	53,22	75,40	

NKCD335-	Kontrola	12531,37	9042,51	5874,80	36439,90	9784,90	7573,60	11433,55	H = 2,071
	RR MS	10078,41	3189,92	3846,70	17436,00	9903,95	7364,80	12599,60	
perforyna MFI	PP MS	8378,42	2625,90	3406,40	11980,80	8724,10	6678,90	10730,10	p = 0,355
NKCD27+	Kontrola	37,22	15,71	12,35	62,07	34,77	25,78	50,22	H = 5,222
	RR MS	50,90	18,07	6,45	80,94	56,10	40,00	61,73	
perforyna [%]	PP MS	41,89	18,06	10,53	63,72	49,06	32,13	56,32	p = 0,074
NKCD27+	Kontrola	11253,60	5526,68	5583,70	23043,40	9878,35	8080,70	11507,35	H = 0,367
	RR MS	9838,38	3341,18	2627,30	17025,30	9927,95	7503,10	12232,90	
perforyna MFI	PP MS	9266,41	2516,28	5830,00	14707,50	9076,70	7315,70	10490,10	p = 0,833
NK CD27-	Kontrola	61,69	23,80	24,66	87,01	69,74	39,66	81,64	H = 0,111
	RR MS	61,78	24,54	7,21	96,16	66,46	47,72	76,71	
perforyna [%]	PP MS	62,05	21,94	26,67	97,71	66,24	45,65	73,85	p = 0,946
NKCD274+	Kontrola	57,12	23,62	25,00	100,00	51,57	40,42	79,15	H = 1,064
	RR MS	64,26	23,58	17,65	97,77	68,09	42,31	86,51	
perforyna [%]	PP MS	62,72	22,02	25,00	100,00	52,78	50,00	80,00	p = 0,587
NKCD274+	Kontrola	40571,80	30325,28	14924,10	120739,20	29865,45	19121,90	48256,85	H = 0,869
	RR MS	36390,11	31567,57	0,00	139232,70	24906,85	13415,50	52138,00	
perforyna MFI	PP MS	29070,36	21609,54	0,00	68290,10	23861,70	16294,60	44508,50	p = 0,648
NKCD274-	Kontrola	45,82	17,80	26,41	74,24	44,02	27,77	59,46	H = 3,755
	RR MS	58,67	19,35	4,79	89,17	62,14	49,02	71,23	
perforyna [%]	PP MS	57,29	17,41	22,37	87,29	59,46	42,86	67,59	p = 0,153
NKCD274-	Kontrola	7916,83	2525,71	5587,20	12320,20	6760,05	6012,45	9838,15	H = 1,38
	RR MS	8983,93	2790,93	4270,90	15106,50	8428,70	6791,10	11228,90	
perforyna MFI	PP MS	8509,53	2328,29	4647,70	12002,50	8786,40	6449,20	10275,50	p = 0,502
NKCD73+	Kontrola	81,58	11,45	60,55	97,53	84,12	76,20	87,81	H = 0,133
	RR MS	80,69	19,02	11,11	98,44	83,73	78,57	92,59	
perforyna [%]	PP MS	80,13	21,01	26,11	100,00	85,32	76,19	96,97	p = 0,936

NKCD73+ perforyna MFI	Kontrola	16454,24	8997,89	8197,30	35034,90	14050,25	9565,50	20661,10	H = 0,633 p = 0,729
	RR MS	11985,37	3343,58	0,00	17774,30	12088,00	11327,60	13746,60	
	PP MS	19368,33	21069,87	6670,60	80170,80	11184,70	8979,70	19658,90	
NKCD73- perforyna [%]	Kontrola	31,00	19,03	4,61	66,67	31,81	14,36	43,70	H = 3,792 p = 0,150
	RR MS	42,38	23,96	3,91	89,62	47,37	24,10	59,72	
	PP MS	51,24	24,15	12,21	86,98	53,70	26,95	75,20	
NKCD73- perforyna MFI	Kontrola	4628,89	1578,79	2726,00	8727,20	4408,90	3631,05	4895,05	H = 1,329 p = 0,514
	RR MS	4773,26	1374,80	1998,80	7890,60	4948,90	3896,50	5736,80	
	PP MS	5739,58	2815,37	2768,50	12478,90	5083,40	3852,90	6957,40	

Objaśnienia:

*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me –mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001, ~ na granicy istotności*

Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie odsetka i MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim} , NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających perforynę pomiędzy trzema grupami.

4.4.2. Analiza wewnątrzkomórkowej zawartości cytokin

4.4.2.1. TGF-β

W Tabeli 11. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka i MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających TGF-β. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 11. Statystyki opisowe wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright} , NK CD56^{dim} , NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD56^{bright} TGF-β [%]	Kontrola	45,69	31,72	10,11	95,83	34,05	18,34	77,31	H = 4,767
	RR MS	26,70	23,09	0,00	76,92	16,84	10,00	42,75	p = 0,092
	PP MS	38,00	26,37	10,71	90,91	28,71	16,67	57,14	
NKCD56^{bright} TGF-β MFI	Kontrola	10351,98	10129,50	2818,80	31381,70	5325,40	4534,80	13181,25	H = 0,351
	RR MS	24678,18	54509,02	0,00	248250,90	5748,60	3798,50	24332,40	p = 0,839
	PP MS	13966,18	26063,29	0,00	90303,00	5406,70	3989,60	5991,50	
NKCD56^{dim} TGF-β [%]	Kontrola	32,95	20,92	0,49	63,16	37,12	16,71	48,62	H = 4,191
	RR MS	14,43	11,88	1,99	45,16	10,65	5,10	22,06	p = 0,123
	PP MS	31,49	36,43	1,55	93,26	10,48	4,82	80,00	
NKCD56^{dim} TGF-β MFI	Kontrola	6545,22	7632,52	0,00	29943,10	5122,75	3222,35	6233,40	H = 3,709
	RR MS	6711,16	2197,77	4048,20	11467,30	6168,15	5253,00	7633,20	p = 0,157
	PP MS	6700,60	2626,64	3543,40	11566,00	6264,90	4509,90	7464,40	
NKCD335+ TGF-β [%]	Kontrola	38,34	31,79	0,00	100,00	31,50	11,35	58,34	H = 11,869
	RR MS	12,91	23,32	0,00	100,00	0,71	0,00	15,38	p = 0,003
	PP MS	8,49	18,83	0,00	50,00	0,00	0,00	0,53	K > RR* K > PP**
NKCD335+ TGF-β MFI	Kontrola	15043,28	18487,04	0,00	65933,00	8782,50	4332,25	18824,55	H = 10,535
	RR MS	10627,70	18254,60	0,00	57451,50	0,00	0,00	7995,00	p = 0,005
	PP MS	614,89	2039,36	0,00	6763,80	0,00	0,00	0,00	K > PP**
NKCD335- TGF-β [%]	Kontrola	30,93	24,18	4,24	61,64	26,09	7,36	55,36	H = 2,557
	RR MS	18,38	17,27	1,97	67,06	15,56	4,30	22,94	p = 0,279
	PP MS	29,60	26,43	3,81	87,74	23,11	7,25	45,05	

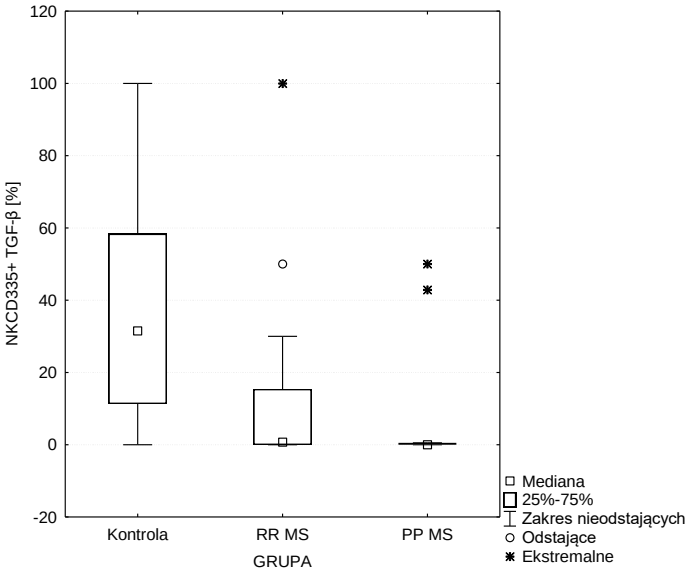
NKCD335-TGF-β MFI	Kontrola	6479,91	4007,13	2593,20	18094,00	5327,25	4558,55	7149,05	H = 0,519
	RR MS	7370,55	5538,47	3660,60	30652,60	5554,30	4963,10	8400,90	p = 0,771
	PP MS	6157,13	2669,08	2682,80	11704,10	5644,20	4527,70	6436,80	
NKCD27+ TGF-β [%]	Kontrola	36,98	21,87	7,02	72,50	39,51	17,23	55,18	H = 8,485
	RR MS	16,41	18,91	0,13	80,39	10,20	3,54	21,60	p = 0,014
	PP MS	24,35	25,17	2,70	68,25	14,29	4,86	49,08	K > RR*
NKCD27+ TGF-β MFI	Kontrola	5678,73	2677,02	2503,40	13521,20	5128,40	4755,80	5757,40	H = 0,830
	RR MS	7086,85	5830,19	0,00	31012,90	6088,25	4779,20	7297,60	p = 0,660
	PP MS	6619,85	3148,51	4083,90	14234,40	5182,20	4699,00	7980,90	
NKCD27-TGF-β [%]	Kontrola	33,96	24,57	4,77	73,76	28,39	12,64	53,14	H = 7,686
	RR MS	12,45	9,21	2,70	45,11	10,80	5,81	16,20	p = 0,021
	PP MS	24,54	23,68	5,45	76,67	14,33	6,92	43,70	K > RR*
NKCD274+ TGF-β [%]	Kontrola	42,11	34,18	0,00	100,00	37,64	13,99	66,67	H = 1,108
	RR MS	51,13	26,43	0,00	100,00	44,80	33,33	71,05	p = 0,575
	PP MS	42,63	32,12	0,00	82,78	60,00	9,52	67,39	
NKCD274+ TGF-β MFI	Kontrola	26623,63	32997,04	0,00	110648,50	8739,75	6699,40	41944,10	H = 1,385
	RR MS	23451,06	39369,85	0,00	157318,50	5826,60	4662,10	28966,80	p = 0,500
	PP MS	32805,04	49070,17	0,00	162581,60	5704,50	4939,00	52716,80	
NKCD274-TGF-β [%]	Kontrola	41,61	33,91	0,25	88,24	40,18	5,84	75,87	H = 3,672
	RR MS	23,93	20,02	1,42	71,05	20,89	8,66	37,50	p = 0,160
	PP MS	16,59	16,00	0,40	44,33	10,39	1,89	27,54	
NKCD274-TGF-β MFI	Kontrola	4669,08	2578,66	0,00	9276,00	5194,55	2792,90	6179,05	H = 7,345
	RR MS	5645,39	2191,63	2616,20	10307,60	5432,50	3856,00	6687,20	p = 0,025
	PP MS	7588,80	3061,26	4619,40	14199,20	6057,20	5720,80	10403,20	K < PP*
NKCD73+ TGF-β [%]	Kontrola	51,04	29,44	4,90	89,23	50,48	30,75	81,75	H = 2,259
	RR MS	43,54	28,43	0,00	100,00	40,50	27,47	62,96	p = 0,323
	PP MS	60,47	37,73	2,86	100,00	71,86	9,09	95,00	

NKCD73+ TGF-β MFI	Kontrola	9932,58	6815,25	4542,10	29370,70	8104,00	5961,25	10572,15	H = 1,789
	RR MS	14652,31	12187,70	0,00	42658,20	10086,65	7395,70	13930,60	p = 0,409
	PP MS	34452,60	48351,18	0,00	141928,10	10213,90	5454,60	55128,30	
NKCD73- TGF-β [%]	Kontrola	32,98	24,01	0,00	75,00	36,89	12,15	50,93	H = 2,433
	RR MS	18,20	23,30	0,24	79,94	10,26	1,81	21,05	p = 0,296
	PP MS	28,72	30,69	0,55	86,90	12,77	2,04	53,64	
NKCD73- TGF-β MFI	Kontrola	3117,92	1681,03	0,00	5111,70	3638,80	2338,35	4098,55	H = 4,471
	RR MS	4205,51	2061,71	0,00	6772,30	4523,00	3559,40	5892,50	p = 0,107
	PP MS	4714,44	1465,84	3111,80	7318,50	4352,10	3732,20	5483,80	

Objaśnienia:

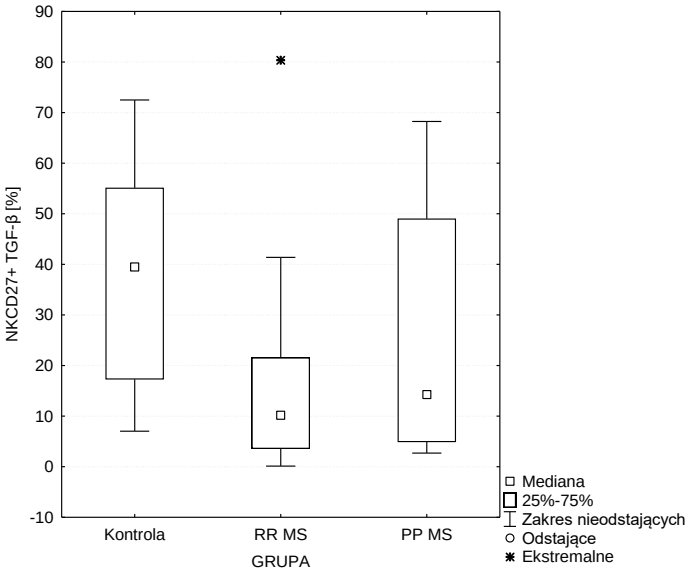
*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me –mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001, ~ na granicy istotności*

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających TGF-β pomiędzy trzema grupami. Analiza statystyczna wykazała istotnie większy (p=0,003) odsetek subpopulacji komórek NK CD335+ zawierającej TGF-β w grupie kontrolnej niż w grupach pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią MS (Rycina 18). Nie stwierdzono różnic w zakresie tej populacji pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



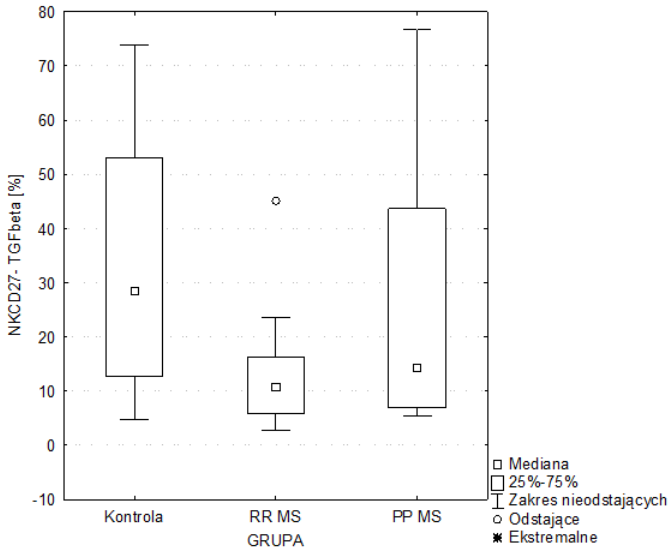
Rycina 18. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono, że odsetek komórek NK CD27+ zawierających TGF-β był istotnie wyższy (p=0,014) w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS (Rycina 19). Nie stwierdzono różnic w zakresie tej populacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



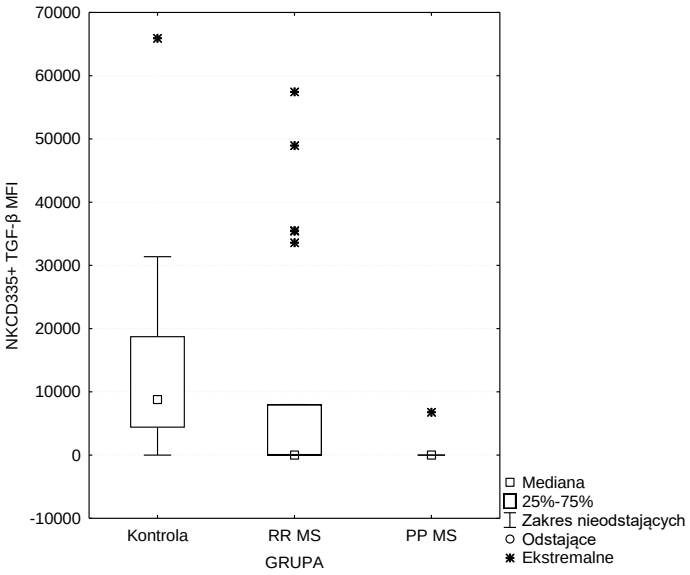
Rycina 19. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27+ zawierajacych TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono, że odsetek komórek NK CD27- zawierających TGF-β był istotnie wyższy (p=0,021) w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS (Rycina 20). Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka tej populacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



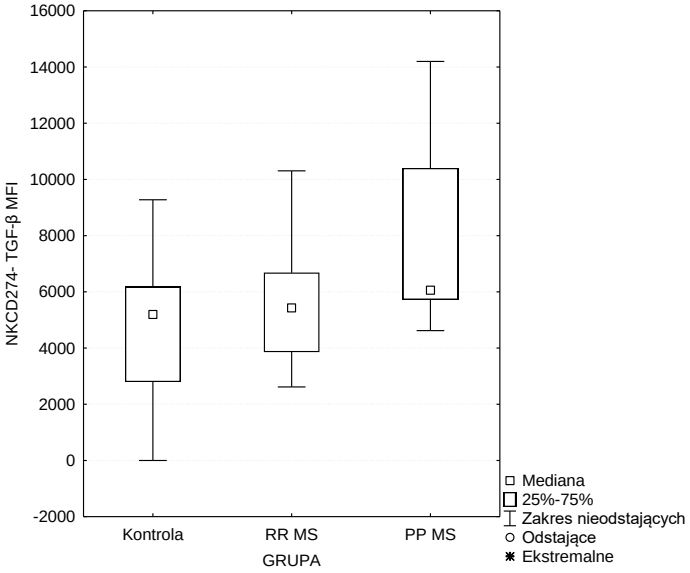
Rycina 20. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD73+, NK CD73- zawierających TGF-β pomiędzy trzema grupami. Stwierdzono istotnie większe MFI subpopulacji NK CD335+ w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (Rycina 21). Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI tej populacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z RRMS oraz grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 21. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK 335+ zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie większą (p=0,025) medianę intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD274- zawierających TGF-β w grupie pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS w porównaniu do kontroli (Rycina 22). Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI tej populacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z RRMS oraz grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 22. Rozkład mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD274- zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną

postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

4.4.2.2. IFN-γ

W Tabeli 12. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka i MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IFN-γ. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 12. Rozkład wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD56^{bright} IFN-γ [%]	Kontrola	55,01	21,50	19,43	86,67	54,17	39,12	71,34	H = 12,301
	RR MS	25,75	20,09	0,00	76,00	20,71	12,30	36,00	p = 0,002
	PP MS	28,36	21,69	5,56	70,83	22,22	10,95	40,00	K > RR**
									K > PP*
NKCD56^{bright} IFN-γ MFI	Kontrola	41790,81	25919,68	4943,10	87277,10	37727,40	24734,70	57285,70	H = 4,512
	RR MS	51659,15	32399,10	0,00	106330,90	51864,70	25888,00	80780,30	p = 0,105
	PP MS	27365,46	23525,56	0,00	74308,90	19114,10	6101,20	46684,10	
NKCD56^{dim} IFN-γ [%]	Kontrola	13,85	8,89	2,51	31,91	11,35	9,69	18,17	H = 3,971
	RR MS	7,84	4,58	3,35	22,41	6,34	4,82	8,28	p = 0,137
	PP MS	13,83	15,95	2,38	57,97	10,00	3,45	18,13	
NKCD56^{dim} IFN-γ MFI	Kontrola	17908,84	8896,46	4524,30	33034,30	16436,80	13290,65	24580,20	H = 3,933
	RR MS	16603,07	5346,55	5212,60	28561,80	17602,35	14217,40	19111,20	p = 0,140
	PP MS	12301,43	8368,05	2365,30	28245,20	9383,10	5415,80	16975,10	
	Kontrola	21,26	28,34	0,00	80,00	8,74	2,72	30,36	H = 6,721

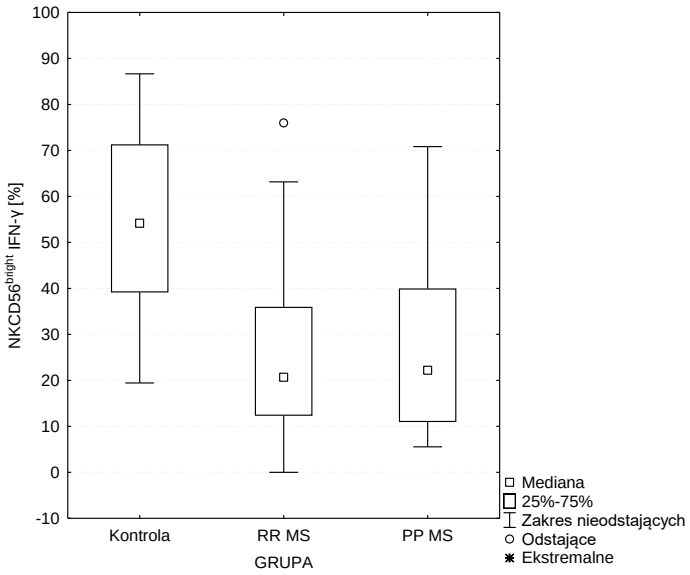
NKCD335+ IFN-γ [%]	RR MS	4,46	8,13	0,00	33,33	0,00	0,00	7,41	p = 0,035
	PP MS	18,18	40,45	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	~K > PP
NKCD335+ IFN-γ MFI	Kontrola	9880,03	13163,44	0,00	36591,40	3631,95	0,00	20817,95	H = 5,723
	RR MS	15019,63	47361,90	0,00	221193,80	0,00	0,00	2872,70	p = 0,057
	PP MS	1286,80	4267,83	0,00	14154,80	0,00	0,00	0,00	
NKCD335- IFN-γ [%]	Kontrola	25,31	20,51	4,53	69,87	17,97	11,63	35,02	H = 7,243
	RR MS	10,76	5,16	3,57	22,74	9,83	7,44	12,24	p = 0,027
	PP MS	11,05	5,32	3,61	20,56	10,64	5,56	14,10	K > RR*
NKCD335- IFN-γ MFI	Kontrola	22454,14	14036,08	4524,30	50524,60	20746,85	13520,65	27390,50	H = 3,553
	RR MS	26558,19	13814,07	2920,10	53682,10	23740,15	15978,60	33261,00	p = 0,169
	PP MS	17716,25	10033,07	5636,20	35898,00	16185,10	8706,40	25093,50	
NKCD27+ IFN-γ [%]	Kontrola	11,35	6,78	2,86	25,37	12,05	5,47	15,55	H = 4,477
	RR MS	7,04	6,76	0,00	26,71	4,88	2,89	8,55	p = 0,107
	PP MS	8,19	6,68	0,71	19,35	10,34	1,59	13,45	
NKCD27+ IFN-γ MFI	Kontrola	36521,89	23243,63	2718,20	74603,10	32922,40	18975,20	53698,15	H = 1,083
	RR MS	29399,50	14738,00	0,00	61943,00	30236,10	19578,50	38984,90	p = 0,582
	PP MS	25775,21	21639,08	0,00	62886,00	28651,60	5882,10	38338,60	
NKCD27- IFN-γ [%]	Kontrola	30,04	12,30	11,73	50,29	29,87	21,54	38,97	H = 16,547
	RR MS	12,44	6,60	4,17	32,66	11,72	7,18	15,50	p<0,001
	PP MS	11,72	6,96	2,08	27,27	11,72	7,57	14,44	K > RR*** K > PP**
NKCD274+ IFN-γ [%]	Kontrola	58,93	26,97	27,78	100,00	55,00	35,13	83,41	H = 2,352
	RR MS	56,74	22,21	9,52	87,50	64,15	42,86	73,11	p = 0,309
	PP MS	44,05	27,72	0,00	100,00	42,86	20,00	54,55	
NKCD274+ IFN-γ MFI	Kontrola	55684,06	32082,61	8852,30	128350,30	52757,00	33700,20	67022,05	H = 0,500
	RR MS	58132,03	26773,08	6609,80	114860,00	54656,15	46465,50	72360,10	p = 0,779
	PP MS	56291,70	58644,80	0,00	209178,30	51618,50	0,00	70133,00	

NKCD274-IFN-γ [%]	Kontrola	13,97	8,71	1,97	35,19	12,45	9,27	18,37	H = 7,348
	RR MS	6,61	4,21	1,36	16,05	5,66	3,72	9,63	p = 0,025
	PP MS	8,07	5,04	2,38	14,94	7,03	2,79	13,46	K > RR*
NKCD274-IFN-γ MFI	Kontrola	9347,58	6380,84	2025,30	19973,50	7583,85	4123,35	14751,60	H = 4,77
	RR MS	14240,58	6219,36	2515,00	26803,20	14486,90	9938,30	17966,40	p = 0,092
	PP MS	15456,05	7731,55	4299,10	34484,10	14237,90	12918,50	16185,10	
NKCD73+ IFN-γ [%]	Kontrola	62,72	21,89	28,13	95,65	65,60	41,43	80,28	H = 1,800
	RR MS	59,68	23,35	27,78	100,00	55,81	41,18	75,93	p = 0,407
	PP MS	46,67	34,70	0,00	100,00	46,85	17,17	72,73	
NKCD73+ IFN-γ MFI	Kontrola	28043,89	13426,79	6348,30	50376,30	27760,95	22489,75	37217,00	H = 1,596
	RR MS	31473,24	11196,38	9467,30	53859,40	29310,95	24674,70	36786,00	p = 0,450
	PP MS	27774,53	21558,64	0,00	82848,90	27743,30	15929,20	35898,00	
NKCD73-IFN-γ [%]	Kontrola	3,35	3,58	0,00	9,84	1,73	0,07	6,87	H = 1,939
	RR MS	4,80	8,20	0,00	38,42	2,20	0,65	6,16	p = 0,379
	PP MS	7,63	7,11	0,00	21,48	7,89	0,35	11,83	
NKCD73-IFN-γ MFI	Kontrola	2560,12	2544,44	0,00	7143,10	2676,20	0,00	4631,35	H = 1,645
	RR MS	3592,47	2840,64	0,00	11642,20	3759,30	2086,20	5264,90	p = 0,439
	PP MS	4695,42	4732,07	0,00	17644,50	4088,30	2226,50	5034,50	

Objaśnienia:

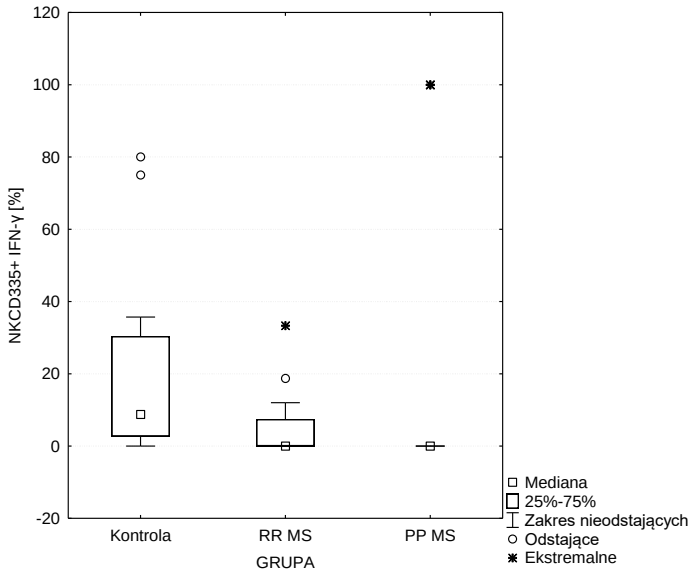
*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me –mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001, ~ na granicy istotności*

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka subpopulacji komórek NK CD56^{dim}, NK CD27+, NK CD274+, NK CD73+, NK CD73- zawierających IFN-γ pomiędzy trzema grupami. Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,002) odsetek subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej niż w grupach pacjentów z RRMS i PPMS (Rycina 23). Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka tej subpopulacji pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



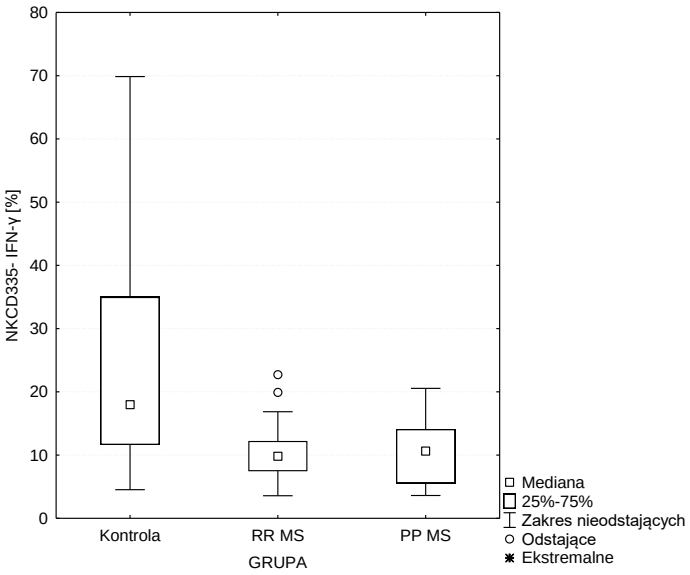
Rycina 23. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono wyższy (p=0,035) odsetek subpopulacji komórek NK CD335+ zawierającej IFN-γ w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z RRMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 24). Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



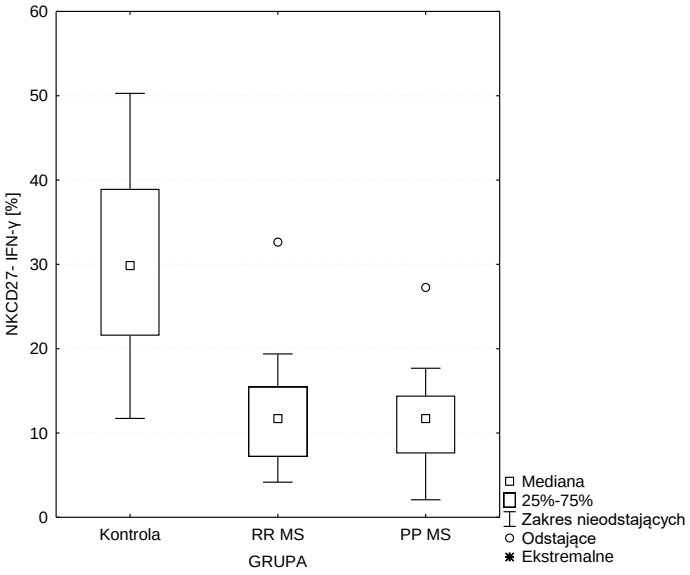
Rycina 24. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,027) odsetek subpopulacji komórek NK CD335- zawierającej IFN-γ w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z RRMS (Rycina 25). Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



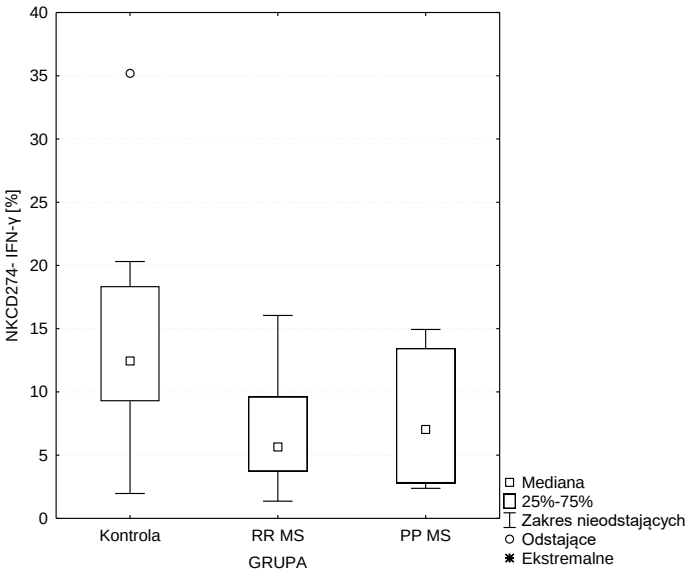
Rycina 25. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335- zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie wyższy ($p<0,001$) odsetek subpopulacji komórek NK CD27- zawierającej IFN-γ w grupie kontrolnej niż w grupach pacjentów z RRMS i PPMS (Rycina 26). Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka tej subpopulacji pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 26. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,025) odsetek subpopulacji komórek NK CD274- zawierającej IFN-γ w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z RRMS (Rycina 27). Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 27. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD274- zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IFN-γ pomiędzy trzema analizowanymi grupami.

4.4.2.3. IL-10

W Tabeli 13. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka i MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-10. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 13. Statystyki opisowe dla wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright} , NK CD56^{dim} , NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD56^{bright} IL10 [%]	Kontrola	11,74	13,13	0,00	45,45	9,13	1,77	14,84	H = 8,066
	RR MS	2,22	3,79	0,00	13,89	0,26	0,00	2,36	p = 0,018
	PP MS	4,12	5,64	0,00	16,67	0,00	0,00	6,67	K > RR*
NKCD56^{bright} IL10 MFI	Kontrola	2948,80	2912,87	0,00	7115,10	3026,25	0,00	5815,30	H = 8,702
	RR MS	932,98	2661,88	0,00	10766,60	0,00	0,00	0,00	p = 0,013
	PP MS	738,76	2450,20	0,00	8126,40	0,00	0,00	0,00	~K>RR
NKCD56^{dim} IL10 [%]	Kontrola	0,48	1,10	0,00	3,90	0,10	0,00	0,34	H = 0,532
	RR MS	0,31	0,53	0,00	2,00	0,08	0,00	0,33	p = 0,766
	PP MS	1,10	1,58	0,00	4,58	0,00	0,00	2,17	
NKCD56^{dim} IL10 MFI	Kontrola	2702,75	4989,11	0,00	15060,10	0,00	0,00	3600,00	H = 3,277
	RR MS	1028,00	2691,92	0,00	8969,20	0,00	0,00	0,00	p = 0,194
	PP MS	2462,58	4661,77	0,00	15791,60	0,00	0,00	2823,40	
NKCD335+ IL10 [%]	Kontrola	12,82	21,29	0,00	60,00	4,63	1,05	9,40	H = 7,888
	RR MS	6,60	21,61	0,00	100,00	0,00	0,00	1,65	p = 0,019
	PP MS	7,55	16,01	0,00	50,00	0,00	0,00	8,00	K > RR*
NKCD335+ IL10 MFI	Kontrola	2594,90	3282,30	0,00	8452,60	870,55	0,00	6004,30	H = 11,337
	RR MS	286,41	1343,40	0,00	6301,10	0,00	0,00	0,00	p = 0,004
	PP MS	582,86	1933,14	0,00	6411,50	0,00	0,00	0,00	~K > RR
NKCD335- IL10 [%]	Kontrola	1,02	1,08	0,00	3,05	0,63	0,08	1,70	H = 1,246
	RR MS	0,74	1,48	0,00	6,53	0,21	0,00	0,55	p = 0,536
	PP MS	1,87	3,36	0,00	11,32	0,52	0,00	2,50	

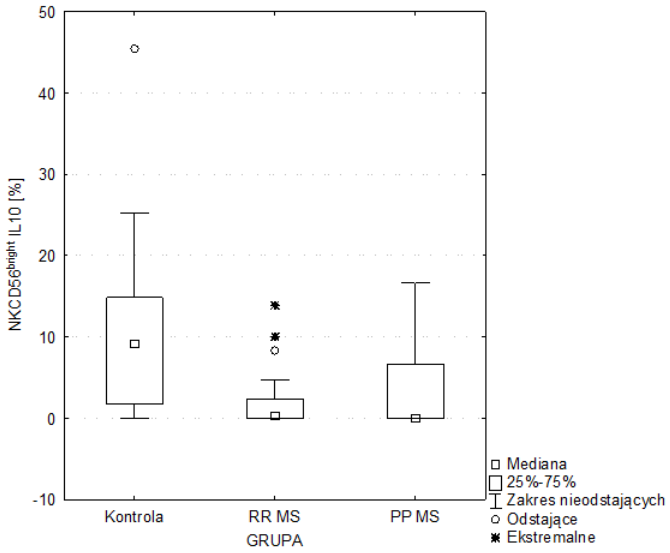
NKCD335-	Kontrola	5323,59	5281,11	0,00	15060,10	4050,20	0,00	9412,65	H = 4,239
	RR MS	2829,55	6017,95	0,00	24367,80	0,00	0,00	2678,00	
IL10 MFI	PP MS	4514,75	6326,49	0,00	19796,90	2297,00	0,00	8867,60	p = 0,120
NKCD27+	Kontrola	1,34	1,41	0,00	4,26	0,76	0,22	2,60	H = 5,895
	RR MS	0,55	1,32	0,00	6,02	0,00	0,00	0,49	
IL10 [%]	PP MS	2,06	2,52	0,00	6,25	0,52	0,00	4,35	p = 0,053
NKCD27+	Kontrola	5609,39	11164,33	0,00	39398,30	953,95	0,00	5647,90	H = 6,240
	RR MS	986,53	2891,28	0,00	10766,60	0,00	0,00	0,00	p = 0,044
IL10 MFI	PP MS	6959,69	9565,36	0,00	28431,50	0,00	0,00	13271,80	~RR < PP
NKCD27-	Kontrola	4,32	4,95	0,00	15,63	2,07	1,19	6,93	H = 8,366
	RR MS	0,81	1,15	0,00	4,62	0,59	0,00	0,79	p = 0,015
IL10 [%]	PP MS	1,88	3,21	0,00	10,87	0,38	0,00	2,70	K > RR*
NKCD274+	Kontrola	19,84	28,57	0,00	87,50	2,73	0,95	40,00	H = 1,220
	RR MS	9,98	15,12	0,00	62,50	5,07	0,00	12,50	
IL10 [%]	PP MS	9,23	13,42	0,00	40,00	0,00	0,00	22,22	p = 0,543
NKCD274+	Kontrola	2470,45	4333,72	0,00	12562,80	0,00	0,00	3787,85	H = 0,577
	RR MS	5965,92	16863,94	0,00	74424,70	0,00	0,00	3239,20	
IL10 MFI	PP MS	9795,08	17773,58	0,00	55259,80	0,00	0,00	17643,10	p = 0,749
NKCD274-	Kontrola	1,83	2,03	0,00	6,84	1,51	0,26	2,53	H = 5,140
	RR MS	0,49	0,66	0,00	2,38	0,21	0,00	0,63	
IL10 [%]	PP MS	1,29	1,66	0,00	4,08	0,00	0,00	3,09	p = 0,077
NKCD274-	Kontrola	4020,96	4235,86	0,00	11664,70	2349,65	0,00	6732,85	H = 2,886
	RR MS	2086,67	3620,56	0,00	10706,20	0,00	0,00	3140,80	
IL10 MFI	PP MS	3144,26	5006,80	0,00	12560,90	0,00	0,00	8867,60	p = 0,236
NKCD73+	Kontrola	12,16	17,36	0,00	58,82	6,73	3,79	9,17	H = 0,975
	RR MS	9,28	12,55	0,00	50,00	4,01	1,52	12,50	
IL10 [%]	PP MS	16,15	31,46	0,00	100,00	1,01	0,00	11,11	p = 0,614

NKCD73+ IL10 MFI	Kontrola	3687,98	3782,33	0,00	10585,80	3667,30	0,00	6308,85	H = 0,061 p = 0,970
	RR MS	17975,92	43528,07	0,00	191154,90	0,00	0,00	10374,10	
	PP MS	8152,92	16567,94	0,00	55259,80	0,00	0,00	13271,80	
NKCD73- IL10 [%]	Kontrola	0,67	0,77	0,00	2,38	0,39	0,08	1,20	H = 0,130 p = 0,937
	RR MS	1,37	2,45	0,00	10,85	0,62	0,00	1,55	
	PP MS	1,57	2,39	0,00	7,84	0,00	0,00	2,50	
NKCD73- IL10 MFI	Kontrola	1497,62	2366,97	0,00	6741,60	0,00	0,00	3392,10	H = 0,142 p = 0,932
	RR MS	1638,20	2213,99	0,00	8561,20	0,00	0,00	3230,30	
	PP MS	2194,95	3373,51	0,00	10848,20	0,00	0,00	3140,80	

Objaśnienia:

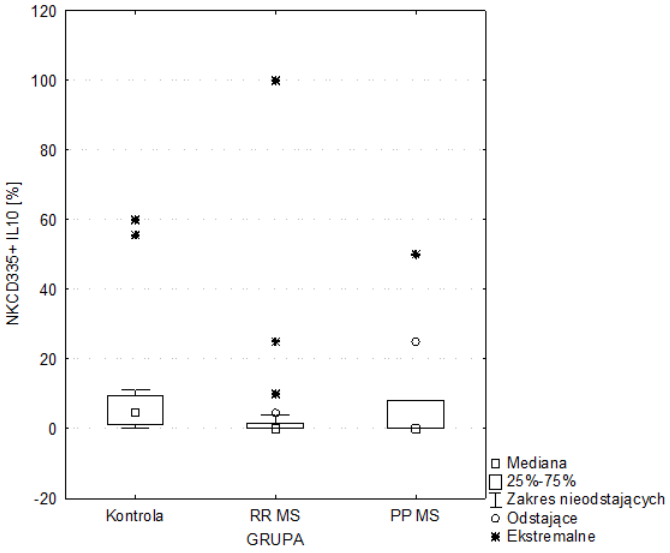
*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me –mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001, ~ na granicy istotności*

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka subpopulacji komórek NK $CD56^{dim}$, NK CD335-, NK CD27+, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-10 pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,018) odsetek subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (Rycina 28). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



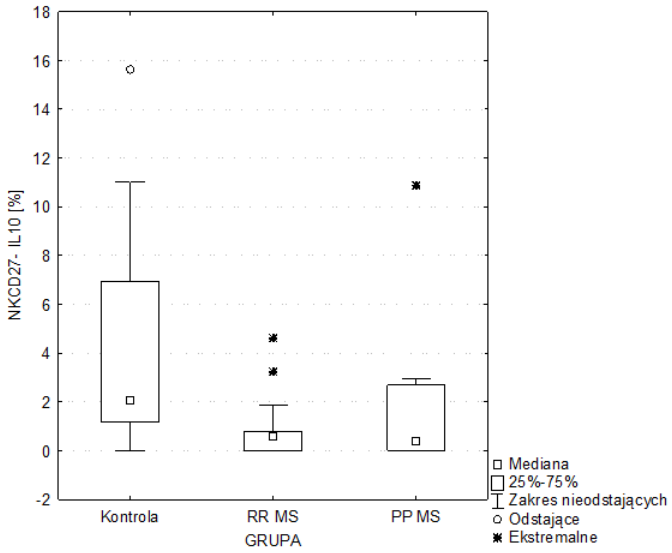
Rycina 28. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,019) odsetek subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (Rycina 29). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



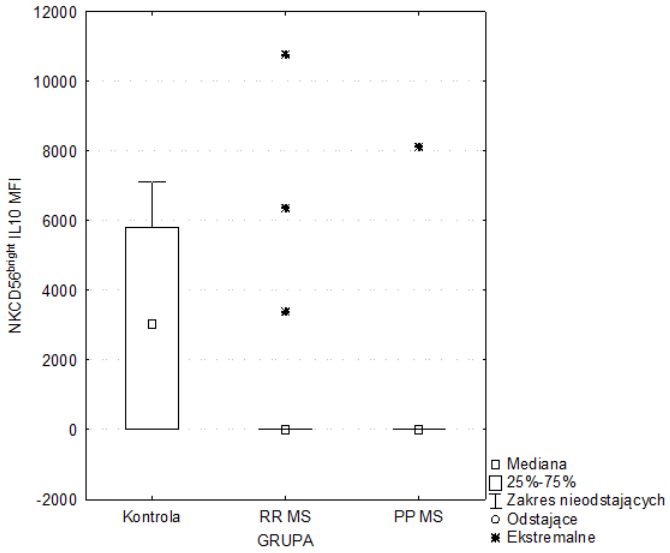
Rycina 29. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,015) odsetek subpopulacji komórek NK CD27- zawierających IL-10 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (Rycina 30). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



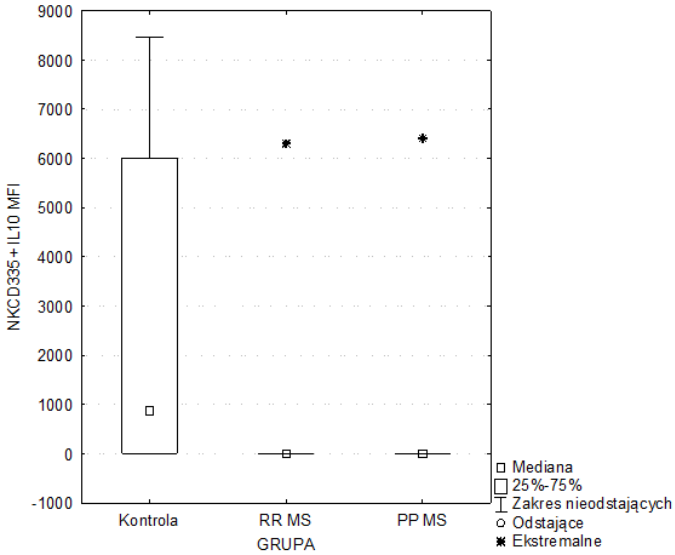
Rycina 30. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{dim}$, NK CD335-, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-10 pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Stwierdzono wyższe (p=0,013) MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 31). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



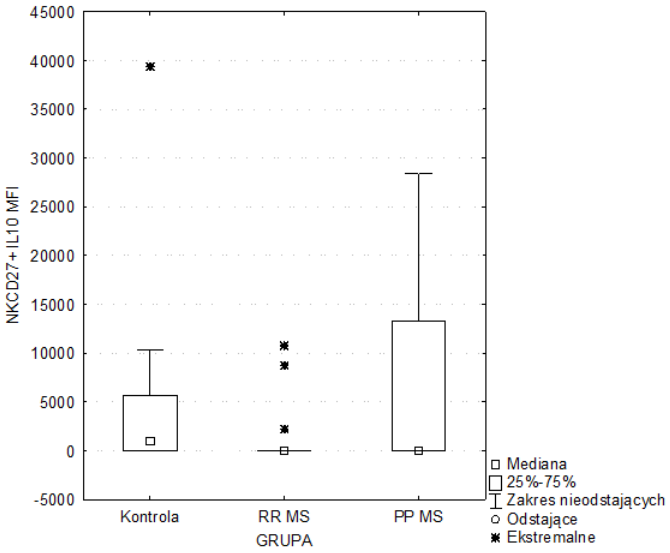
Rycina 31. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono wyższe (p=0,004) MFI subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 32). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 32. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono wyższe (p=0,44) MFI subpopulacji komórek NK CD27+ zawierającej IL-10 w grupie pacjentów z PPMS w porównaniu do pacjentów z RRMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 33). Nie stwierdzono różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 33. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD27+ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

4.4.2.4. IL-4

W Tabeli 14. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka i MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-4. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 14. Statystyki opisowe dla wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright} , NK CD56^{dim} , NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD56^{bright} IL4 [%]	Kontrola	6,46	6,62	0,00	15,38	5,08	0,00	13,40	H = 2,418
	RR MS	4,63	8,88	0,00	33,33	0,89	0,00	5,02	p = 0,298
	PP MS	4,25	8,15	0,00	25,00	0,00	0,00	10,00	
NKCD56^{bright} IL4 MFI	Kontrola	2134,81	2719,38	0,00	6577,90	0,00	0,00	4773,35	H = 1,546
	RR MS	1245,00	2185,42	0,00	6665,30	0,00	0,00	3362,00	p = 0,462
	PP MS	10779,42	34362,18	0,00	114313,60	0,00	0,00	0,00	
NKCD56^{dim} IL4 [%]	Kontrola	1,89	1,33	0,00	4,15	2,03	0,68	2,81	H = 4,669
	RR MS	0,84	1,05	0,00	4,63	0,67	0,00	1,13	p = 0,097
	PP MS	2,33	3,63	0,00	11,51	0,68	0,00	2,97	
NKCD56^{dim} IL4 MFI	Kontrola	3886,03	2878,32	0,00	7720,90	3623,60	1308,15	6493,90	H = 2,351
	RR MS	3432,00	2828,46	0,00	7993,20	4561,55	0,00	5247,70	p = 0,309
	PP MS	2273,98	2758,20	0,00	8383,00	2073,40	0,00	3314,50	
NKCD335+ IL4 [%]	Kontrola	8,63	11,86	0,00	40,00	4,79	0,00	14,59	H = 8,096
	RR MS	8,48	24,86	0,00	100,00	0,00	0,00	1,27	p = 0,018
	PP MS	0,53	1,77	0,00	5,88	0,00	0,00	0,00	~K > PP
NKCD335+ IL4 MFI	Kontrola	8623,73	11883,60	0,00	41250,50	7348,95	0,00	10503,85	H = 10,059
	RR MS	36989,08	144253,68	0,00	671566,30	0,00	0,00	0,00	p = 0,007
	PP MS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	~K > PP
NKCD335- IL4 [%]	Kontrola	1,90	1,30	0,00	4,48	1,59	1,18	2,84	H = 4,573
	RR MS	1,05	1,34	0,00	5,54	0,59	0,00	1,39	p = 0,102
	PP MS	2,07	2,26	0,00	7,48	2,01	0,00	3,32	
NKCD335-	Kontrola	3438,49	2781,20	0,00	8552,20	3096,70	1196,10	5759,90	H = 0,547

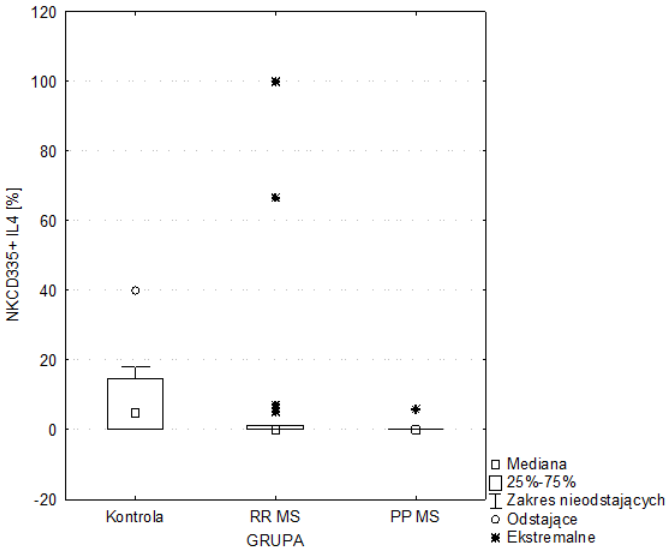
IL4 MFI	RR MS	3296,09	3098,06	0,00	9075,30	4099,90	0,00	5532,10	p = 0,761
	PP MS	2688,89	3070,24	0,00	9034,30	2364,90	0,00	5168,40	
	Kontrola	2,09	1,48	0,00	4,76	1,88	0,92	3,22	
NKCD27+									H = 3,241
	RR MS	1,53	1,93	0,00	6,67	0,75	0,00	2,05	
IL4 [%]									p = 0,198
	PP MS	1,08	1,18	0,00	2,90	0,84	0,00	2,30	
	Kontrola	4950,16	3432,94	0,00	9805,60	5766,15	1958,55	6574,10	
NKCD27+									H = 4,119
	RR MS	2746,89	3712,28	0,00	12090,20	0,00	0,00	4997,40	
IL4 MFI									p = 0,128
	PP MS	2691,84	5026,23	0,00	13958,70	0,00	0,00	5086,60	
	Kontrola	3,67	3,92	0,00	14,71	2,70	1,42	4,14	H = 13,445
NKCD27-	RR MS	1,04	1,39	0,00	6,00	0,53	0,00	1,61	p = 0,001
IL4 [%]									K > RR*
	PP MS	0,49	0,82	0,00	2,44	0,00	0,00	0,78	K > PP**
	Kontrola	21,38	37,37	0,00	100,00	3,70	0,00	18,80	
NKCD274+									H = 3,332
	RR MS	10,63	12,75	0,00	40,00	6,46	0,00	16,67	
IL4 [%]									p = 0,189
	PP MS	10,62	29,89	0,00	100,00	0,00	0,00	4,35	
	Kontrola	10541,59	14911,02	0,00	41250,50	3083,00	0,00	19421,40	H = 7,229
NKCD274+									
	RR MS	9077,25	27768,63	0,00	126211,10	0,00	0,00	4392,20	p = 0,027
IL4 MFI									
	PP MS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	~K > PP
	Kontrola	2,14	1,55	0,00	4,94	2,20	0,43	3,17	H = 6,465
NKCD274-									
	RR MS	0,93	1,23	0,00	5,38	0,51	0,18	1,29	p = 0,040
IL4 [%]									
	PP MS	1,00	1,07	0,00	3,05	0,78	0,00	1,98	~K > RR
	Kontrola	3788,99	3390,58	0,00	9469,10	2914,15	1001,65	6934,75	
NKCD274-									H = 1,597
	RR MS	3463,86	3904,14	0,00	16167,60	3441,25	0,00	5224,60	
IL4 MFI									p = 0,450
	PP MS	2168,15	3135,47	0,00	8383,00	0,00	0,00	5168,40	
	Kontrola	14,01	11,87	0,00	31,43	10,62	2,87	26,14	
NKCD73+									H = 0,340
	RR MS	16,52	24,02	0,00	100,00	7,71	0,00	22,22	
IL4 [%]									p = 0,844
	PP MS	20,04	32,79	0,00	100,00	3,23	0,00	50,00	

NKCD73+ IL4 MFI	Kontrola	4941,64	4456,07	0,00	12066,20	4946,90	0,00	8366,75	H = 3,505 p = 0,173
	RR MS	6333,53	14192,59	0,00	67156,30	1741,00	0,00	6953,00	
	PP MS	3447,78	9119,77	0,00	29992,00	0,00	0,00	0,00	
NKCD73- IL4 [%]	Kontrola	1,59	1,94	0,00	6,27	0,69	0,22	2,61	H = 0,625 p = 0,732
	RR MS	1,60	3,40	0,00	16,15	0,64	0,25	1,63	
	PP MS	1,46	2,08	0,00	5,83	0,00	0,00	2,87	
NKCD73- IL4 MFI	Kontrola	2380,84	2044,73	0,00	6070,20	2850,35	0,00	3300,75	H = 2,034 p = 0,362
	RR MS	2147,35	1920,29	0,00	5024,10	2752,85	0,00	3813,90	
	PP MS	1420,25	2316,08	0,00	7040,20	0,00	0,00	2600,00	

Objaśnienia:

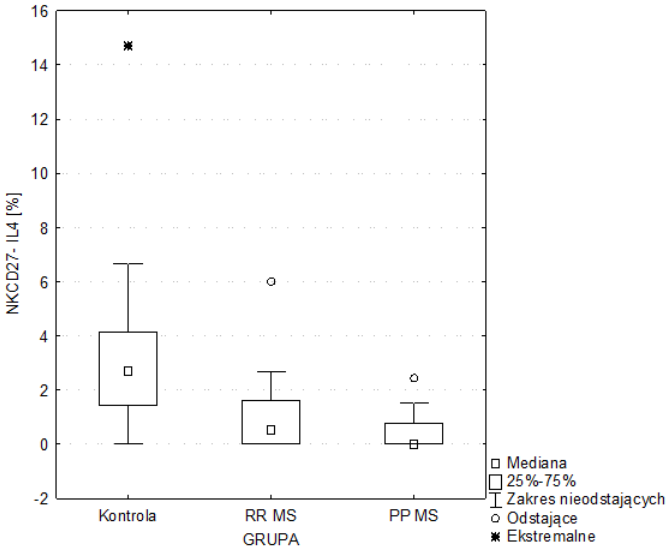
*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me –mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001, ~ na granicy istotności*

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335-, NK CD27+, NK CD274+, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-4 pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Stwierdzono wyższy (p=0,018) odsetek subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 34). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z RRMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



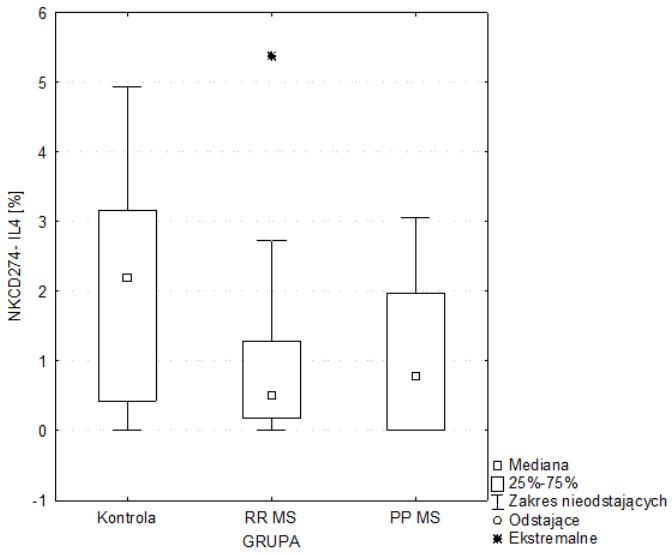
Rycina 34. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono istotnie wyższy (p=0,001) odsetek subpopulacji komórek NK CD27- zawierających IL-4 w grupie kontrolnej względem grup pacjentów z RRMS i PPMS (Rycina 35). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



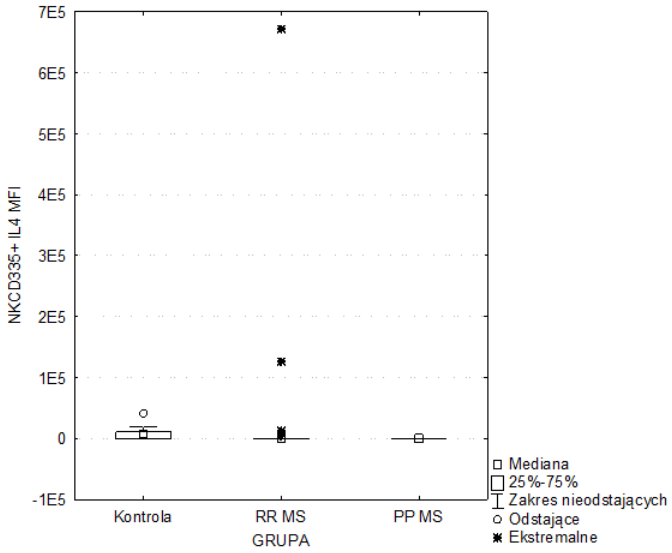
Rycina 35. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono wyższy (p=0,040) odsetek subpopulacji komórek NK CD274- zawierających IL-4 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 36). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z PPMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



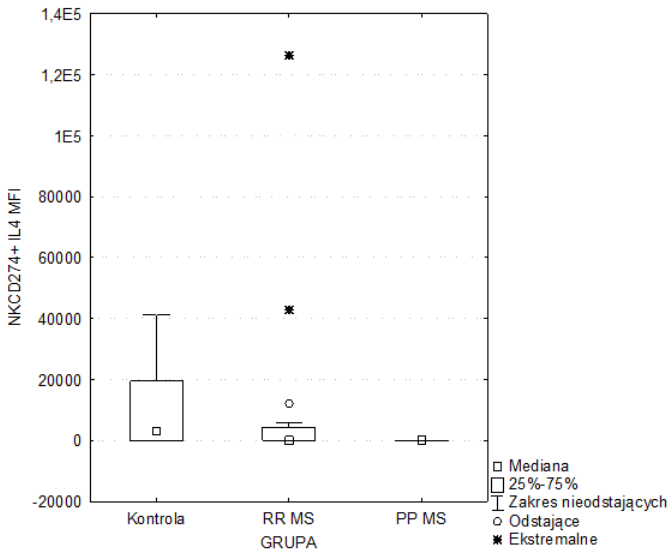
Rycina 36. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD274- zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Nie stwierdzono różnic w zakresie MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-4 pomiędzy analizowanymi trzema grupami. Stwierdzono wyższe (p=0,007) MFI subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 37). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z RRMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 37. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Stwierdzono wyższe (p=0,027) MFI subpopulacji komórek NK CD274+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS, na granicy istotności statystycznej (Rycina 38). Nie wykazano różnic w zakresie tej subpopulacji pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów z RRMS oraz pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS.



Rycina 38. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD274+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

4.4.2.5. IL-13

W Tabeli 15. zestawiono statystyki opisowe dla odsetka i MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-13. Kolorem czerwonym wyróżniono zmienne istotne statystycznie.

Tabela 15. Rozkład wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji s ubpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-13 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

Analizowana zmienna	Grupa	M	SD	Min	Max	Me	Q1	Q3	Porównanie grup
NKCD56^{bright} IL13 [%]	Kontrola	18,06	22,32	0,00	80,00	12,73	3,34	23,79	H = 1,758 p = 0,415
	RR MS	17,86	26,67	0,00	100,00	3,87	0,00	25,00	
	PP MS	24,89	20,45	0,00	48,75	32,18	3,45	45,33	
NKCD56^{bright} IL13 MFI	Kontrola	5509,67	4799,44	0,00	16288,90	5160,00	1918,30	7137,45	H = 3,149 p = 0,207
	RR MS	15741,54	44092,74	0,00	174321,40	0,00	0,00	5984,70	
	PP MS	13451,14	21455,48	0,00	73876,90	5487,00	0,00	20272,30	
NKCD56^{dim} IL13 [%]	Kontrola	2,32	2,28	0,00	6,54	1,67	0,42	3,97	H = 3,206 p = 0,201
	RR MS	10,03	17,45	0,00	55,00	0,58	0,00	16,28	
	PP MS	12,24	15,37	0,00	44,49	3,06	0,69	23,12	
NKCD56^{dim} IL13 MFI	Kontrola	3244,65	2940,49	0,00	9407,20	2801,70	1116,65	4146,10	H = 0,307 p = 0,858
	RR MS	6761,56	10919,11	0,00	45217,40	3872,80	0,00	6041,60	
	PP MS	2700,56	2072,19	0,00	5946,60	3215,60	0,00	3663,00	
NKCD335+ IL13 [%]	Kontrola	16,17	31,02	0,00	100,00	3,78	0,00	10,51	H = 2,764 p = 0,251
	RR MS	16,78	29,29	0,00	100,00	2,29	0,00	23,08	
	PP MS	30,18	37,77	0,00	100,00	10,00	1,20	50,00	
NKCD335+ IL13 MFI	Kontrola	3372,23	4192,44	0,00	11765,60	1176,85	0,00	6633,20	H = 0,401 p = 0,818
	RR MS	3316,72	5420,58	0,00	16462,40	0,00	0,00	7990,50	
	PP MS	8196,91	20808,51	0,00	69689,10	0,00	0,00	9055,40	

NKCD335-IL13 [%]	Kontrola	1,97	1,66	0,00	4,81	1,46	0,62	3,55	H = 3,621 p = 0,164
	RR MS	9,80	18,84	0,00	63,20	0,44	0,00	5,81	
	PP MS	16,89	23,90	0,00	68,06	3,16	1,06	41,44	
NKCD335-IL13 MFI	Kontrola	5103,94	5098,06	0,00	17850,60	3357,30	1563,80	7661,85	H = 0,067 p = 0,967
	RR MS	12935,51	28418,82	0,00	124823,30	3444,70	0,00	9881,70	
	PP MS	6052,44	8371,84	0,00	29720,10	4231,30	0,00	8089,60	
NKCD27+IL13 [%]	Kontrola	2,17	2,37	0,00	7,14	1,34	0,24	3,96	H = 3,822 p = 0,148
	RR MS	12,85	22,32	0,00	65,29	0,56	0,00	13,64	
	PP MS	9,19	9,04	0,00	24,38	4,17	2,70	20,73	
NKCD27+IL13 MFI	Kontrola	7725,49	12238,74	0,00	42210,60	3261,45	0,00	10220,25	H = 6,452 p = 0,040 ~RR < PP
	RR MS	3275,50	6768,67	0,00	28146,10	0,00	0,00	4496,60	
	PP MS	10487,61	14003,53	0,00	43746,90	5345,50	3672,00	9283,00	
NKCD27-IL13 [%]	Kontrola	6,15	7,14	0,31	23,91	3,00	1,23	9,98	H = 1,131 p = 0,568
	RR MS	11,47	19,05	0,00	58,41	1,19	0,16	22,17	
	PP MS	5,84	7,87	0,00	26,51	2,47	1,47	5,88	
NKCD274+IL13 [%]	Kontrola	25,48	33,98	0,00	100,00	6,54	1,32	47,22	H = 0,047 p = 0,977
	RR MS	27,99	31,95	0,00	85,71	11,98	0,00	52,08	
	PP MS	28,37	25,78	0,00	66,67	37,50	0,00	52,78	
NKCD274+IL13 MFI	Kontrola	6697,82	9240,88	0,00	29964,90	3179,10	0,00	10179,00	H = 1,006 p = 0,605
	RR MS	13683,90	29322,39	0,00	124823,30	1444,25	0,00	10545,00	
	PP MS	15343,94	16972,08	0,00	44135,80	11360,80	0,00	31569,00	
NKCD274-IL13 [%]	Kontrola	4,07	3,72	0,08	10,14	2,95	0,56	7,83	H = 3,235 p = 0,198
	RR MS	9,39	18,69	0,00	60,40	0,84	0,00	3,89	
	PP MS	9,12	13,28	0,41	43,51	2,20	1,03	18,06	
NKCD274-IL13 MFI	Kontrola	3560,84	4393,73	0,00	14640,00	2179,40	838,15	4227,05	H = 0,820 p = 0,664
	RR MS	5350,43	8603,23	0,00	34540,30	2211,25	0,00	6142,00	
	PP MS	6609,27	9219,31	0,00	32571,60	4742,40	0,00	8089,60	

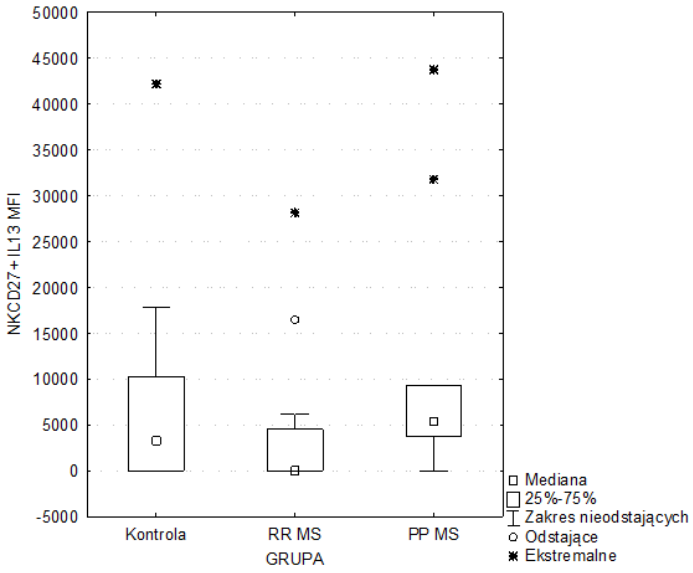
NKCD73+ IL13 [%]	Kontrola	20,51	16,36	1,07	51,72	18,34	4,82	33,99	H = 0,389 p = 0,823
	RR MS	35,23	38,38	0,00	100,00	14,88	1,52	79,49	
	PP MS	37,85	36,40	0,00	100,00	14,29	12,50	80,29	
NKCD73+ IL13 MFI	Kontrola	5893,13	5417,82	0,00	17651,10	5334,05	854,90	9446,00	H = 0,476 p = 0,788
	RR MS	16642,29	28976,78	0,00	124823,30	6669,15	0,00	18227,10	
	PP MS	10348,48	11849,47	0,00	31569,00	5863,20	0,00	19740,40	
NKCD73- IL13 [%]	Kontrola	2,90	4,02	0,00	11,11	0,93	0,24	4,36	H = 1,318 p = 0,517
	RR MS	8,29	15,32	0,00	43,85	1,23	0,19	4,24	
	PP MS	6,73	11,98	0,00	41,78	2,54	1,06	8,08	
NKCD73- IL13 MFI	Kontrola	2189,26	1446,87	0,00	3886,00	2360,80	1009,40	3287,80	H = 4,943 p = 0,085
	RR MS	2321,97	1910,15	0,00	5153,10	2678,45	0,00	3967,70	
	PP MS	4079,95	3145,77	0,00	11706,90	4167,00	2703,70	5109,70	

Objaśnienia:

*MFI – mediana intensywności fluorescencji, M – średnia, Me –mediana, Min – wartość minimalna, Max – wartość maksymalna, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl, SD – odchylenie standardowe, H – test Kruskala-Wallisa, p – istotność statystyczna, * p < 0,050, ** p < 0,010, *** p < 0,001, ~ na granicy istotności*

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka subpopulacji komórek NK CD56^{bright} , NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-13 pomiędzy analizowanymi trzema grupami.

Nie stwierdzono również różnic w zakresie MFI subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-13 pomiędzy analizowanymi trzema grupami. W zakresie powyższych subpopulacji zaobserwowano jedynie różnicę na granicy istotności statystycznej w zakresie subpopulacji komórek NK CD27+ zawierających IL-13. Stwierdzono wyższe (p=0,040) MFI w grupie pacjentów z PPMS niż w grupie pacjentów z RRMS (Rycina 39).



Rycina 39. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD27+ zawierających IL-13 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego

5. Dyskusja

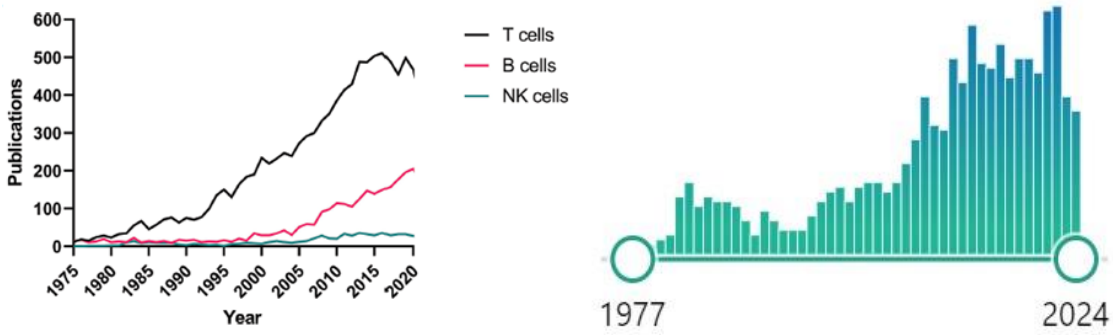
5.1. Fenotyp komórek NK

5.1.1. Odsetek komórek NK

Komórki NK stanowią 3–20% krążących limfocytów u mężczyzn i 1–28% u kobiet. Rozpiętości te wynikają w głównej mierze z czynników środowiskowych i etnicznych [120]. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie komórek NK w zależności od wieku [121, 122]. W przypadku płci, badacze nie są zgodni - niektóre badania sugerują, że płeć nie wpływa na odsetek komórek NK, a inne, że wartość ta może zmieniać się u kobiet za sprawą hormonów, jak np. podczas miesiączki [120, 123].

Ostatnie lata przyniosły znaczący wzrost zainteresowania komórkami NK jako elementem patogenezy MS (Rycina 40).

A. B.



Rycina 40. Komórki NK w MS w piśmiennictwie

Objaśnienia:

(A) Wykres wykonano na podstawie systematycznego przeglądu literatury w PubMed (NCBI) przy użyciu terminów „komórki T", „komórki B" lub „komórki NK" + "stwardnienie rozsiane". Przedstawia wyniki dla wszystkich trzech typów komórek od 1975 do 2020 r. Pochodzi z publikacji Beliën J., et. al. 'Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis: Entering the Stage.' [124].

(B) Wykres wykonano na podstawie systematycznego przeglądu literatury w PubMed (NCBI) przy użyciu terminów „komórki NK" + "stwardnienie rozsiane". Przedstawia wyniki od 1977 do 2024 r. Pochodzi ze strony internetowej PubMed [125].

W swoich analizach fenotypu komórek NK u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym badacze skupiają się na porównaniu różnic w ich subpopulacjach, nie opisując przy tym różnic w odsetku komórek NK jako całości [124].

W niniejszej pracy wartości odsetka komórek NK w każdej z badanych grup oraz w grupie kontrolnej mieściły się w zakresie opisanej wyżej normy. W grupie kontrolnej wartości odsetka komórek NK zawierały się w przedziale 2,15% - 19,33%, w grupie pacjentów z RRMS: 1,46% - 15,55%, a w grupie pacjentów z PPMS: 4,75% - 22,29%. Wartości skrajne, w przedziałach 1-3% i 20-28%, zgodnie z danymi z piśmiennictwa stwierdzono u kobiet. Nie zaobserwowano różnic w odsetku komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z MS a osobami zdrowymi.

5.1.2. Subpopulacje komórek NK CD56^{bright} i NK CD56^{dim}

Odsetek głównych subpopulacji komórek NK w MS jest częstym obiektem badań. Wynika to z opisywanego w piśmiennictwie udziału tych komórek, głównie fenotypu *bright*, w regulacji odpowiedzi immunologicznej podczas patogenezy MS. Komórki NK CD56^{bright} pełnią swoje funkcje poprzez różne, przedstawione wcześniej mechanizmy zabijania autologicznych, zaktywowanych limfocytów T.

Laroni wraz z zespołem przeprowadziła analizę cytometryczną krwi obwodowej u 22 nieleczonych pacjentów z RRMS i wyniki porównała do zdrowej kontroli. Nie stwierdziła różnic w odsetku komórek *bright* pomiędzy tymi grupami [107]. Bielekova i współpracownicy oceniali wpływ daklizumabu na komórki NK w grupie nieleczonych chorych z RRMS. W pierwszym etapie zanalizowano wartości odsetkowe subpopulacji *bright* i *dim* i również nie stwierdzono zmian względem zdrowej kontroli [126]. Do podobnych wniosków doszedł Martinez-Rodriguez wraz z zespołem – u 17 nieleczonych pacjentów z RRMS nie odnotowano różnic w zakresie odsetka głównych subpopulacji komórek NK w porównaniu do osób zdrowych. Powyższe obserwacje są zgodne z uzyskanymi w tej pracy – grupy pacjentów z RRMS i zdrowa kontrola nie różniły się w istotny sposób w zakresie odsetka subpopulacji *bright* i *dim.*

Canto-Gomes z zespołem podjął się analizy tych subpopulacji u pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS. Do badania włączył 23 nieleczonych pacjentów z PPMS i 23 zdrowych ochotników. Zaobserwował wyższy odsetek populacji *dim* w grupie chorych z PPMS [127]. Pomimo, że konstrukcja grupy badanej pod względem płci i wieku w pracy Canto-Gomesa była bardzo podobna do grupy z PPMS badanej w niniejszym eksperymencie, to wyniki nie są zgodne. W obecnie przedstawianej pracy nie stwierdzono różnic pomiędzy grupą pacjentów z PPMS a zdrową kontrolą.

W literaturze nie odnaleziono porównania populacji *bright* i *dim* pomiędzy grupami pacjentów nieleczonych z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią MS. W niniejszej pracy taka analiza nie wykazała różnic pomiędzy grupami. Jest to zgodne z poprzednimi wynikami i z poglądem, że różnice w samym odsetku, z pominięciem funkcji, subpopulacji *bright* i *dim* nie mają istotnego znaczenia w kontekście patogenezy MS [128].

5.1.3. Subpopulacje komórek NK CD335+ i CD335-

Marker CD335, inaczej NKp46 lub NRC1, czyli receptor naturalnej cytotoksyczności 1, to jeden z kluczowych receptorów aktywujących komórek NK, charakterystyczny dla tej populacji komórek. Znajduje się na wszystkich komórkach NK, od postaci o niepełnej dojrzałości, do tych w pełni dojrzałych. Warunkuje cytotoksyczność komórek NK umożliwiając cytolizę komórek docelowych [77]. Jego udział w patogenezie MS nie jest jasny. Wiele prac dowiodło, że u pacjentów z MS komórki NK krwi obwodowej mają obniżoną cytotoksyczność [95, 129, 130] i że istnieje zależność pomiędzy zmniejszeniem ich cytotoksyczności a pojawieniem się nowych zmian w CNS i rzutem MS [130, 131]. Uważa się, że niewystarczająca aktywność cytotoksyczna komórek NK może prowadzić do niekontrolowanego zwiększenia ilości komórek autoagresywnych, co może wiązać się z patogenezą MS. W powyższych badaniach nie analizowano jednak udziału receptora CD335 [132]. Dowiedziono, że ochronny udział komórek NK w patogenezie MS może zależeć od ich interakcji z komórkami rezydującymi w CNS, mającymi funkcje patogenne. Stwierdzono, że komórki NK za pośrednictwem CD335 mogą zabijać patogenne komórki mikrogleju, niedojrzałe komórki mieloidalne i inne komórki prezentujące antygen [133, 134]. Z drugiej strony jednak stwierdzono dużą zawartość CD335+ w plakach demielinizacyjnych, co może przemawiać za ich patogenną rolą [135].

Galuppo wraz z zespołem badała poziom CD335+ w krwi obwodowej pacjentów w czterech grupach: nieleczonych, z świeżo rozpoznanym RRMS, leczonych interferonem beta i leczonych natalizumabem. Wyniki porównano do zdrowej kontroli. Stwierdzono istotnie wyższy poziom CD335+ u pacjentów nieleczonych z RRMS względem pozostałych grup. Dodatkowo zaobserwowano, że ilość CD335+ zmniejsza się

pod wpływem leczenia. Uznano to za dowód na patogenne właściwości komórek NK CD335+ w MS [136].

Podobnie skonstruowany został pierwszy etap badań Durrenbergera, ale uzyskano odmienne wyniki. Za pomocą analizy cytometrycznej oceniano ilość i MFI komórek NK CD335+ we krwi obwodowej pacjentów nieleczonych z RRMS, z postępującym MS i leczonych interferonem beta. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami, ale zaobserwowano tendencję do niższych wartości MFI komórek CD335+ w grupach pacjentów z MS względem kontroli oraz do zwiększenia ekspresji tego receptora pod wpływem leczenia [135].

W przywoływanym wcześniej badaniu Canto-Gomeza stwierdzono wyższy poziom komórek NK CD335+ u pacjentów z PPMS względem kontroli [127].

W niniejszej pracy, odmiennie do wyników Galuppo i Canto-Gomeza, nie stwierdzono różnic w odsetku subpopulacji komórek NK CD335+ i NK CD335- pomiędzy badanymi grupami. Stwierdzono istotnie niższe wartości MFI komórek NK CD335+ w grupie pacjentów z PPMS względem grupy kontrolnej i grupy pacjentów z RRMS, co jest częściowo zgodne z wynikami Durrenbergera, który jednak nie wydzielił z grupy pacjentów z postępującym MS pacjentów z PPMS. Nie odnaleziono w piśmiennictwie porównania odsetka i MFI komórek NK CD335+ pomiędzy nieleczonymi grupami pacjentów z RRMS i PPMS. Stwierdzone w niniejszej pracy różnice pomiędzy tymi grupami mogą wynikać z faktu, że grupa pacjentów z PPMS była starsza od grupy z RRMS (mediana wieku 52 lata vs 33 lata), a uznaje się, że zawartość komórek NK z ekspresją CD335 maleje wraz z wiekiem [137].

Rozbieżność pomiędzy wynikami powyższych badań potwierdza, że rola receptora CD335 na komórkach NK w patogenezie MS jest niejednoznaczna – nie można określić, czy przeważają jego funkcje regulatorowe – ochronne, czy patogenne.

5.1.4. Subpopulacje komórek NK CD27+ i NK CD27-

Należący do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu receptor CD27, poza komórkami NK jest obecny również na limfocytach T CD4 i CD8 oraz na dojrzałych limfocytach B pamięci [138, 139]. Jego jedynym znanym ligandem jest CD70 – marker obecny na zaktywowanych komórkach układu odpornościowego: limfocytach T, limfocytach B, komórkach dendrytycznych, komórkach NK oraz w mniejszej ekspresji na zaktywowanych makrofagach [140, 141, 142].

Komórki NK wykazujące ekspresję markera CD27, czyli NK CD27+ są określane jako subpopulacja o właściwościach regulatorowych. Jest ich mniej we krwi obwodowej niż populacji NK CD27-, a przeważają w tkankach – np. przyjmuje się, że ich obecność w endometrium podczas ciąży jest jednym z czynników warunkujących tolerancję płodu przez organizm kobiety [74]. Nie jest jasna rola, jaką pełnią subpopulacje NK CD27+ i NK CD27- w chorobach autoimmunologicznych. W przeprowadzonym eksperymencie nad EAE u myszy opisano ich różne funkcje. Zaobserwowano, że poziom subpopulacji NK CD27- rośnie a NK CD27+ maleje w fazie przedklinicznej EAE. Stwierdzono, że komórki NK CD27- wykazują większą aktywność cytotoksyczną i zwiększoną zdolność do promowania dojrzewania komórek dendrytycznych, podczas gdy w subpopulacji komórek NK CD27+ dominują receptory hamujące i mniejsza produkcja IFN-γ. Subpopulacja NK CD27+, w odróżnieniu od NK CD27- ma zdolność do efektywnego hamowania proliferacji limfocytów T CD4+ i różnicowania limfocytów Th17. Co więcej, transfer komórek NK CD27-, w odróżnieniu od CD27+ u myszy z EAE powodował zaostrzenie choroby. Na podstawie tych wyników stwierdzono, że komórki NK CD27- są patogenne i zaostrzają EAE, a komórki NK CD27+ pełnią funkcję ochronną, regulatorową [143]. Nie odnaleziono analogicznych badań u pacjentów z MS.

Sam receptor CD27 był częstszym obiektem analiz. Badano znaczenie interakcji cząsteczek CD27-CD70 w patogenezie EAE. Nakajima wraz z zespołem w swojej pracy wykazał, że zablokowanie markera CD70, a więc uniemożliwienie interakcji CD27-CD70 zapobiegało rozwojowi EAE u myszy w mechanizmie zależnym od zmniejszonej produkcji TNF [144]. Francosalinas z zespołem udowodnił, że zwiększenie ekspresji CD70 na limfocytach B powoduje zmniejszenie ilości limfocytów Treg, co zmniejsza tolerancję immunologiczną i zwiększa podatność myszy na EAE [145]. Z drugiej strony Coquet z zespołem w swojej pracy wykazał, że zwiększenie ekspresji CD27 powodowało

blokowanie wydzielania IL-17 przez limfocyty Th17 i zmniejszało zapadanie myszy na EAE oraz jego intensywność [146].

Rozpuszczalny CD27 (ang. soluble CD27, sCD27) pochodzi ze zaktywowanych limfocytów T – jest oddzielany z ich błony komórkowej przy udziale metaloproteinaz. Podobnie jak błonowy CD27, sCD27 powoduje stymulację dojrzewania limfocytów T oraz indukuje aktywację i proliferację limfocytów T i B [146]. Jego podwyższony poziom stwierdzono w wielu chorobach autoimmunologicznych, między innymi w toczniu rumieniowatym układowym, reumatoidalnym zapaleniu stawów i MS [147, 148, 149]. W MS jego wysoki poziom w CSF uznano za przejaw intratekalnego występowania zaktywowanych limfocytów T i powiązano z aktywnością procesu demielinizacyjnego [150]. Stwierdzono korelację pomiędzy sCD27 a indeksem IgG w CSF. Wynika ona z faktu, że połączenie sCD27 z CD70 na limfocytach B pamięci, stymuluje je do różnicowania w kierunku komórek plazmatycznych wydzielających IgG [151]. Obecność sCD27 w CSF pacjentów z CIS uznano za możliwy biomarker rozpoznania MS i wysokiej aktywności rzutowej choroby [152, 153].

Nie udało się odnaleźć w literaturze badań porównujących subpopulacje NK CD27+ i NK CD27- u pacjentów z RRMS, PPMS i zdrowej kontroli.

Niniejszy eksperyment nie wykazał różnic pomiędzy ilością zarówno subpopulacji NK CD27+ jak i NK CD27- pomiędzy badanymi grupami. Stwierdzono, że MFI subpopulacji NK CD27+ było istotnie wyższe w grupie kontrolnej niż w grupie z RRMS i PPMS. Potrzeba jednak więcej badań by stwierdzić, czy u pacjentów z MS występuje niedobór regulatorowej subpopulacji komórek NK CD27+.

5.1.5. Subpopulacje komórek NK CD274+ i NK CD274-

CD274, czyli PD-L1, to najsilniejszy i najszerzej występujący ligand dla cząsteczki CD279, czyli receptora programowanej śmierci 1 (programmed death 1, PD-1). PD-L1 występuje na limfocytach T i komórkach prezentujących antygen, takich jak limfocyty B, komórki dendrytyczne, monocyty, makrofagi i komórki NK. Może również występować na komórkach endotelium, komórkach wysp trzustki czy komórkach nowotworowych [154]. PD-1 to immunosupresyjny koreceptor, występujący głównie na limfocytach T i B, ale także innych komórkach układu immunologicznego [155]. Połączenie PD-1/PD-

L1 dostarcza sygnałów hamujących do komórek, zapewniając tolerancję immunologiczną i chroniąc przed autoagresją [80].

Istnieją liczne doniesienia na temat udziału cząsteczek PD-1/PD-L1 w patogenezie MS. Stwierdzono, że w porównaniu do zdrowej kontroli, na PBMC pacjentów z RRMS występuje znacznie mniejsza ekspresja PD-1 i PD-L1, co prowadzi do załamania tolerancji immunologicznej [156, 157]. Zaobserwowano, że po stymulacji białkiem zasadowym mieliny, w krwi obwodowej pacjentów z RRMS w trakcie remisji było istotnie więcej limfocytów T z ekspresją PD-1 i komórek prezentujących antygen z ekspresją PD-L1 niż u pacjentów w czasie zaostrzenia. Wskazuje to na związek PD-1/PD-L1 z fazą remisji w RRMS [158]. Stwierdzono również, że polimorfizm genu dla PD-1, skutkujący obniżeniem ekspresji PD-1 na komórkach, może być związany z rozwojem MS [159]. Regulacja PD-1/PD-1L jest postrzegana jako jeden z potencjalnych mechanizmów terapeutycznych w MS. Wykazano, że terapia IFN-β powoduje zwiększenie ekspresji PD-L1 na PBMC pacjentów z RRMS [160, 161]. Badania nad siponimodem wykazały, że po 9-12 miesiącach terapii u pacjentów z SPMS zwiększyła się ilość krążących limfocytów Treg i ekspresja PD-1 na limfocytach T CD4+ [162]. Podobne obserwacje dotyczyły pacjentów z RRMS po 12 miesiącach leczenia fingolimodem [163].

Udowodniono udział wielu komórek układu odpornościowego w zależnym od PD-1/PD-L1 wpływie na rozwój i przebieg MS – limfocytów Treg, Breg, komórek dendrytycznych, komórek mikrogleju i makrofagów. Podkreśla się silną zależność pomiędzy niedoborem komórek wykazujących ekspresję PD-1/PD-L1 a rozwojem i zaostrzeniem MS. Nie jest jasna rola komórek NK CD274+ i NK CD274- w MS, ale określono ich funkcje w patogenezie innych chorób autoimmunologicznych i chorób nowotworowych [164].

Wiadomym jest, że na komórkach NK mogą znajdować się zarówno PD-1 jak i PD-L1. Obecność PD-1 powoduje, że komórki NK mają zmniejszony potencjał proliferacyjny w odpowiedzi na cytokiny, mniejszą zdolność do degranulacji, upośledzoną aktywność przeciwnowotworową i zwiększoną apoptozę [165, 166]. PD-L1 na komórkach NK może oddziaływać z PD-1 na komórkach dendrytycznych niekorzystnie wpływając na działanie przeciwnowotworowe [167]. Udowodniono, że trNK w wątrobie, za pośrednictwem interakcji PD-1/PD-L1 hamują przeciwwirusowe

właściwości limfocytów T [168]. Wykazano, że komórki NK z wysoką ekspresją PD-L1 pełnią rolę immunosupresyjną w autoagresji i ekspresja ta zwiększa się pod wpływem stymulacji przez Il-18. Transfer bogatych w PD-L1 komórek NK powoduje u podatnych myszy opóźnienie lub nie wystąpienie cukrzycy, w mechanizmie indukcji apoptozy aktywowanych, antygenowo specyficznych limfocytów T CD8+ [169].

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono porównania subpopulacji komórek NK CD274+ i NK CD274- u pacjentów z RRMS, PPMS i zdrowej kontroli. W niniejszym eksperymencie nie stwierdzono różnic w odsetku tych subpopulacji pomiędzy grupami, ale zaobserwowano, że istotnie wyższe MFI subpopulacji NK CD274+ występuje u pacjentów z PPMS względem pacjentów z RRMS. Brak jest doniesień na temat ekspresji CD274 w postaci PPMS zarówno w populacji komórek NK jak i innych komórek układu odpornościowego. Mała liczebność badanej w niniejszym eksperymencie grupy oraz brak porównania z wynikami innych badaczy uniemożliwia ocenę tego wyniku i sugeruje potrzebę dalszej analizy tej subpopulacji komórek NK.

5.1.6. Subpopulacje komórek NK CD73+ i NK CD73-

Marker CD73, czyli 5'-nukleotydaza, to transbłonowy enzym, który bierze udział w przekształcaniu zewnątrzkomórkowego prozapalnego ATP do regulatorowej adenozyny [170]. Znajduje się w błonie komórkowej wielu komórek układu odpornościowego pełniących funkcje regulatorowe, takich jak limfocyty T regulatorowe [171] i limfocyty B regulatorowe [172]. Występuje również na regulatorowych komórkach NK, które dodatkowo mają zdolność do wydzielania samej adenozyny do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [173]. Receptory dla adenozyny znajdują się na różnych populacjach komórek układu immunologicznego, takich jak limfocyty T i B, komórki NK, komórki dendrytyczne, monocyty i makrofagi. Połączenie tych receptorów z adenozyną powoduje zahamowanie funkcji efektorowych komórki i co za tym idzie regulację odpowiedzi immunologicznej [174, 175, 176, 177]. W literaturze odnaleźć można doniesienia potwierdzające zależny od CD73 ochronny udział adenozyny w patogenezie MS, jak np. wzrost poziomu CD73 po leczeniu IFN-β i korelacja pomiędzy zwiększeniem poziomu CD73 a korzystnym rokowaniem [178, 179]. Nie odnaleziono badań nad udziałem subpopulacji komórek NK CD73+/NK CD73- w patogenezie MS, ale budzi ona co raz większe zainteresowanie w badaniach nad chorobami

autoimmunologicznymi i nowotworowymi, dlatego zadecydowano o oznaczeniu jej w tym eksperymencie.

W badaniu nad młodzieńczym zapaleniem stawów stwierdzono, że w porównaniu do zdrowej kontroli w płynie stawowym pacjentów występuje zmniejszona ilość komórek NK CD73+. Powoduje to zmniejszenie ilości adenozyny i upośledzone hamowanie proliferacji autologicznych limfocytów T [173].

W chorobach nowotworowych marker CD73 ma silnie negatywne znaczenie. Zaobserwowano, że pod wpływem komórek nowotworowych komórki NK naciekające guza wykazują zwiększoną ekspresję CD73. W przypadku raka piersi zaobserwowano związek pomiędzy większą ilością komórek NK CD73+ a rozmiarem guza. Wykazano, że komórki NK CD73+ mają zdolność do zwiększonego wydzielania IL-10 i TGF-β oraz hamowania proliferacji limfocytów T CD4+ i wydzielania IFN-γ. Przez tak silną regulatorową stymulację komórki nowotworowe mogą wymykać się spod nadzoru immunologicznego, co prowadzi do progresji i przerzutów [180].

Jak wynika z danych literaturowych, subpopulacja komórek NK CD73+ wykazuje silne funkcje regulatorowe. W niniejszym eksperymencie nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie odsetka i MFI subpopulacji NK CD73+ i NK CD73- pomiędzy badanymi grupami. W wyżej przedstawionych doniesieniach wskazywano, że ekspresja CD73 zależy od środowiska, w jakim znajduje się komórka. Możliwe, że brak stwierdzonych zależności wynika z faktu, że badano jedynie krew obwodową.

5.2. Funkcje komórek NK

W drugim etapie eksperymentu analizowano wewnątrzkomórkową zawartość enzymów litycznych i cytokin w poszczególnych, określonych markerami powierzchniowymi subpopulacjach komórek NK. Wewnątrzkomórkowa zawartość tych cząsteczek może świadczyć o gotowości ich wydzielenia po odpowiedniej stymulacji – czyli o potencjalnej funkcji.

5.2.1. Wewnątrzkomórkowa zawartość granzymu B

Granzym B jest proteazą serynową wydzielaną przez wiele komórek, między innymi limfocyty T CD8+ i aktywowane limfocyty T CD4+ [181, 182]. Duże ilości granzymu B znajdują się również w komórkach NK [82]. Granzym B przejawia cytolityczne właściwości poprzez indukowanie apoptozy, kondensację chromatyny, dezintegrację DNA oraz zaburzenia metabolizmu i funkcji komórek będących celem ataku [183, 184].

Udział granzymu B w patogenezie MS był analizowany w literaturze. Nie można jednak jednoznacznie określić, czy pełni on funkcje patogenne czy ochronne. O możliwym patogennym wpływie może świadczyć podwyższony poziom granzymu B w CSF pacjentów z MS oraz fakt, że limfocyty T CD4+ pacjentów z RRMS i postępującymi postaciami MS wydzielają więcej ganzymu B niż limfocyty T CD4+ zdrowej kontroli [185, 186, 187]. Udowodniono, że uwalniające granzym B limfocyty T CD4+ przekraczają barierę krew-mózg i ich duże zagęszczenie występuje w obrębie świeżej plaki demielinizacyjnej [188]. Wykazano, że znajdujący się w place granzym B przejawia właściwości neurotoksyczne i antyregeneracyjne poprzez fragmentację występującego w astrocytach kwaśnego białka włókienkowego [189]. Dodatkowo stwierdzono, że naturalny antagonista granzymu B – serpina3N, podana myszom z EAE, ma zdolność do hamowania choroby i zmniejszenia jej agresywności [190].

Inną rolę może pełnić granzym B wydzielany przez komórki NK. Laroni z zespołem analizowała regulatorowe funkcje subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$ u pacjentów nieleczonych z RRMS lub CIS w porównaniu do zdrowej kontroli. W tym celu do badania zakwalifikowano 22 pacjentów z RRMS lub CIS i 22 zdrowych ochotników. Na podstawie badań w grupie kontrolnej stwierdzono, że komórki NK $CD56^{bright}$ pod wpływem sygnałów zapalnych nabywają zdolności do hamowania proliferacji autologicznych komórek CD4-T poprzez wydzielanie granzymu B. Dodatkowo wykazano, że komórki NK pacjentów z RRMS/CIS nie różniły się względem grupy kontrolnej ilością i fenotypem, ale wykazywały znacznie niższa zdolność do hamowania proliferacji autologicznych limfocytów T. Nie wynikało to jednak z mniejszej zawartości i wydzielania granzymu B, ale ze zwiększonej ekspresji HLA-E na limfocytach T [107].

Z analizy tych doniesień wynika, że funkcja granzymu B zależy od komórki, która go wydzieliła oraz środowiska, w którym się znajduje. Wydzielany przez limfocyty T CD4+ w CNS ma charakter patogenny, cytotoksyczny. Analiza jego wydzielania przez

komórki NK o fenotypie CD56^{bright} wykazała, że w warunkach zdrowia posiada zdolność do zabijania autoreaktywnych limfocytów T, więc wykazuje funkcje regulatorowe. Nie zależą one jednak od ilości granzymu B, ale od reakcji komórki docelowej. W niniejszym eksperymencie, podobnie jak w pracy Laroni, nie stwierdzono różnic w ilości komórek NK CD56^{bright} zawierających granzym B. Zaobserwowano za to istotnie większy odsetek subpopulacji komórek NK CD27+ i CD73- zawierających granzym B u pacjentów z RRMS względem grupy kontrolnej. W piśmiennictwie nie odnaleziono analiz wewnątrzkomórkowej zawartości granzymu B w tych subpopulacjach komórek NK. Potrzeba więcej badań by stwierdzić, jaka jest ich rola w patogenezie MS.

5.2.2. Wewnątrzkomórkowa zawartość granzymu K

Granzym K jest tryptazą wydzielaną przez limfocyty T cytotoksyczne, limfocyty NKT, limfocyty Tγδ i komórki NK, głównie o fenotypie CD56^{bright} [191, 192]. Ostatnie lata przyniosły nowe dane na temat ról pełnionych przez granzym K. Stwierdzono, że poza tradycyjnymi właściwościami cytolitycznymi, granzym K może pełnić w organizmie wiele innych funkcji. Jako enzym wewnątrzkomórkowy odpowiada za cytotoksyczność oraz hamowanie replikacji wirusów, a jako cząsteczka zewnątrzkomórkowa może aktywować śródbłonek i modulować wydzielanie cytokin prozapalnych [193].

W literaturze odnaleźć można doniesienia potwierdzające regulatorową rolę komórek NK wydzielających granzym K w patogenezie MS. Rodriguez-Lorenzo wraz z zespołem przeprowadziła badania pośmiertne, porównując skład komórkowy okolicy okołokomorowej mózgu i zwojów pajęczynówki u pacjentów z MS, demencją i zdrową kontrolą. Naukowcy wykazali, że w porównaniu do pozostałych grup, u pacjentów z MS występuje zwiększona ilość komórek NK wydzielających granzym K, zarówno w okolicy okołokomorowej, jak i w zwojach pajęczynówki [110]. Jiang z zespołem badała potencjał do zabijania autologicznych limfocytów T przez komórki NK za pomocą granzymu K. W tym celu porównała wyniki badań cytometrii krwi obwodowej trzech grup: nieleczonych pacjentów z MS, pacjentów leczonych daklizumabem i zdrowej kontroli. Zaobserwowano, że komórki NK pochodzące od pacjentów leczonych daklizumabem wykazywały znacznie większą cytotoksyczność w stosunku do autologicznych aktywowanych limfocytów T niż komórki NK pochodzące od pacjentów nieleczonych.

Wykazano, że ta zwiększona cytotoksyczność zależy od znacznie wyższej ekspresji granzymu K w subpopulacji komórek NK CD56^{bright} w grupie pacjentów leczonych [108].

Z badania Jiang wynika, że komórki NK CD56^{bright} pacjentów nieleczonych z RRMS poprzez mniejszą zawartość granzymu K wykazują upośledzoną aktywność regulatorową, która ulega poprawie po leczeniu daklizumabem.

W niniejszym eksperymencie stwierdzono niższy odsetek subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierających granzym K w grupie nieleczonych pacjentów z RRMS w porównaniu do osób zdrowych oraz niższy odsetek subpopulacji komórek NK CD27- zawierających granzym K w grupie nieleczonych pacjentów z PPMS niż u zdrowej kontroli. Wyniki te mogłyby potwierdzać koncepcję o regulatorowej dysfunkcji komórek NK u pacjentów z MS.

5.2.3. Wewnątrzkomórkowa zawartość perforyny

Perforyna jest glikoproteiną odpowiedzialną za formowanie porów w błonie komórkowej komórki będącej celem ataku cytotoksycznego. Jej duże ilości zawierają komórki NK, limfocyty T CD4+ i limfocyty T CD8+ [194]. Udział perforyny w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego został udowodniony na przykładzie mysiego modelu – myszy pozbawione perforyny częściej chorowały na choroby autoimmunologiczne i chłoniaki [195]. Potwierdzono udział komórek NK wydzielających perforynę w patogenezie kilku chorób autoimmunologicznych. Stwierdzono, że u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów występuje mniej komórek NK zdolnych do produkcji perforyny w porównaniu do zdrowej kontroli [196]. Podobne obserwacje poczyniono u pacjentów z cukrzycą typu pierwszego [197]. Analizowano również udział perforyny w patogenezie MS. Zaobserwowano, że mutacje zmieniające funkcje w genie kodującym perofrynę – PRF1 mogą predysponować do rozwoju MS. Dzieje się to zarówno poprzez upośledzoną odpowiedź przeciwwirusową jak i zaburzoną tolerancję immunologiczną [198].

Badania prowadzone u pacjentów z MS nie przyniosły jednoznacznych wniosków. Plantone wraz z zespołem przeprowadził badanie porównujące odsetek subpopulacji komórek NK CD56^{bright} i NK CD56^{dim} zawierających i niezawierających perforyny u pacjentów z PPMS, SPMS, w porównaniu do zdrowej kontroli. W tym celu wykonał analizę cytometryczną krwi obwodowej 15 nieleczonych pacjentów z PPMS, 15

nieleczonych pacjentów z SPMS oraz 19 zdrowych ochotników. Nie zaobserwowano różnic w odsetku komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających perforynę. Stwierdzono wyższy odsetek komórek NK $CD56^{dim}$ zawierających perforynę u pacjentów z PPMS i SPMS w porównaniu do zdrowej kontroli. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami pacjentów z PPMS i SPMS [199]. Z kolei Nayak i Jacolik w swojej pracy wykazali, że u pacjentów z MS, bez zróżnicowania postaci, występuje niedobór NK $CD56^{dim}$ zawierających perforynę w porównaniu do zdrowej kontroli [200]. Autorzy powyższych doniesień zwracali uwagę na konieczność oznaczenia zawartości perforyny również w innych subpopulacjach komórek NK.

W niniejszej pracy, tak jak u Plantone'a, nie zaobserwowano różnic w odsetku komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających perforynę. Odmiennie niż u Plantone'a i Nayaka, nie stwierdzono różnic w odsetku komórek NK $CD56^{dim}$ zawierających perforynę u pacjentów z RRMS i PPMS względem zdrowej kontroli. W pozostałych badanych subpopulacjach komórek NK zawierających perforynę również nie stwierdzono różnic pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS i kontrolą. Brak spójnych wyników potwierdza stanowisko, że rola komórek NK zawierających perforynę w patogenezie MS nie jest jasna.

5.2.4. Wewnątrzkomórkowa zawartość TGF-β

TGF-β jest cytokiną o silnie regulatorowym działaniu, wydzielaną przez liczne komórki układu immunologicznego, w tym – w sposób stały – przez komórki NK. Występują trzy izoformy TGF-β: TGF-β1, TGF-β2 i TGF-β3. Uważa się, że TGF-β1 dominuje pod względem ilości i odgrywa największą rolę w ograniczaniu odpowiedzi immunologicznej [201]. Wiele uwagi poświęcono potencjalnej roli tej cytokiny w rozwoju MS i większość doniesień przemawia za korzystnym jej działaniem. Udowodniono, że TGF-β wspomaga rozwój i prawidłową funkcję limfocytów Treg oraz hamuje proliferację silnie patogennych w MS limfocytów Th1. Badania dowiodły, że u pacjentów z MS funkcje limfocytów Treg są zaburzone, a podanie TGF-β wpływa na ich poprawę [202, 203]. W swojej pracy Moharami z zespołem oceniał poziom TGF-β, leptyny i orexyny-A u 25 pacjentów z RRMS w porównaniu do zdrowej kontroli. Stwierdzono, że poziom TGF-β u pacjentów z RRMS jest znacznie niższy niż w grupie kontrolnej [204].

Z drugiej strony, w pracach nad EAE wykazano, że przy obecności IL-6, TGF-β promuje dojrzewanie i proliferację limfocytów Th17 i wytwarzanie silnie prozapalnej IL-17 [205]. Dodatkowo wykazano, że w obecności IL-4, TGF-β zwiększa proliferację populacji limfocytów Th9 [206]. Wskazywałoby to na patogenne działanie w rozwoju MS. Dane te nie mają na ten moment silnego poparcia w badaniach u ludzi [207].

Zarówno TGF-β jak i jego receptory występują na wielu komórkach CNS, zwłaszcza na zaktywowanych astrocytach. W kontekście MS, wszystkie trzy izoformy TGF-β można odnaleźć zarówno w ostrych jak i przewlekłych zmianach deminilizacyjnych [208]. Dlatego też uznano, że oddziaływanie TGF-β na astrocyty bierze udział w tworzeniu przewlekłych plak. Nadekspresja TGF-β ukierunkowana na astrocyty skutkuje wcześniejszym wystąpieniem i gorszym przebiegiem EAE u myszy. Ogólnoustrojowe podanie inhibitorów TGF-β hamuje proces chorobowy [209, 210]. Wykazano, że u pacjentów z postępującymi postaciami MS, w otoczeniu plak występują rozległe obszary astrogliozy, częściowej demielinizacji i tlącego się stanu zapalnego. Stwierdzono w nich wysokie stężenie TGF-β [211, 212]. Doniesienia te wskazują na udział interakcji TGF-β i astrocytów w promowaniu astrogliozy, demielinizacji i przewlekłego zapalenia, co sugeruje, że TGF-β mógłby być obiecującym celem w terapii MS [213].

Badano również wpływ TGF-β na komórki NK w kontekście patogenezy MS. Xu wraz z zespołem w swojej pracy analizował wpływ TGF-β na przebieg EAE u myszy. Stwierdzono, że myszy, którym podano TGF-β wykazywały mniejszą podatność na EAE i prezentowały mniej nasilone objawy niż myszy, którym nie podano TGF-β. Wykazano, że podanie TGF-β skutkowało zmniejszeniem poziomu w CNS cytokin prozapalnych, zwłaszcza IL-17. Dodatkowo prowadziło do zwiększenia ekspresji markera NRC1 oraz proliferacji komórek NK o funkcjach regulatorowych. Powyższe wyniki sugerują, że TGF-β może wywierać ochronny wpływ na EAE poprzez działanie na komórki NK [214].

Nie odnaleziono prac analizujących subpopulacje komórek NK zawierających TGF-β w patogenezie MS.

W niniejszym eksperymencie wykazano, że u pacjentów z MS występuje istotnie mniejszy odsetek komórek NK zawierających TGF-β niż u zdrowej kontroli. Tendencję taką zaobserwowano w obrębie subpopulacji NK CD335+, gdzie odsetek komórek zawierających TGF-β był istotnie niższy zarówno w grupie pacjentów z RRMS jak i

PPMS w porównaniu do zdrowej kontroli. Nie zaobserwowano podobnych różnic pomiędzy pacjentami z różnymi postaciami MS. Stwierdzono również istotnie niższy odsetek subpopulacji NK CD27+ i NK CD27- zawierających TGF-β w grupie pacjentów z RRMS względem zdrowej kontroli, bez różnic w przypadku grupy pacjentów z PPMS. Zaobserwowano za to znacznie niższe MFI komórek NK CD335+ zawierających TGF-β w grupie pacjentów z PPMS w porównaniu do zdrowej kontroli. Wyniki te sugerują potencjalnie wyższy poziom TGF-β w surowicy osób zdrowych w porównaniu do pacjentów z MS. Pozostaje to w zgodności z badaniem Moharami'ego i sugeruje, że u pacjentów z MS występuje niedobór tej regulatorowej cytokiny. Komórki NK zawierające TGF-β można uznać za pełniące funkcje regulatorowe, co pozwala podejrzewać, że u pacjentów z MS występuje niedobór komórek NK o ochronnych, regulatorowych funkcjach. Brak danych w piśmiennictwie przedstawiających komórki NK jako źródło TGF-β w MS oraz niejednoznaczne wyniki badań opisujących funkcję samego TGF-β w patogenezie MS nie pozwalają jednak na wysnucie takich wniosków.

5.2.5. Wewnątrzkomórkowa zawartość IFN-γ

IFN-γ jest cytokiną prozapalną wydzielaną przez wiele komórek układu odpornościowego. Wśród komórek odporności nieswoistej IFN-γ jest produkowany głównie przez komórki NK, ale również limfocyty NKT, makrofagi i komórki dendrytyczne [215, 216]. Wśród elementów odporności swoistej, produkują go limfocyty T CD8+ - w celu ograniczania infekcji oraz limfocyty T CD4+. Produkcja IFN-γ przez limfocyty CD4+ powoduje inicjację odpowiedzi zapalnej, eliminację wewnątrzkomórkowych patogenów i zmianę klas przeciwciał na IgG2a, IgG2b i IgG3 [217, 218]. IFN-γ odpowiada również za różnicowanie limfocytów CD4+ do subpopulacji Th1 [219]. Przez swoje działanie IFN-γ został uznany za cytokinę dominującą w reakcjach autoimmunologicznych u ludzi i stał się celem badań w różnych chorobach autoimmunologicznych [220].

Prace nad udziałem IFN-γ w patogenezie MS nie wskazują jednoznacznie, czy pełni on rolę patogenną czy ochronną. IFN-γ w stanie zdrowia nie występuje w CNS. Stwierdzono, że podczas EAE jest wydzielany przez zaktywowane, naciekające limfocyty T i pełni funkcję patogenną w rozwoju MS. Limfocyty Th1 wydzielające IFN-γ pojawiają się w CNS już przed objawami klinicznymi i zanikają w fazie remisji [221].

Udowodniono, że leczenie przeciwciałami skierowanymi przeciwko IFN-γ opóźnia postęp niesprawności u pacjentów z SPMS [222].

Z drugiej jednak strony, w literaturze odnaleźć można liczne dowody świadczące o możliwej ochronnej roli IFN-γ w patogenezie MS. Stwierdzono, że myszy pozbawione IFN-γ są bardziej podatne na EAE, mają większy naciek zapalny w CNS i EAE ma u nich szybciej postępujący przebieg niż u myszy bez defektu IFN-γ [223, 224]. Dodatkowo, podanie ludzkiego IFN-γ nie pogarszało przebiegu choroby i prowadziło do opóźnienia pojawienia się objawów klinicznych [225]. Ponieważ głównym źródłem IFN-γ są komórki NK, zaczęto badać wpływ komórek NK wydzielających IFN-γ na rozwój MS.

Lunemann wraz z zespołem analizowała poziom subpopulacji NK $CD56^{bright}$ i NK $CD56^{dim}$ zawierających IFN-γ. W tym celu do badania zakwalifikowano 20 nieleczonych pacjentów z RRMS i 25 zdrowych ochotników. Nie stwierdzono różnic w odsetku subpopulacji NK $CD56^{bright}$ i NK $CD56^{dim}$ pomiędzy grupami, ale stwierdzono znacznie mniejszą ilość komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających IFN-γ w grupie pacjentów z RRMS. Dodatkowo, po stymulacji IL-12, komórki NK $CD56^{bright}$ pacjentów z RRMS wydzielały istotnie mniej IFN-γ niż w grupie osób zdrowych. Na podstawie tego badania wyciągnięto wnioski, że w MS fenotyp komórek NK nie ulega zmianie – zaburzeniu ulegają ich funkcje regulatorowe [226]. Do podobnych wniosków doszedł Tahrali z zespołem. Naukowcy wykazali, że u pacjentów z RRMS, zarówno nieleczonych, jak i leczonych IFN-β, występuje mniejsza ilość subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających IFN-γ i komórki te wydzielają mniej IFN-γ po stymulacji IL-12, w porównaniu do zdrowej kontroli [227].

W niniejszej pracy oceniono odsetek i MFI różnych subpopulacji komórek NK zawierających IFN-γ, w tym oceniane w powyższych badaniach subpopulacje NK $CD56^{bright}$ i NK $CD56^{dim}$. Podobnie jak w przytoczonych wyżej pracach stwierdzono, że odsetek komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających IFN-γ jest istotnie niższy w grupie nieleczonych pacjentów z RRMS w porównaniu do zdrowej kontroli. Co więcej, taką zależność stwierdzono również w przypadku niebadanej w przedstawionych pracach grupie pacjentów z PPMS. Tak jak w cytowanych pracach, nie stwierdzono analogicznych różnic w przypadku subpopulacji NK $CD56^{dim}$. W niniejszej pracy dodatkowo wykazano niższy odsetek komórek zawierających IFN-γ u pacjentów z RRMS względem zdrowych osób w obrębie subpopulacji NK CD335-, NK CD247-, oraz

NK CD27-. Różnice dotyczyły również grupy pacjentów z PPMS. Stwierdzono, że w tej grupie jest istotnie mniej komórek NK CD335+ i NK CD27- zawierających IFN-γ niż w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy odsetkiem różnych subpopulacji komórek NK zawierających IFN-γ pomiędzy grupami pacjentów z RRMS i PPMS. Wyniki te, zgodnie z wynikami prac przedstawionymi powyżej, mogą wskazywać na zmniejszenie ilości IFN-γ wydzielanego przez komórki NK u pacjentów z MS. Obserwacja ta może wspierać pogląd, że u pacjentów z MS upośledzone są funkcje regulatorowe komórek NK i to przyczynia się do rozwoju procesu autoimmunologicznego.

5.2.6. Wewnątrzkomórkowa zawartość IL-10

IL-10 jest silnie przeciwzapalną cytokiną, wytwarzaną przez prawie wszystkie leukocyty, w tym wszystkie subpopulacje limfocytów T, monocyty, makrofagi, neutrofile, eozynofile, komórki tuczne, komórki dendrytyczne, limfocyty B i komórki NK [228]. Ponadto udowodniono, że w odpowiedzi na infekcje, uszkodzenie tkanek i obecność komórek nowotworowych, również keratynocyty i komórki nabłonkowe mają zdolność do produkcji IL-10 [229]. IL-10 jest cytokiną przeciwzapalną i działa immunoregulacyjnie w wielu mechanizmach [230]. IL-10 hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak TNF-α, IL-1, IL-6 i IFN-γ przez zaktywowane przez receptor Toll-Like komórki linii mieloidalnej [231, 232]. Poza tłumieniem ekspresji cytokin wydzielanych przez limfocyty Th1, IL-10 jest również silnym inhibitorem prezentacji antygenu – powoduje zmniejszenie ekspresji głównego kompleksu MHC II i kostymulujących cząsteczek CD80 na makrofagach i CD86 na komórkach dendrytycznych. Ponadto IL-10 zwiększa proliferację limfocytów B i wytwarzanie przez nie przeciwciał [233].

Ochronne działanie IL-10 wykazano w chorobach autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, cukrzyca typu 1, nieswoiste zapalenia jelit i MS [232].

Powstało wiele prac potwierdzających korzystne działanie IL-10 w patogenezie MS. Stwierdzono, że zwiększenie ekspresji IL-10 w CNS odpowiada fazie zdrowienia w EAE [234]. Wykazano, że donosowe podanie IL-10 jest skuteczne w leczeniu EAE u szczurów i chroni przed indukowanymi podaniem TNF rzutami EAE [235]. W modelu

myszy transgenicznych, nadekspresja IL-10 powoduje oporność na EAE [236]. Badania ostatnich lat wykazały, że u pacjentów z MS limfocyty B nie wydzielają odpowiedniej ilości Il-10. W pracach nad EAE u myszy stymulacja za pomocą markera CD40, w odpowiedzi na połączenie z receptorem TLR powodowała ciągłe uwalnianie IL-10 przez limfocyty B. Zwiększenie poziomu produkowanej przez limfocyty B IL-10 przyczyniało się do ustępowania objawów EAE [237].

Ochronne działanie IL-10 w patogenezie MS potwierdzają również badania prowadzone u ludzi. W swojej pracy Sedeeq z zespołem oceniali poziom IL-10 w osoczu pacjentów z RRMS w okresie rzutu i remisji w porównaniu do zdrowej kontroli. Stwierdzono istotnie niższy poziom IL-10 podczas rzutu, niż w czasie remisji i w grupie osób zdrowych [238]. Soldan z zespołem oceniała poziom cytokin u pacjentów z SPMS i RRMS w porównaniu do zdrowej kontroli. Badanie wykazało zmniejszoną sekrecję IL-10 przez PBMC pacjentów z SPMS w porównaniu do pacjentów z RRMS i zdrowej kontroli [239]. Zgodne z powyższymi wyniki uzyskała Barry z zespołem w swojej pracy oceniającej wpływ ćwiczeń na ergometrze na poziom IL-10 u pacjentów z MS – wyjściowo poziom IL-10 w osoczu pacjentów był istotnie niższy niż u zdrowej kontroli [240].

Komórki NK stanowią istotne źródło IL-10. Uznaje się, że wydzielanie IL-10 przez komórki NK świadczy o ich funkcjach regulatorowych, a subpopulację komórek NK wydzielających IL-10 określa się jako NKreg [241]. Ze względu na swoją funkcję, subpopulacja ta stała się celem badań w chorobach autoimmunologicznych. Potwierdzono, że niedobór komórek NK wydzielających IL-10 występuje u pacjentów z chorobą Beheta [242, 243]. W cytowanej wyżej pracy Tahrali'ego badano wydzielanie cytokin przez subpopulacje komórek NK $CD56^{bright}$ i $CD56^{dim}$. Stwierdzono, że odsetek subpopulacji komórek NK $CD56^{dim}$ zawierających IL-10 pod wpływem stymulacji IL-2 wzrastał bardziej u nieleczonych i leczonych pacjentów z RRMS niż u zdrowej kontroli i pacjentów z CIS. Ilość tej subpopulacji pod wpływem stymulacji IL-12 rosła u pacjentów nieleczonych i malała u pacjentów leczonych z RRMS. Autorzy podkreślają, że jest to niezgodne z danymi literaturowymi podającymi zmniejszenie ilości IL-10 u pacjentów z MS i wskazują na potrzebę badania pod kątem zawartości IL-10 innych subpopulacji komórek NK. W przypadku subpopulacji NK $CD56^{bright}$ zawierającej IL-10, pod wpływem stymulacji IL-4 obserwowano znacznie niższe poziomy tych komórek u

nieleczonych i leczonych pacjentów z MS względem zdrowej kontroli i pacjentów z CIS [227].

W niniejszym badaniu, zgodnie z większością doniesień literaturowych, stwierdzono istotny niedobór subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierających IL-10 u pacjentów z RRMS w porównaniu do osób zdrowych. Wykazano również niższe MFI tej subpopulacji w grupie pacjentów z RRMS niż w grupie kontrolnej. Istotnie mniejszy odsetek komórek zawierających IL-10 zaobserwowano w grupie pacjentów z RRMS w porównaniu do zdrowej kontroli, w obrębie niebadanych dotąd w tym aspekcie subpopulacji: NK CD335+ i NK CD27-. Zaobserwowano również niższe MFI subpopulacji NK CD335+ w grupie pacjentów z RRMS względem osób zdrowych. Nie wykazano różnic pomiędzy grupą pacjentów z PPMS a pozostałymi grupami w zakresie żadnej subpopulacji zawierającej IL-10. Wyniki niniejszego badania wspierają pogląd, że u pacjentów z RRMS występuje niedobór regulatorowej IL-10 i zaburzenie funkcji regulatorowych komórek NK.

5.2.7. Wewnątrzkomórkowa zawartość IL-4

Interleukina 4 jest cytokiną wydzielaną głównie przez limfocyty Th2, mastocyty, eozynofile, bazofile, ale również przez komórki NK, NKT i IL2 [244]. Jest produkowana w CNS przez komórki mikrogleju i neurony [245]. IL-4 ma znaczący wpływ na hamowanie ekspresji i uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, TNF-α, IL-6, IL-8 i białko zapalne makrofagów [246]. Ponadto IL-4 może tłumić funkcje makrofagów - aktywność cytotoksyczną, zabijanie pasożytów oraz produkcję tlenku azotu [247]. Do innych funkcji IL-4 należą stymulacja limfocytów T i B, aktywacja proliferacji mastocytów, indukowanie cząsteczek MHC II i przeciwciał IgE [248]. Pełnione przez IL-4 role powodują, że może ona dawać efekt zarówno przeciwzapalny, jak i prozapalny.

Badania wykazały, że IL-4 ma istotny wpływ na komórki CNS. Jest wytwarzana przez makrofagi w celu ograniczenia reakcji zapalnej przez hamowanie wytwarzania cytokin prozapalnych, takich jak TNF [249]. IL-4 w zależności od warunków może wywierać na astrocyty wpływ pro- lub przeciwzapalny [250]. Mikroglej również może różnie reagować na IL-4, w zależności, czy uległ wcześniejszej aktywacji przez IFN-γ czy TNF [251]. Wiele badań wykazało udział IL-4 w hemostazie CNS, neurogenezie i wspomaganiu funkcji poznawczych [252].

Badano rolę IL-4 w patogenezie różnych chorób autoimmunologicznych, w tym MS. Liczne prace potwierdziły regulatorową i protekcyjną rolę IL-4 w EAE [253]. Stwierdzono, że u myszy, u których zablokowano działanie IL-4 w CNS występuje zwiększony naciek komórek zapalnych i zaostrzenie EAE [254]. Wykazano, że dootrzewnowe podanie IL-4 powoduje zahamowanie aktywności EAE u myszy [255]. Z drugiej strony, podanie przeciwciał neutralizujących IL-4 nie wpłynęło na złagodzenie EAE [256]. W badaniu roli IL-4 w MS u ludzi również nie osiągnięto jednoznacznego stanowiska. Tahani z zespołem w swojej pracy oceniał poziom IL-4 w surowicy pacjentów z MS, zapaleniem nerwu wzrokowego i rdzenia oraz w grupie zdrowych ochotników. Stwierdzono, że poziom IL-4 w grupach pacjentów z MS był istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej [257]. W swoim badaniu Furlan z zespołem również stwierdzili, że u pacjentów z MS przed leczeniem IFN-β występuje więcej limfocytów T produkujących IL-4 niż u zdrowej kontroli i pacjentów po leczeniu [258]. Z kolei w pracy Bartosik – Psujek udowodniono, że u pacjentów z RRMS, zarówno w fazie rzutu jak i remisji, poziom IL-4 w osoczu jest niższy niż u zdrowej kontroli [259]. Wyżej przedstawione prace przedstawiają niejednoznaczne wnioski co do roli IL-4 w patogenezie MS.

Komórki NK wydzielające IL-4 są zaliczane do komórek NK2. Analogicznie do limfocytów Th2, kwalifikowane są do komórek pełniących funkcje regulatorowe. Ich zwiększoną ilość można zaobserwować w mikrośrodowisku komórek nowotworowych i w surowicy kobiet w ciąży [260, 261]. Wśród chorób o podłożu autoimmunologicznym, w chorobie Beheta wykazano, że ilość komórek NK produkujących IL-4 obniża się podczas zaostrzenia i zwiększa w trakcie remisji [243]. Nie odnaleziono analogicznych badań u pacjentów z MS.

W niniejszej pracy oceniano wewnątrzkomórkową zawartość IL-4 w różnych subpopulacjach komórek NK. Stwierdzono wyższy odsetek subpopulacji NK CD335+ zawierającej IL-4 w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z PPMS. Zaobserwowano również wyższe MFI tej subpopulacji w grupie kontrolnej względem PPMS. Stwierdzono wyższy odsetek subpopulacji NK CD274- zawierającej IL-4 w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów z RRMS. Zaobserwowano wyższe MFI subpopulacji NK CD 274+ zawierającej IL-4 w grupie kontrolnej niż w grupie pacjentów z PPMS. Wykazano wyższy odsetek subpopulacji komórek NK CD27- zawierającej IL-4 w grupie kontrolnej w porównaniu do obu grup pacjentów chorych. Nie stwierdzono różnic

pomiędzy grupami pacjentów z PPMS a RRMS w zakresie żadnej subpopulacji. Wyniki te mogą sugerować niedobór komórek NK pełniących funkcje regulatorowe u pacjentów z MS, ale niepewne dane literaturowe co do faktycznej roli IL-4 w patogenezie MS skłaniają do prowadzenia dalszych badań w tym zakresie.

5.2.8. Wewnątrzkomórkowa zawartość IL-13

Interleukina 13, podobnie jak IL-4, należy do grupy cytokin przeciwzapalnych, których główną rolą jest promowanie zależnych od limfocytów Th2 reakcji alergicznych [262]. Tak jak IL-4, jest wydzielana przez wiele komórek układu odpornościowego, jak limfocyty Th2, eozynofile, bazofile, komórki NK i ILC-2 [244, 262, 263]. Pełni funkcje regulatorowe poprzez hamowanie syntezy cytokin prozapalnych wydzielanych przez limfocyty Th1 [246]. W związku z tym, badano jej rolę w patogenezie takich schorzeń jak zapalenie stawów, atopowe zapalenie skóry, zapalenie jelita grubego, zakażenie Covid-19 i MS [264, 265, 266, 267, 268]. Do tej pory jednak nie rozstrzygnięto, czy w patogenezie MS IL-13 pełni rolę ochronną czy patogenną.

Seyfizadeh z zespołem badali polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. single nucleotide polymorphism, SNP) IL-13 i wykazali znaczące powiązanie między niektórymi SNP IL-13 a predyspozycją do MS i wiekiem zachorowania [264]. Ghezzi z zespołem prowadziła badania nad poziomem IL-13 produkowanej przez limfocyty CD4+ w CSF. Stwierdzono, że pacjenci podczas rzutu mają wyższy poziom IL-13 niż w czasie remisji, a poziom IL-13 rośnie wraz z punktacją w skali EDSS. Dodatkowo stwierdzono podwyższony poziom IL-13 w obrębie aktywnych zmian demielinizacyjnych w rdzeniu kręgowym [269]. Wiele jednak badań nie potwierdza tych wyników i przemawia za korzystną rolą IL-13.

Rossi wraz ze współpracownikami w swojej pracy również zaobserwował wzrost poziomu IL-13 w CSF u pacjentów z RRMS, ale zarówno w trakcie rzutu jak i remisji. Wykazał, że IL-13 w CSF pełni rolę neuroprotekcyjną poprzez zwiększanie stosunku kwasu gamma aminomasłowego do glutaminianu, a jej poziom jest silnie skorelowany z poziomem amyloidu-b1-42 w CSF. Dodatkowo nie stwierdził korelacji pomiędzy poziomem IL-13 a progresją choroby mierzoną skalą EDSS [270]. Co więcej, badania wykazały, że u pacjentów z RRMS na skutek leczenia octanem glatirameru zwiększa się liczba limfocytów Th2 produkujących IL-13 [271]. Cash z zespołem wykazali, że podanie

myszom z EAE rekombinowanej ludzkiej IL-13 wywiera efekt ochronny i hamuje chorobę poprzez inaktywację makrofagów i redukcję stresu oksydacyjnego [272].

Komórki NK wydzielające IL-13, podobnie jak IL-4 zaliczane są do subpopulacji NK2, pełniącej funkcje ochronne w procesach autoimmunologicznych. Jej wydzielanie potwierdzono zarówno w subpopulacji NK $CD56^{bright}$ jak i NK $CD56^{dim}$ [273]. Do tej pory nie określono jednak, jaką rolę pełni IL-13 w regulatorowym działaniu komórek NK. Nie odnaleziono prac porównujących subpopulacje komórek NK zawierające IL-13 w krwi obwodowej pacjentów z MS [274]. W niniejszym eksperymencie nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka żadnej z badanych subpopulacji komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą. Zaobserwowano wyższe MFI subpopulacji NK CD27+ zawierającej IL-13 w grupie pacjentów z PPMS w porównaniu do pacjentów z RRMS. Potrzeba więcej badań w zakresie komórek NK zawierających IL-13 u pacjentów z MS by ocenić wartość tych wyników.

6. Podsumowanie wyników i wnioski

6.1. Podsumowanie wyników

Fenotyp komórek NK

1. Nie stwierdzono różnic w odsetku komórek NK pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą.
2. Nie stwierdzono różnic w odsetku subpopulacji NK $CD56^{bright}$ i NK $CD56^{dim}$ pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą.
3. Nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku żadnej z badanych subpopulacji komórek NK (NK CD335-, NK CD335+, NK CD27-, NK CD27+, NK CD274-, NK CD274+, NK CD73-, NK CD73+) pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą.
4. Nie stwierdzono istotnych różnic w MFI subpopulacji komórek NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-, NK CD73- i NK CD73+ pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą.
5. Stwierdzono wyższe MFI subpopulacji NK CD335+ w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS i w grupie pacjentów z RRMS względem grupy pacjentów z PPMS.
6. Stwierdzono wyższe MFI subpopulacji NK CD27+ w grupie kontrolnej względem grup pacjentów z RRMS i PPMS.
7. Stwierdzono większą wartość MFI subpopulacji komórek NK CD274+ w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS.

Powyższe dane zebrano w Tabeli 16.

Tabela 16. Podsumowanie wyników porównania fenotypu komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą

Badana subpopulacja komórek NK	Wykazane różnice pomiędzy grupami
NK CD56^{bright}	brak
NK CD56^{dim}	brak
NK CD335-	brak
NK CD335+	MFI: K>PPMS; RRMS>PPMS
NK CD27-	brak
NK CD27+	MFI: K>RRMS; K>PPMS
NK CD274-	brak
NK CD274+	MFI: PPMS>RRMS
NK CD73-	brak
NK CD73+	brak

Wewnątrzkomórkowa zawartość enzymów cytotolitycznych

1. Wyższy odsetek komórek NK zawierających granzym B stwierdzono u pacjentów z RRMS względem grupy kontrolnej (w subpopulacjach NK CD27+ i NK CD73-).
2. Wyższy odsetek komórek NK zawierających granzym K stwierdzono w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji NK CD56^{bright}) i w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD27-). Wyższe MFI komórek NK zawierających granzym K zaobserwowano w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD56^{dim}).
3. Nie stwierdzono różnic w odsetku i MFI komórek NK zawierających perforynę pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą.

Powyższe dane zebrano w Tabeli 17.

Tabela 17. Podsumowanie wyników porównania wewnątrzkomórkowej zawartości enzymów cytolitycznych komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą

Badany enzym cytolityczny	Wykazane różnice pomiędzy grupami	Subpopulacja, w której stwierdzono różnice
Granzym B	[%] RRMS>K	NK CD27+; NK CD73-
Granzym K	[%] K>RRMS [%] K>PPMS MFI: K>PPMS	NK CD56^{bright} NK CD27- NK CD56^{dim}
Perforyna	brak	-

Wewnątrzkomórkowa zawartość cytokin

1. Wyższy odsetek komórek NK zawierających TGF-β stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD335+, NK CD27+, NK CD27-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+). Wyższe MFI komórek NK zawierających TGF-β stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+) i w grupie pacjentów z PPMS względem grupy kontrolnej (w subpopulacji NK CD274-).
2. Wyższy odsetek komórek NK zawierających IFN-γ stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD56^{bright}, NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacjach NK CD56^{bright}, NK CD335+, NK CD27-).
3. Wyższy odsetek komórek NK zawierających IL-10 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD56^{bright}, NK CD335+, NK CD27-). Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-10 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD56^{bright}, NK CD335+) oraz w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji komórek NK CD27+).

4. Wyższy odsetek komórek NK zawierających IL-4 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD27-, NK CD274-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacjach NK CD335+, NK CD27-, NK CD274+). Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-4 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+).
5. Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka komórek NK zawierających IL-13 pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą. Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-13 stwierdzono w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji NK CD27+).

Powyższe dane zebrano w Tabeli 18.

Tabela 18. Podsumowanie wyników porównania wewnątrzkomórkowej zawartości cytokin komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą

Badana cytokina	**Wykazane różnice pomiędzy grupami**	**Subpopulacja, w której stwierdzono różnice**
TGF-β	[%] K>RRMS	NK CD335+, NK CD27+, NK CD27-
	[%] K>PPMS	NK CD335+
	MFI: K>PPMS	NK CD335+
	MFI: PPMS>K	NK CD274-
IFN-γ	[%] K>RRMS	NK $CD56^{bright}$, NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-
	[%] K>PPMS	NK $CD56^{bright}$, NK CD335+, NK CD27-
IL-10	[%] K>RRMS	NK $CD56^{bright}$, NK CD335+, NK CD27-
	MFI: K>RRMS	NK $CD56^{bright}$, NK CD335+
	MFI: PPMS>RRMS	NK CD27+
IL-4	[%] K>RRMS	NK CD27-, NK CD274-
	[%] K>PPMS	NK CD335+, NK CD27-, NK CD274+
	MFI: K>PPMS	NK CD335+
IL-13	MFI: PPMS>RRMS	NK CD27+

6.2. Wnioski

1. Komórki NK pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego nie różnią się pod względem odsetka danego fenotypu od siebie oraz od komórek NK osób zdrowych. Różnice fenotypowe można stwierdzić jedynie na podstawie analizy MFI.

2. Komórki NK pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego różnią się od komórek NK zdrowych osób zawartością granzymu B i K, ale nie perforyny. Komórki NK pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego nie różnią się od siebie pod względem zawartości enzymów cytolitycznych.

3. Komórki NK pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego różnią się od komórek NK zdrowych osób zawartością TGF-β, IFN-γ, IL-10 i IL-4, ale nie IL-13. Komórki NK pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego różnią się od siebie pod względem zawartości cytokin jedynie w zakresie MFI.

4. Komórki NK pacjentów z rzutowo-remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego, poprzez mniejszą zawartość cytokin przeciwzapalnych mogą wykazywać osłabioną funkcję regulatorową w porównaniu do komórek NK zdrowych osób.

7. Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Stwardnienie rozsiane jest najczęstszą zapalno-demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego – szacuje się, że na całym świecie dotyczy ona około 2,9 mln ludzi. Polska należy do krajów o wysokim wskaźniku chorobowości MS. Bezpośrednia przyczyna tej choroby jest nieznana, określono natomiast czynniki ryzyka jej rozwoju. Do czynników niemodyfikowalnych zalicza się płeć żeńską, wiek pomiędzy 20 a 35 rokiem życia oraz czynniki genetyczne i infekcje wirusowe, szczególnie EBV. Do najbardziej istotnych modyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju MS zalicza się palenie papierosów, niski poziom witaminy D3 oraz otyłość w okresie dojrzewania. Wyróżnia się następujące postacie choroby: aktywny kliniczne izolowany zespół, postać rzutowo-remisyjna, pierwotnie postępująca i wtórnie postępująca. Rozpoznanie stawia się na podstawie stwierdzenia współistnienia rozsiania w czasie i przestrzeni, z wykorzystaniem kryteriów McDonalda z roku 2017.

Stwardnienie rozsiane jest chorobą autoimmunologiczną, o nie do końca poznanej patogenezie. Reakcja autoimmunologiczna wynika z zaburzenia tolerancji immunologicznej, czyli równowagi pomiędzy aktywnością zapalną – efektorową i regulatorową. Głównymi i najlepiej przebadanymi grupami komórek zaangażowanymi w rozwój MS są limfocyty T CD4+, limfocyty T CD8+ oraz limfocyty B. Ostatnie lata przyniosły nowe dane o udziale w patogenezie MS elementów odpowiedzi nieswoistej - komórek mieloidalnych, astrocytów, mikrogleju, komórek dendrytycznych i komórek NK.

Komórki NK to duże ziarniste limfocyty charakteryzowane przez obecność markera powierzchniowego CD56 i brak markera powierzchniowego CD3 ($CD56^{+}$ $CD3^{-}$). Stanowią średnio 10% limfocytów krwi obwodowej i są jednym z głównych składników odporności wrodzonej. Komórki NK są częścią pierwszej linii obrony organizmu i odgrywają kluczową rolę w zabijaniu komórek zainfekowanych patogenem i komórek nowotworowych. Istnieje tradycyjny podział komórek NK na dwie główne subpopulacje ze względu na poziom ekspresji markera powierzchniowego CD56 – NK $CD56^{bright}$ o dużej ekspresji CD56 i NK $CD56^{dim}$ – o małej ekspresji CD56. Stwierdzenie obecności lub braku innych markerów na powierzchni komórek NK może służyć do wyróżniania różnych subpopulacji. Funkcja komórki NK jest determinowana

przez potencjał do uwalniania ziarnistości cytotoksycznych, cytotoksyczność zależną od przeciwciał, interakcje z receptorami programowanej śmierci czy też zdolność do uwalniania cytokin. Ze względu na efekt jaki dają, komórki NK można podzielić na dwie główne grupy: cytotoksyczne i regulatorowe.

Wyniki wielu badań świadczą o udziale komórek NK w patogenezie MS, ale wnioski z nich nie są jednoznaczne. Wskazują bowiem na dwa przeciwstawne kierunki działania komórek NK: ochronny – regulatorowy, zmniejszający objawy MS i patogenny – wzmagający odpowiedź autoimmunologiczną, promujący zaostrzenia.

Cel pracy

Celem pracy jest ocena znaczenia komórek NK w patogenezie stwardnienia rozsianego poprzez ocenę różnic w fenotypie, wydzielaniu enzymów litycznych i cytokin oraz funkcji komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS, pierwotnie postępującą postacią MS i grupą kontrolną.

Pacjenci, materiał i metody

Grupę badaną stanowiło 35 chorych na stwardnienie rozsiane, diagnozowanych w Klinice Neurologii z Pododdziałem Leczenia Udaru Mózgu oraz Poradni Neurologicznej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie. Kryteria włączenia do badania obejmowały: wiek powyżej 18 roku życia, możliwość wyrażenia świadomej zgody na badanie, brak jakiejkolwiek terapii immunomodulującej w przeszłości oraz obecnie, brak leczenia immunosupresyjnego w przeszłości oraz obecnie, odstęp od sterydoterapii wynoszący co najmniej 8 tygodni, brak rzutu choroby lub zaostrzenia w ciągu ostatnich 8 tygodni, brak aktywnej infekcji przewlekłej, brak jakiejkolwiek infekcji w ciągu ostatnich 4 tygodni.

Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych osób. Grupę dobrano pod względem struktury płci i wieku zbliżonej do grupy badanej. Zdrowi ochotnicy byli rekrutowani spośród pracowników Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie i Uniwersytetu Rzeszowskiego. Warunkami kwalifikacji do badania były: wiek powyżej 18 roku życia, możliwość wyrażenia świadomej zgody na badanie, brak stwierdzonych chorób autoimmunologicznych, brak stosowania leków mających wpływ na układ immunologiczny, brak aktywnej przewlekłej infekcji, brak infekcji w ciągu ostatnich 4 tygodni.

Materiałem do badań była krew żylna. Analizę materiału przeprowadzono w laboratorium Zakładu Immunologii Człowieka Instytutu Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Obejmowała ona przygotowanie próbek do cytometrii przepływowej poprzez izolację komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, zakładanie hodowli komórkowych, a następnie oznaczanie markerów powierzchniowych (CD56, CD335, CD27, CD274, CD73) i wewnątrzkomórkowych (granzym B, granzym K, perforyna, TGF-β, IFN-γ, IL-10, IL-4, IL-13). Analizę cytometryczną przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego Amnis® CellStream® (Cytek Biosciences). Wyniki opracowano w programie Cell Stream Analyzer w wersji 1.5.17. Odnotowano odsetek poszczególnych subpopulacji komórek oraz medianę intensywności fluorescencji.

Bazę danych i badania statystyczne przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie komputerowe Statistica 9.1 (StatSoft, Polska).

Badania wykonano po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Izbie Lekarskiej w Rzeszowie zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez Komisję (decyzja nr 85/2023/B).

Wyniki

Do badania zakwalifikowano 35 pacjentów z rozpoznanym stwardnieniem rozsianym. W grupie badanej było 28 kobiet (80%) oraz 7 mężczyzn (20%). Wiek pacjentów w grupie badanej wynosił od 20 do 65 lat. Mediana dla wieku pacjentów wyniosła 41 lat. U 22 pacjentów rozpoznano rzutowo-remisyjną postać stwardnienia rozsianego (63%), u 13 postać pierwotnie postępującą stwardnienia rozsianego (37%).

W grupie pacjentów z rozpoznaną postacią rzutowo-remisyjną MS było 18 kobiet (82%) i 4 mężczyzn (18%) w wieku od 20 do 53 lat. Mediana dla wieku pacjentów w tej grupie wyniosła 33 lata. W grupie pacjentów z rozpoznaną postacią pierwotnie postępującą MS było 10 kobiet (77%) i 3 mężczyzn (23%) w wieku od 40 do 65 lat. Mediana dla wieku pacjentów w tej grupie wyniosła 52 lata.

Do grupy kontrolnej początkowo zakwalifikowano 15 zdrowych osób - 12 kobiet (80%) i 3 mężczyzn (20%) w wieku od 23 do 65 lat (mediana 40 lat). W skład grupy kontrolnej poddanej pełnej analizie ostatecznie weszło 12 zdrowych osób. Wśród nich 9

stanowiły kobiety (75%) a 3 mężczyźni (25%). Wiek uczestników grupy kontrolnej wynosił od 23 do 65 lat. Mediana dla wieku uczestników tej grupy wyniosła 41,5 roku.

Analizę danych rozpoczęto od porównania immunofenotypu komórek NK pomiędzy trzema grupami: pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS, pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS i zdrową kontrolą. Analiza ta miała na celu stwierdzenie czy badane grupy różnią się w zakresie subpopulacji NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335-, NK CD335+, NK CD27-, NK CD27+, NK CD274-, NK CD274+, NK CD73-, NK CD73+.

Nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku żadnej z badanych subpopulacji komórek NK pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą. Nie stwierdzono istotnych różnic w MFI subpopulacji komórek NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-, NK CD73- i NK CD73+ pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą. Stwierdzono wyższe MFI subpopulacji NK CD335+ w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS i w grupie pacjentów z RRMS względem grupy pacjentów z PPMS. Stwierdzono wyższe MFI subpopulacji NK CD27+ w grupie kontrolnej względem grup pacjentów z RRMS i PPMS. Stwierdzono większą wartość MFI subpopulacji komórek NK CD274+ w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS.

W drugim etapie analizy danych porównano odsetek i MFI subpopulacji komórek NK zawierających poszczególne enzymy lityczne (granzym B, granzym K, perforyna) i cytokiny (TGF-β, IFN-γ, IL-10, IL-4, IL-13) pomiędzy trzema grupami: pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią MS, pacjentów z pierwotnie postępującą postacią MS oraz kontrolą. Analiza ta miała na celu stwierdzenie czy badane grupy różnią się w zakresie potencjalnych funkcji komórek NK.

Stwierdzono wyższy odsetek komórek NK zawierających granzym B u pacjentów z RRMS względem grupy kontrolnej (w subpopulacjach NK CD27+ i NK CD73-).

Stwierdzono wyższy odsetek komórek NK zawierających granzym K w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji NK $CD56^{bright}$) i w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD27-). Wyższe MFI komórek NK zawierających granzym K zaobserwowano w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK $CD56^{dim}$).

Nie stwierdzono różnic w odsetku i MFI komórek NK zawierających perforynę pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą.

Wyższy odsetek komórek NK zawierających TGF-β stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD335+, NK CD27+, NK CD27-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+). Wyższe MFI komórek NK zawierających TGF-β stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+) i w grupie pacjentów z PPMS względem grupy kontrolnej (w subpopulacji NK CD274-).

Wyższy odsetek komórek NK zawierających IFN-γ stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK $CD56^{bright}$, NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacjach NK $CD56^{bright}$, NK CD335+, NK CD27-).

Stwierdzono wyższy odsetek komórek NK zawierających IL-10 w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK $CD56^{bright}$, NK CD335+, NK CD27-). Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-10 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK $CD56^{bright}$, NK CD335+) oraz w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji komórek NK CD27+).

Wyższy odsetek komórek NK zawierających IL-4 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacjach NK CD27-, NK CD274-) oraz w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacjach NK CD335+, NK CD27-, NK CD274+). Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-4 stwierdzono w grupie kontrolnej względem grupy pacjentów z PPMS (w subpopulacji NK CD335+).

Nie stwierdzono różnic w zakresie odsetka komórek NK zawierających IL-13 pomiędzy pacjentami z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą. Wyższe MFI komórek NK zawierających IL-13 stwierdzono w grupie pacjentów z PPMS względem grupy pacjentów z RRMS (w subpopulacji NK CD27+).

Wnioski

1. Komórki NK pacjentów z RRMS i PPMS nie różnią się pod względem odsetka danego fenotypu od siebie oraz od komórek NK osób zdrowych. Różnice fenotypowe można stwierdzić jedynie na podstawie analizy MFI.

2. Komórki NK pacjentów z RRMS, PPMS różnią się od komórek NK zdrowych osób zawartością granzymu B i K, ale nie perforyny. Komórki NK pacjentów z RRMS i PPMS nie różnią się od siebie pod względem zawartości enzymów cytolitycznych.

3. Komórki NK pacjentów z RRMS, PPMS różnią się od komórek NK zdrowych osób zawartością TGF-β, IFN-γ, IL-10 i IL-4, ale nie IL-13. Komórki NK pacjentów z RRMS i PPMS różnią się od siebie pod względem zawartości cytokin jedynie w zakresie MFI.

4. Komórki NK pacjentów z RRMS i PPMS poprzez mniejszą zawartość cytokin przeciwzapalnych mogą wykazywać osłabioną funkcję regulatorową w porównaniu do komórek NK zdrowych osób.

Słowa kluczowe: stwardnienie rozsiane, komórki NK, odporność nieswoista

8. Streszczenie w języku angielskim

Introduction

Multiple sclerosis is the most common inflammatory demyelinating disease of the central nervous system; it is estimated to affect approximately about 2.9 million people worldwide. Poland is one of the countries with a high MS prevalence rate. The direct cause of this disease is unknown, but the risk factors for its development have been identified. The non-modifiable factors include the female gender, age between 20 and 35 years, genetic factors, and viral infections, especially EBV. The major modifiable risk factors for the development of MS include cigarette smoking, low vitamin D_3 levels, and obesity in adolescence. The following forms of the disease can be distinguished: active clinically isolated syndrome, relapsing-remitting form, primary progressive form, and secondary progressive disease. The diagnosis is made by detection of the coexistence of dissemination in time and space using the McDonald criteria established in 2017.

Multiple sclerosis is an autoimmune disease with incompletely elucidated pathogenesis. Autoimmune reaction results from disturbances in immune tolerance, i.e. the balance between effector and regulatory inflammatory activity. The main and best studied groups of cells involved in the development of MS are CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, and B lymphocytes. Recent research has provided new data on the involvement of elements of nonspecific response, i.e. myeloid cells, astrocytes, microglia, dendritic cells, and NK cells, in the pathogenesis of MS.

NK cells are large granular lymphocytes characterised by the presence of the CD56 surface marker and the absence of the CD3 surface marker ($CD56^+ CD3^-$). They constitute on average 10% of peripheral blood lymphocytes and are one of the main components of innate immunity. NK cells are part of the body's first line of defence and play a key role in killing pathogen-infected cells and cancer cells. NK cells are traditionally divided into two main subpopulations based on the level of expression of the CD56 surface marker: NK $CD56^{bright}$ with high CD56 expression and NK $CD56^{dim}$ with low CD56 expression. The presence or absence of other markers on the surface of NK cells can help to distinguish different subpopulations. The function of NK cells is determined by the potential to release cytotoxic granules, antibody-dependent cytotoxicity, interactions with programmed death receptors, or the ability to release cytokines. Given their effects, they can be divided into two main groups: cytotoxic and regulatory NK cells.

The results of many studies indicate the involvement of NK cells in the pathogenesis of MS; however, the conclusions of these investigations are not clear-cut. They indicate two opposing trends in the action of NK cells: protective – regulatory effects reducing MS symptoms and pathogenic – enhancing the autoimmune response and promoting exacerbation.

Research aim

The aim of the study was to assess the role of NK cells in the pathogenesis of multiple sclerosis by evaluation of differences in the phenotype and the secretion of lytic enzymes and cytokines. Additionally, differences in the NK cell function between patients with relapsing-remitting MS, primary progressive MS, and the control group were determined.

Patients, material, and methods

The study group consisted of 35 patients with multiple sclerosis diagnosed in the Neurology Clinic with Brain Stroke Sub-unit and the Neurology Clinic of the Clinical Provincial Hospital No. 2 in Rzeszów. The inclusion criteria for the study were age above 18 years, the ability to express informed consent to the study, no past or present immunomodulatory therapy, no past or present immunosuppressive treatment, at least an 8-week interval from steroid therapy, no relapse or exacerbation of the disease in the last 8 weeks, no active chronic infection, and no infection in the last 4 weeks.

The control group comprised 15 healthy individuals. In terms of the gender and age structure, it was similar to the study group. The healthy volunteers were recruited among the employees of the Clinical Provincial Hospital No. 2 in Rzeszów and the University of Rzeszów. The criteria for qualification for the study were age over 18 years, the ability to express informed consent to the study, no diagnosed autoimmune diseases, no use of drugs affecting the immune system, no active chronic infection, and no infection in the last 4 weeks.

Venous blood was the study material. It was analysed in the laboratory of the Department of Human Immunology, Institute of Medical Sciences, University of Rzeszów. The procedures included preparation of samples for flow cytometry through isolation of peripheral blood mononuclear cells, establishment of cell cultures, and determination of surface markers (CD56, CD335, CD27, CD274, CD73) and intracellular markers (granzyme B, granzyme K, perforin, TGF-β, IFN-γ, IL-10, IL-4, IL-13). The flow

cytometry analysis was performed using an Amnis® CellStream® flow cytometer (Cytek Biosciences). The results were processed in Cell Stream Analyzer version 1.5.17. The percentage of individual cell subpopulations and the median fluorescence intensity were recorded during the study.

The database and statistical studies were performed using Statistica 9.1 software (StatSoft, Poland).

The study was performed with the consent of the Bioethics Committee at the Medical Chamber in Rzeszów in accordance with the protocol accepted by the Committee (decision no. 85/2023/B).

Results

The study involved 35 patients with diagnosed multiple sclerosis. The study group included 28 females (80%) and 7 males (20%). The age of the patients in the study group ranged from 20 to 65 years. The median age of the patients was 41 years. Relapsing-remitting multiple sclerosis (63%) was diagnosed in 22 patients, while the other patients (13 - 37%) were diagnosed with primary progressive multiple sclerosis.

The group of patients diagnosed with relapsing-remitting MS comprised 18 females (82%) and 4 males (18%) aged from 20 to 53 years. The median age of the patients in this group was 33 years. In turn, the group of patients with primary progressive MS consisted of 10 females (77%) and 3 males (23%) aged from 40 to 65 years, with the median age of 52 years.

The control group was initially composed of 15 healthy subjects: 12 females (80%) and 3 males (20%) aged from 23 to 65 years (median: 40 years). The control group, which was subjected to full analysis, ultimately included 12 healthy individuals. In this group, there were 9 females (75%) and 3 males (25%). The age of the control group participants ranged from 23 to 65 years. The median age of the participants in this group was 41.5 years.

The analysis of the data started with a comparison of the immunophenotype of NK cells between three groups: patients with relapsing-remitting MS, patients with primary progressive MS, and healthy controls. This analysis aimed at determination of potential differences between the groups in terms of their subpopulations of NK $CD56^{bright}$, NK

$CD56^{dim}$, NK CD335-, NK CD335+, NK CD27-, NK CD27+, NK CD274-, NK CD274+, NK CD73-, and NK CD73+.

No significant differences were observed in the percentage of any of the NK cell subpopulations between the patients with RRMS, those with PPMS, and the healthy controls. There were no significant differences in the MFI of the NK CD335-, NK CD27-, NK CD274-, NK CD73-, and NK CD73+ subpopulations between the RRMS patients, the PPMS patients, and the healthy controls. Higher MFI of the NK CD335+ subpopulation was obtained in the control group compared to the PPMS group and in the RRMS group *versus* the PPMS group. The MFI of the NK CD27+ subpopulation was higher in the control group than in the RRMS and PPMS groups. Higher MFI of the NK CD274+ subpopulation was detected in the PPMS group compared to the RRMS patients.

In the second stage of the data analysis, the percentage and MFI of NK cell subpopulations containing individual lytic enzymes (granzyme B, granzyme K, perforin) and cytokines (TGF-β, IFN-γ, IL-10, IL-4, IL-13) were compared between the three groups: patients with relapsing-remitting MS, patients with primary progressive MS, and controls. This analysis aimed to determine whether these groups differ in the potential functions of NK cells.

A higher percentage of NK cells containing granzyme B was found in the RRMS patients compared to the control group (in the NK CD27+ and NK CD73- subpopulations).

The percentage of NK cells containing granzyme K was higher in the control group than in the RRMS patients (in the NK $CD56^{bright}$ subpopulation) and in the control group compared to the PPMS patients (in the NK CD27- subpopulation). Higher MFI of granzyme K-containing NK cells was observed in the control group than in the PPMS group (in the NK $CD56^{dim}$ subpopulation).

There was no difference in the percentage and MFI of perforin-containing NK cells between the RRMS patients, the PPMS patients, and the healthy controls.

The percentage of TGF-β-containing NK cells was higher in the control group compared to the RRMS patients (in the NK CD335+, NK CD27+, and NK CD27- subpopulations) and in the control group *versus* the PPMS group (in the NK CD335+ subpopulation). Higher MFI of TGF-β-containing NK cells was observed in the control group than in the

PPMS patients (in the NK CD335+ subpopulation) and in the PPMS group than in the control group (in the NK CD274- subpopulation).

The percentage of IFN-γ-containing NK cells was higher in the control group than in the RRMS group (in the NK $CD56^{bright}$, NK CD335-, NK CD27-, and NK CD274- subpopulations) and in the control group *versus* the PPMS patients (in the $CD56^{bright}$, NK CD335+, and NK CD27- subpopulations).

The percentage of IL-10-containing NK cells was higher in the control group than in the RRMS patients (in the NK $CD56^{bright}$, NK CD335+, and NK CD27- subpopulations). The MFI of IL-10-containing NK cells was higher in the control group compared to the RRMS patients (in the NK $CD56^{bright}$ and NK CD335+ subpopulations) and in the PPMS patients than in the RRMS group (in the NK CD27+ subpopulation).

A higher percentage of IL-4-containing NK cells was found in the control group than in the group of patients with RRMS (in the NK CD27- and NK CD274- subpopulations) and in the control group *versus* the PPMS patients (in the NK CD335+, NK CD27-, and NK CD274+ subpopulations). The MFI of IL-4-containing NK cells was higher in the control group *versus* to the group of PPMS patients (in the NK CD335+ subpopulation).

There were no differences in the percentage of IL-13-containing NK cells between the RRMS patients, the PPMS group, and the healthy controls. The MFI of IL-13-containing NK cells was higher in the PPMS group than in the RRMS patients (in the NK CD27+ subpopulation).

Conclusions

1. NK cells from patients with RRMS and PPMS do not differ in the percentage of a given phenotype from each other or from NK cells sampled from healthy individuals. Phenotypic differences can only be determined based on MFI analysis.

2. NK cells from patients with RRMS and PPMS differ from NK cells originating from healthy individuals in the content of granzyme B and K, but not perforin. NK cells from RRMS and PPMS patients do not differ from each other in the content of cytolytic enzymes.

3. NK cells from RRMS and PPMS patients differ from NK cells of healthy individuals in the content of TGF-β, IFN-γ, IL-10, and IL-4, but not IL-13. NK cells from patients

with RRMS and PPMS differ from each other in the content of cytokines only in terms of MFI.

4. NK cells from patients with RRMS and PPMS may exhibit a weakened regulatory function due to the lower content of anti-inflammatory cytokines compared to NK cells from healthy individuals.

Keywords: multiple sclerosis, NK cells, innate immunity

9. Piśmiennictwo

1. Kobelt G, Thompson A, Berg J, et al. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. Mult Scler2017; 23: 1123–36.
2. MS International Federation. Atlas of MS. www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms#about [Internet]. Number of people with MS; [cytowane 30 maja 2024]. Dostępny w: https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms#about
3. Departament Analiz Ministerstwa Zdrowia. www.analizy.mz.gov.pl/html/zpa_sm/chorobowosc [Internet]. Chorobowość stwardnienia rozsianego w Polsce; [cytowane 07 czerwca 2024]. Dostępny w: http://www.analizy.mz.gov.pl/html/zpa_sm/chorobowosc
4. Trojano M, Lucchese G, Graziano G, et. al. Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. PLoS One. 2012;7(10):e48078. doi: 10.1371/journal.pone.0048078. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23133550; PMCID: PMC3485003.
5. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA. Multiple sclerosis. Nat Rev Dis Primers. 2018 Nov 8;4(1):43. doi: 10.1038/s41572-018-0041-4. Erratum in: Nat Rev Dis Primers. 2018 Nov 22;4(1):49. PMID: 30410033.
6. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. Lancet. 2018 Apr 21;391(10130):1622-1636. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30481-1. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29576504.
7. Cotsapas C, Mitrovic M. Genome-wide association studies of multiple sclerosis. Clin Transl Immunology. 2018 May 31;7(6):e1018. doi: 10.1002/cti2.1018. Erratum in: Clin Transl Immunology. 2018 Aug 16;7(8):e1038. PMID: 29881546; PMCID: PMC5983059.
8. Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Apr 2;8(4):a029025. doi: 10.1101/cshperspect.a029025. PMID: 29358315; PMCID: PMC5880159.
9. Canto E, Oksenberg JR. Multiple sclerosis genetics. Mult Scler. 2018 Jan;24(1):75-79. doi: 10.1177/1352458517737371. PMID: 29307290.
10. Multiple sclerosis susceptibility to, 2; MS2, cytogenetic location: 10p15.1. An online catalog of human genes and genetic disorders [Internet]; [cytowane 16 grudnia 2023]. Dostępny w: https://www.omim.org/entry/612594?search=10p15.1&highlight=10p151
11. Multiple sclerosis susceptibility to, 3; MS3, cytogenetic location: 5p13.2. An online catalog of human genes and genetic disorders [Internet]; [cytowane 16 grudnia 2023]. Dostępny w: https://www.omim.org/entry/612595?search=multiple%20sclerosis&highlight=%28multiple%7Cmultiplicity%29%20sclerosi
12. Multiple sclerosis susceptibility to, 5; MS5, cytogenetic location: 12p13.31. An online catalog of human genes and genetic disorders [Internet]; [cytowane 16 grudnia 2023]. Dostępny

w: https://www.omim.org/entry/614810?search=multiple%20sclerosis&highlight=%28multiple%7Cmultiplicity%29%20sclerosi

13. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. Science. 2019 Sep 27;365(6460):eaav7188. doi: 10.1126/science.aav7188. PMID: 31604244; PMCID: PMC7241648.
14. Burnard S, Lechner-Scott J, Scott RJ. EBV and MS: Major cause, minor contribution or red-herring? Mult Scler Relat Disord. 2017 Aug;16:24-30. doi: 10.1016/j.msard.2017.06.002. Epub 2017 Jun 10. PMID: 28755681.
15. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. Nat Rev Neurol. 2017 Jan;13(1):25-36. doi: 10.1038/nrneurol.2016.187. Epub 2016 Dec 9. PMID: 27934854.
16. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2010 Jun;9(6):599-612. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70086-7. PMID: 20494325.
17. Rasul T, Frederiksen JL. Link between overweight/obese in children and youngsters and occurrence of multiple sclerosis. J Neurol. 2018 Dec;265(12):2755-2763. doi: 10.1007/s00415-018-8869-9. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29700643.
18. Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019 Apr 1;9(4):a028944. doi: 10.1101/cshperspect.a028944. PMID: 29735578; PMCID: PMC6444694.
19. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. Neuron. 2018 Feb 21;97(4):742-768. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.021. PMID: 29470968.
20. Forrester JV, McMenamin PG, Dando SJ. CNS infection and immune privilege. Nat Rev Neurosci. 2018 Nov;19(11):655-671. doi: 10.1038/s41583-018-0070-8. PMID: 30310148.
21. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. Immunity. 2015 Dec 15;43(6):1040-51. doi: 10.1016/j.immuni.2015.12.003. PMID: 26682981.
22. Komuczki J, Tuzlak S, Friebel E, Hartwig T, Spath S, Rosenstiel P, Waisman A, Opitz L, Oukka M, Schreiner B, Pelczar P, Becher B. Fate-Mapping of GM-CSF Expression Identifies a Discrete Subset of Inflammation-Driving T Helper Cells Regulated by Cytokines IL-23 and IL-1β. Immunity. 2019 May 21;50(5):1289-1304.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.04.006. Epub 2019 May 9. PMID: 31079916.
23. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. Nat Immunol. 2018 Jul;19(7):665-673. doi: 10.1038/s41590-018-0120-4. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29925983; PMCID: PMC7882196.
24. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. Nat Immunol. 2018 Jul;19(7):696-707. doi: 10.1038/s41590-018-0135-x. Epub 2018 Jun 20. PMID: 29925992.

25. Prinz M, Priller J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. Nat Neurosci. 2017 Feb;20(2):136-144. doi: 10.1038/nn.4475. Epub 2017 Jan 16. PMID: 28092660.

26. Bar-Or A, Li R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. Lancet Neurol. 2021 Jun;20(6):470-483. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00063-6. Epub 2021 Apr 27. PMID: 33930317.

27. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology. 2014 Jul 15;83(3):278-86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560. Epub 2014 May 28. PMID: 24871874; PMCID: PMC4117366.

28. Lublin FD, Coetzee T, Cohen JA, Marrie RA, Thompson AJ; International Advisory Committee on Clinical Trials in MS. The 2013 clinical course descriptors for multiple sclerosis: A clarification. Neurology. 2020 Jun 16;94(24):1088-1092. doi: 10.1212/WNL.0000000000009636. Epub 2020 May 29. Erratum in: Neurology. 2022 Feb 1;98(5):215. PMID: 32471886; PMCID: PMC7455332.

29. Brownlee WJ, Miller DH. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. J Clin Neurosci. 2014 Dec;21(12):2065-71. doi: 10.1016/j.jocn.2014.02.026. Epub 2014 Jul 11. PMID: 25027666.

30. Katz Sand IB, Lublin FD. Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. Continuum (Minneap Minn). 2013 Aug;19(4 Multiple Sclerosis):922-43. doi: 10.1212/01.CON.0000433290.15468.21. PMID: 23917094.

31. Ontaneda D. Progressive Multiple Sclerosis. Continuum (Minneap Minn). 2019 Jun;25(3):736-752. doi: 10.1212/CON.0000000000000727. PMID: 31162314.

32. Cree BAC, Arnold DL, Chataway J, Chitnis T, Fox RJ, Pozo Ramajo A, Murphy N, Lassmann H. Secondary Progressive Multiple Sclerosis: New Insights. Neurology. 2021 Aug 24;97(8):378-388. doi: 10.1212/WNL.0000000000012323. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34088878; PMCID: PMC8397587.

33. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2007 Oct;6(10):903-12. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70243-0. Erratum in: Lancet Neurol. 2009 Aug;8(8):699. PMID: 17884680.

34. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology. 1983 Nov;33(11):1444-52. doi: 10.1212/wnl.33.11.1444. PMID: 6685237.

35. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol. 2018 Feb;17(2):162-173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29275977.

36. Lorscheider J, Buzzard K, Jokubaitis V, Spelman T, Havrdova E, Horakova D, Trojano M, Izquierdo G, Girard M, Duquette P, Prat A, Lugaresi A, Grand'Maison F, Grammond P, Hupperts R, Alroughani R, Sola P, Boz C, Pucci E, Lechner-Scott J, Bergamaschi R, Oreja-Guevara C, Iuliano G, Van Pesch V, Granella F, Ramo-Tello C, Spitaleri D, Petersen T, Slee M, Verheul F, Ampapa R, Amato MP, McCombe P, Vucic S, Sánchez Menoyo JL, Cristiano E, Barnett MH, Hodgkinson S, Olascoaga J, Saladino ML, Gray O, Shaw C, Moore F, Butzkueven H, Kalincik T; MSBase Study Group. Defining secondary progressive multiple sclerosis. Brain. 2016 Sep;139(Pt 9):2395-405. doi: 10.1093/brain/aww173. Epub 2016 Jul 7. PMID: 27401521.

37. Chaplin DD. 1. Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol. 2003 Feb;111(2 Suppl):S442-59. doi: 10.1067/mai.2003.125. PMID: 12592292.

38. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010 Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022. PMID: 20303872.

39. Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. J Allergy Clin Immunol. 2010 May;125(5):985-92. doi: 10.1016/j.jaci.2010.01.058. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20392481.

40. Beutler BA. TLRs and innate immunity. Blood. 2009 Feb 12;113(7):1399-407. doi: 10.1182/blood-2008-07-019307. Epub 2008 Aug 29. PMID: 18757776; PMCID: PMC2644070.

41. Afshar M, Gallo RL. Innate immune defense system of the skin. Vet Dermatol. 2013 Feb;24(1):32-8.e8-9. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01082.x. PMID: 23331677.

42. Aristizábal B, González Á. Innate immune system. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editors. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. Chapter 2. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459455/

43. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2010 Apr 15;221(1-2):7-14. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.10.015. PMID: 19931190; PMCID: PMC2854189.

44. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2015 Apr;14(4):406-19. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70305-9. PMID: 25792099.

45. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. Nature. 2015 Jan 15;517(7534):293-301. doi: 10.1038/nature14189. PMID: 25592534.

46. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, Powrie F, Spits H. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. Cell. 2018 Aug 23;174(5):1054-1066. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.017. PMID: 30142344.

47. Krabbendam L, Bernink JH, Spits H. Innate lymphoid cells: from helper to killer. Curr Opin Immunol. 2021 Feb;68:28-33. doi: 10.1016/j.coi.2020.08.007. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32971468.

48. Kwong B, Rua R, Gao Y, Flickinger J Jr, Wang Y, Kruhlak MJ, Zhu J, Vivier E, McGavern DB, Lazarevic V. T-bet-dependent NKp46^{+} innate lymphoid cells regulate the onset of T_H17-induced neuroinflammation. Nat Immunol. 2017

Oct;18(10):1117-1127. doi: 10.1038/ni.3816. Epub 2017 Aug 14. Erratum in: Nat Immunol. 2018 Aug;19(8):898. PMID: 28805812; PMCID: PMC5605431.

49. Mair F, Becher B. Thy1+ Sca1+ innate lymphoid cells infiltrate the CNS during autoimmune inflammation, but do not contribute to disease development. Eur J Immunol. 2014 Jan;44(1):37-45. doi: 10.1002/eji.201343653. Epub 2013 Oct 7. PMID: 24105463.

50. Romero-Suárez S, Del Rio Serrato A, Bueno RJ, Brunotte-Strecker D, Stehle C, Figueiredo CA, Hertwig L, Dunay IR, Romagnani C, Infante-Duarte C. The Central Nervous System Contains ILC1s That Differ From NK Cells in the Response to Inflammation. Front Immunol. 2019 Oct 10;10:2337. doi: 10.3389/fimmu.2019.02337. PMID: 31649664; PMCID: PMC6795712.

51. Hirose S, Jahani PS, Wang S, Jaggi U, Tormanen K, Yu J, Kato M, Akbari O, Ghiasi H. Type 2 Innate Lymphoid Cells Induce CNS Demyelination in an HSV-IL-2 Mouse Model of Multiple Sclerosis. iScience. 2020 Sep 10;23(10):101549. doi: 10.1016/j.isci.2020.101549. PMID: 33083718; PMCID: PMC7522755.

52. Hatfield JK, Brown MA. Group 3 innate lymphoid cells accumulate and exhibit disease-induced activation in the meninges in EAE. Cell Immunol. 2015 Oct;297(2):69-79. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.06.006. Epub 2015 Jul 2. PMID: 26163773.

53. Bar-Ephraïm YE, Mebius RE. Innate lymphoid cells in secondary lymphoid organs. Immunol Rev. 2016 May;271(1):185-99. doi: 10.1111/imr.12407. PMID: 27088915.

54. Degn M, Modvig S, Dyring-Andersen B, Bonefeld CM, Frederiksen JL, Geisler C, von Essen MR. Increased prevalence of lymphoid tissue inducer cells in the cerebrospinal fluid of patients with early multiple sclerosis. Mult Scler. 2016 Jul;22(8):1013-20. doi: 10.1177/1352458515609795. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26453677.

55. Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. Nat Rev Immunol. 2018 Nov;18(11):671-688. doi: 10.1038/s41577-018-0061-z. Erratum in: Nat Rev Immunol. 2018 Oct 12;: PMID: 30209347.

56. Liu CC, Perussia B, Cohn ZA, Young JD. Identification and characterization of a pore-forming protein of human peripheral blood natural killer cells. J Exp Med. 1986 Dec 1;164(6):2061-76. doi: 10.1084/jem.164.6.2061. PMID: 3097239; PMCID: PMC2188475.

57. Luetke-Eversloh M, Cicek BB, Siracusa F, Thom JT, Hamann A, Frischbutter S, Baumgrass R, Chang HD, Thiel A, Dong J, Romagnani C. NK cells gain higher IFN-γ competence during terminal differentiation. Eur J Immunol. 2014 Jul;44(7):2074-84. doi: 10.1002/eji.201344072. Epub 2014 May 19. PMID: 24752800.vi

58. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science. 2011 Jan 7;331(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687. PMID: 21212348; PMCID: PMC3089969.

59. Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. Nat Immunol. 2016 Aug 19;17(9):1025-36. doi: 10.1038/ni.3518. PMID: 27540992.

60. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, Blees H, Cabeza-Cabrerizo M, Sammicheli S, Rogers NC, Sahai E, Zelenay S, Reis e Sousa C. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. Cell. 2018 Feb 22;172(5):1022-1037.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.004. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29429633; PMCID: PMC5847168.

61. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Björklund AT, Flodström-Tullberg M, Michaëlsson J, Rottenberg ME, Guzmán CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. Blood. 2010 Nov 11;116(19):3853-64. doi: 10.1182/blood-2010-04-281675. Epub 2010 Aug 9. PMID: 20696944.

62. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. Annu Rev Immunol. 1996;14:619-48. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.619. PMID: 8717527.

63. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. Nat Rev Immunol. 2003 Oct;3(10):781-90. doi: 10.1038/nri1199. PMID: 14523385.

64. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. Front Immunol. 2019 May 7;10:909. doi: 10.3389/fimmu.2019.00909. PMID: 31134055; PMCID: PMC6514059.

65. Wu SY, Fu T, Jiang YZ, Shao ZM. Natural killer cells in cancer biology and therapy. Mol Cancer. 2020 Aug 6;19(1):120. doi: 10.1186/s12943-020-01238-x. PMID: 32762681; PMCID: PMC7409673.

66. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. Immunity. 2017 Nov 21;47(5):820-833. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.008. PMID: 29166586; PMCID: PMC5728700.

67. Smith SL, Kennedy PR, Stacey KB, Worboys JD, Yarwood A, Seo S, Solloa EH, Mistretta B, Chatterjee SS, Gunaratne P, Allette K, Wang YC, Smith ML, Sebra R, Mace EM, Horowitz A, Thomson W, Martin P, Eyre S, Davis DM. Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing. Blood Adv. 2020 Apr 14;4(7):1388-1406. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000699. PMID: 32271902; PMCID: PMC7160259.

68. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park IK, Liu S, McClory S, Marcucci G, Trotta R, Caligiuri MA. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. Blood. 2010 Jan 14;115(2):274-81. doi: 10.1182/blood-2009-04-215491. Epub 2009 Nov 6. PMID: 19897577; PMCID: PMC2808153.

69. Béziat V, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadière B, Debré P, Vieillard V. CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. J Immunol. 2011 Jun 15;186(12):6753-61. doi: 10.4049/jimmunol.1100330. Epub 2011 May 9. PMID: 21555534.

70. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001 Nov;22(11):633-40. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9. PMID: 11698225.

71. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. Eur J Immunol. 2001 Oct;31(10):3121-7. doi: 10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::aid-immu3121>3.0.co;2-4. PMID: 11592089.

72. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechser M, Goodsaid F, Caligiuri MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. J Immunol. 1999 Apr 15;162(8):4511-20. PMID: 10201989.

73. Krebs P, Peng H, Duhan V. Editorial: Natural killer cell plasticity and diversity in antiviral immunity. Front Immunol. 2023 Mar 14;14:1175111. doi: 10.3389/fimmu.2023.1175111. PMID: 36999011; PMCID: PMC10043422.

74. Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. Immunology. 2014 Apr;141(4):483-9. doi: 10.1111/imm.12224. PMID: 24303897; PMCID: PMC3956422

75. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. Front Immunol. 2018 Aug 13;9:1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869. PMID: 30150991; PMCID: PMC6099181.

76. Sun H, Sun C, Xiao W, Sun R. Tissue-resident lymphocytes: from adaptive to innate immunity. Cell Mol Immunol. 2019 Mar;16(3):205-215. doi: 10.1038/s41423-018-0192-y. Epub 2019 Jan 11. PMID: 30635650; PMCID: PMC6460493.

77. Berhani O, Glasner A, Kahlon S, Duev-Cohen A, Yamin R, Horwitz E, Enk J, Moshel O, Varvak A, Porgador A, Jonjic S, Mandelboim O. Human anti-NKp46 antibody for studies of NKp46-dependent NK cell function and its applications for type 1 diabetes and cancer research. Eur J Immunol. 2019 Feb;49(2):228-241. doi: 10.1002/eji.201847611. Epub 2018 Dec 17. PMID: 30536875.

78. Chester C, Fritsch K, Kohrt HE. Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2015 Dec 2;6:601. doi: 10.3389/fimmu.2015.00601. PMID: 26697006; PMCID: PMC4667030.

79. Han BK, Olsen NJ, Bottaro A. The CD27-CD70 pathway and pathogenesis of autoimmune disease. Semin Arthritis Rheum. 2016 Feb;45(4):496-501. doi: 10.1016/j.semarthrit.2015.08.001. Epub 2015 Aug 11. PMID: 26359318.

80. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331. PMID: 18173375; PMCID: PMC10637733.

81. Chatterjee D, Tufa DM, Baehre H, Hass R, Schmidt RE, Jacobs R. Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. Blood.

2014 Jan 23;123(4):594-5. doi: 10.1182/blood-2013-09-524827. PMID: 24458278.pd-1

82. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. Nat Rev Immunol. 2015 Jun;15(6):388-400. doi: 10.1038/nri3839. PMID: 25998963.

83. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. Nat Immunol. 2005 Jun;6(6):600-7. doi: 10.1038/ni1197. Epub 2005 Apr 24. PMID: 15852008.

84. Ostapchuk YO, Cetin EA, Perfilyeva YV, Yilmaz A, Skiba YA, Chirkin AP, Omarbaeva NA, Talaeva SG, Belyaev NN, Deniz G. Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF-β in healthy donors and breast cancer patients. Cell Immunol. 2015 Nov-Dec;298(1-2):37-46. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.09.002. Epub 2015 Sep 5. PMID: 26362675.

85. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol. 2004 Feb;75(2):163-89. doi: 10.1189/jlb.0603252. Epub 2003 Oct 2. PMID: 14525967.

86. Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. J Allergy Clin Immunol. 2003 Apr;111(4):677-90; quiz 691. doi: 10.1067/mai.2003.1333. PMID: 12704343.

87. de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. J Allergy Clin Immunol. 1998 Aug;102(2):165-9. doi: 10.1016/s0091-6749(98)70080-6. PMID: 9723655

88. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. Immunology. 2018 Jun;154(2):186-195. doi: 10.1111/imm.12910. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29455468; PMCID: PMC5980179.

89. Cooney LA, Fox DA. Regulation of Th17 maturation by interleukin 4. Crit Rev Immunol. 2013;33(5):379-87. doi: 10.1615/critrevimmunol.2013007096. PMID: 24099299.

90. Newcomb DC, Zhou W, Moore ML, Goleniewska K, Hershey GK, Kolls JK, Peebles RS Jr. A functional IL-13 receptor is expressed on polarized murine CD4+ Th17 cells and IL-13 signaling attenuates Th17 cytokine production. J Immunol. 2009 May 1;182(9):5317-21. doi: 10.4049/jimmunol.0803868. PMID: 19380778; PMCID: PMC3711250.

91. Dogra P, Rancan C, Ma W, Toth M, Senda T, Carpenter DJ, Kubota M, Matsumoto R, Thapa P, Szabo PA, Li Poon MM, Li J, Arakawa-Hoyt J, Shen Y, Fong L, Lanier LL, Farber DL. Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence. Cell. 2020 Feb 20;180(4):749-763.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.01.022. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32059780; PMCID: PMC7194029.

92. Korin B, Ben-Shaanan TL, Schiller M, Dubovik T, Azulay-Debby H, Boshnak NT, Koren T, Rolls A. High-dimensional, single-cell characterization of the brain's immune compartment. Nat Neurosci. 2017 Sep;20(9):1300-1309. doi: 10.1038/nn.4610. Epub 2017 Jul 24. PMID: 28758994.

93. Mrdjen D, Pavlovic A, Hartmann FJ, Schreiner B, Utz SG, Leung BP, Lelios I, Heppner FL, Kipnis J, Merkler D, Greter M, Becher B. High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. Immunity. 2018 Feb 20;48(2):380-395.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.011. Epub 2018 Feb 6. Erratum in: Immunity. 2018 Mar 20;48(3):599. PMID: 29426702.

94. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. J Immunol. 2006 Feb 1;176(3):1517-24. doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1517. PMID: 16424180.

95. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Rünzi A, Kuhlmann T, Posevitz-Fejfár A, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Herich S, Held K, Konjević M, Hartwig M, Dornmair K, Hohlfeld R, Ziemssen T, Klotz L, Meuth SG, Wiendl H. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 May 24;113(21):E2973-82. doi: 10.1073/pnas.1524924113. Epub 2016 May 9. PMID: 27162345; PMCID: PMC4889377.

96. Schafflick D, Xu CA, Hartlehnert M, Cole M, Schulte-Mecklenbeck A, Lautwein T, Wolbert J, Heming M, Meuth SG, Kuhlmann T, Gross CC, Wiendl H, Yosef N, Meyer Zu Horste G. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. Nat Commun. 2020 Jan 14;11(1):247. doi: 10.1038/s41467-019-14118-w. PMID: 31937773; PMCID: PMC6959356.

97. Lepennetier G, Hracsko Z, Unger M, Van Griensven M, Grummel V, Krumbholz M, Berthele A, Hemmer B, Kowarik MC. Cytokine and immune cell profiling in the cerebrospinal fluid of patients with neuro-inflammatory diseases. J Neuroinflammation. 2019 Nov 14;16(1):219. doi: 10.1186/s12974-019-1601-6. PMID: 31727097; PMCID: PMC6857241.

98. Gan Y, Liu R, Wu W, Bomprezzi R, Shi FD. Antibody to α4 integrin suppresses natural killer cells infiltration in central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol. 2012 Jun 15;247(1-2):9-15. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.03.011. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22503411; PMCID: PMC3351567.

99. Yao X, Matosevic S. Chemokine networks modulating natural killer cell trafficking to solid tumors. Cytokine Growth Factor Rev. 2021 Jun;59:36-45. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.12.003. Epub 2021 Jan 16. PMID: 33495094.

100. Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren HG, Biron CA, Littman DR, Ransohoff RM. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. FASEB J. 2006 May;20(7):896-905. doi: 10.1096/fj.05-5465com. PMID: 16675847.

101. Garofalo S, Cocozza G, Porzia A, Inghilleri M, Raspa M, Scavizzi F, Aronica E, Bernardini G, Peng L, Ransohoff RM, Santoni A, Limatola C. Natural killer cells modulate motor neuron-immune cell cross talk in models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Nat Commun. 2020 Apr 14;11(1):1773. doi: 10.1038/s41467-020-15644-8. PMID: 32286313; PMCID: PMC7156729.

102. Cugurra A, Mamuladze T, Rustenhoven J, Dykstra T, Beroshvili G, Greenberg ZJ, Baker W, Papadopoulos Z, Drieu A, Blackburn S, Kanamori M, Brioschi S, Herz J, Schuettpelz LG, Colonna M, Smirnov I, Kipnis J. Skull and vertebral bone marrow are myeloid cell reservoirs for the meninges and CNS parenchyma. Science. 2021 Jul 23;373(6553):eabf7844. doi: 10.1126/science.abf7844. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34083447; PMCID: PMC8863069.

103. Alves de Lima K, Rustenhoven J, Kipnis J. Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. Annu Rev Immunol. 2020 Apr 26;38:597-620. doi: 10.1146/annurev-immunol-102319-103410. PMID: 32340575.

104. Sun H, Sun C, Xiao W, Sun R. Tissue-resident lymphocytes: from adaptive to innate immunity. Cell Mol Immunol. 2019 Mar;16(3):205-215. doi: 10.1038/s41423-018-0192-y. Epub 2019 Jan 11. PMID: 30635650; PMCID: PMC6460493.

105. Kunis G, Baruch K, Rosenzweig N, Kertser A, Miller O, Berkutzki T, Schwartz M. IFN-γ-dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. Brain. 2013 Nov;136(Pt 11):3427-40. doi: 10.1093/brain/awt259. Epub 2013 Oct 1. PMID: 24088808.

106. [Ning Z, Liu Y, Guo D, Lin WJ, Tang Y. Natural killer cells in the central nervous system. Cell Commun Signal. 2023 Nov 29;21(1):341. doi: 10.1186/s12964-023-01324-9. PMID: 38031097; PMCID: PMC10685650.]

107. Laroni A, Armentani E, Kerlero de Rosbo N, Ivaldi F, Marcenaro E, Sivori S, Gandhi R, Weiner HL, Moretta A, Mancardi GL, Uccelli A. Dysregulation of regulatory CD56(bright) NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. J Autoimmun. 2016 Aug;72:8-18. doi: 10.1016/j.jaut.2016.04.003. Epub 2016 May 4. PMID: 27157273.

108. Jiang W, Chai NR, Maric D, Bielekova B. Unexpected role for granzyme K in CD56bright NK cell-mediated immunoregulation of multiple sclerosis. J Immunol. 2011 Jul 15;187(2):781-90. doi: 10.4049/jimmunol.1100789. Epub 2011 Jun 10. PMID: 21666061; PMCID: PMC3131478.

109. Nielsen N, Ødum N, Ursø B, Lanier LL, Spee P. Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A. PLoS One. 2012;7(2):e31959. doi: 10.1371/journal.pone.0031959. Epub 2012 Feb 22. PMID: 22384114; PMCID: PMC3284517.

110. Rodríguez-Lorenzo S, van Olst L, Rodriguez-Mogeda C, Kamermans A, van der Pol SMA, Rodríguez E, Kooij G, de Vries HE. Single-cell profiling reveals periventricular CD56^{bright} NK cell accumulation in multiple sclerosis. Elife. 2022 May 10;11:e73849. doi: 10.7554/eLife.73849. PMID: 35536009; PMCID: PMC9135404.

111. Bratke K, Kuepper M, Bade B, Virchow JC Jr, Luttmann W. Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood. Eur J Immunol. 2005 Sep;35(9):2608-16. doi: 10.1002/eji.200526122. PMID: 16106370.

112.Bielekova B. Daclizumab Therapy for Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019 May 1;9(5):a034470. doi: 10.1101/cshperspect.a034470. PMID: 29661806; PMCID: PMC6191370.

113.Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scrivner S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, McFarland H, Henkart PA, Martin R. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):5941-6. doi: 10.1073/pnas.0601335103. Epub 2006 Apr 3. PMID: 16585503; PMCID: PMC1458677.

114.McKinney EF, Cuthbertson I, Harris KM, Smilek DE, Connor C, Manferrari G, Carr EJ, Zamvil SS, Smith KGC. A $CD8^+$ NK cell transcriptomic signature associated with clinical outcome in relapsing remitting multiple sclerosis. Nat Commun. 2021 Jan 27;12(1):635. doi: 10.1038/s41467-020-20594-2. PMID: 33504809; PMCID: PMC7840761.

115.Hao J, Liu R, Piao W, Zhou Q, Vollmer TL, Campagnolo DI, Xiang R, La Cava A, Van Kaer L, Shi FD. Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. J Exp Med. 2010 Aug 30;207(9):1907-21. doi: 10.1084/jem.20092749. Epub 2010 Aug 9. PMID: 20696699; PMCID: PMC2931174.

116.Sanmarco LM, Wheeler MA, Gutiérrez-Vázquez C, Polonio CM, Linnerbauer M, Pinho-Ribeiro FA, Li Z, Giovannoni F, Batterman KV, Scalisi G, Zandee SEJ, Heck ES, Alsuwailm M, Rosene DL, Becher B, Chiu IM, Prat A, Quintana FJ. Gut-licensed IFNγ+ NK cells drive LAMP1+TRAIL+ anti-inflammatory astrocytes. Nature. 2021 Feb;590(7846):473-479. doi: 10.1038/s41586-020-03116-4. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33408417; PMCID: PMC8039910.

117.Lagumersindez-Denis N, Wrzos C, Mack M, Winkler A, van der Meer F, Reinert MC, Hollasch H, Flach A, Brühl H, Cullen E, Schlumbohm C, Fuchs E, Linington C, Barrantes-Freer A, Metz I, Wegner C, Liebetanz D, Prinz M, Brück W, Stadelmann C, Nessler S. Differential contribution of immune effector mechanisms to cortical demyelination in multiple sclerosis. Acta Neuropathol. 2017 Jul;134(1):15-34. doi: 10.1007/s00401-017-1706-x. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28386765; PMCID: PMC5486638.

118.Ghosh HS. Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. J Exp Neurosci. 2019 Jun 27;13:1179069519856876. doi: 10.1177/1179069519856876. PMID: 31285654; PMCID: PMC6600486.

119.Liu Q, Sanai N, Jin WN, La Cava A, Van Kaer L, Shi FD. Neural stem cells sustain natural killer cells that dictate recovery from brain inflammation. Nat Neurosci. 2016 Feb;19(2):243-52. doi: 10.1038/nn.4211. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26752157; PMCID: PMC5336309.

120.Lee S, Kim J, Jang B, Hur S, Jung U, Kil K, Na B, Lee M, Choi Y, Fukui A, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim JY. Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. J Immunol. 2010 Jul 1;185(1):756-62. doi: 10.4049/jimmunol.0904192. Epub 2010 Jun 7. PMID: 20530263.

121. Al-Jabri AA, Al Belushi MS, Nsanze H. Frequency and levels of autoantibodies in healthy adult Omanis. Ann Saudi Med. 2003 Nov-Dec;23(6):372-5. doi: 10.5144/0256-4947.2003.372. PMID: 16868371.

122. Al-Mawali A, Pinto AD, Al Busaidi R, Al-Zakwani I. Lymphocyte subsets: reference ranges in an age- and gender-balanced population of Omani healthy adults. Cytometry A. 2013 Aug;83(8):739-44. doi: 10.1002/cyto.a.22322. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23839863.

123. Chng WJ, Tan GB, Kuperan P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. Clin Diagn Lab Immunol. 2004 Jan;11(1):168-73. doi: 10.1128/cdli.11.1.168-173.2004. PMID: 14715565; PMCID: PMC321350.

124. Beliën J, Goris A, Matthys P. Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis: Entering the Stage. Front Immunol. 2022 Apr 6;13:869447. doi: 10.3389/fimmu.2022.869447. PMID: 35464427; PMCID: PMC9019710.

125. PubMed. www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. Wyniki wyszukiwania dla haseł '„NK cells" and „multiple sclerosis"'; [cytowane 1 czerwca 2024]. Dostępny w: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=nk%20cells%20and%20multiple%20sclerosis&sort_order=asc

126. Bielekova B, Richert N, Herman ML, Ohayon J, Waldmann TA, McFarland H, Martin R, Blevins G. Intrathecal effects of daclizumab treatment of multiple sclerosis. Neurology. 2011 Nov 22;77(21):1877-86. doi: 10.1212/WNL.0b013e318239f7ef. Epub 2011 Nov 9. PMID: 22076546; PMCID: PMC3246406.

127. Canto-Gomes J, Da Silva-Ferreira S, Silva CS, Boleixa D, Martins da Silva A, González-Suárez I, Cerqueira JJ, Correia-Neves M, Nobrega C. People with Primary Progressive Multiple Sclerosis Have a Lower Number of Central Memory T Cells and HLA-DR^{+} Tregs. Cells. 2023 Jan 29;12(3):439. doi: 10.3390/cells12030439. PMID: 36766781; PMCID: PMC9913799.

128. Poznanski SM, Ashkar AA. What Defines NK Cell Functional Fate: Phenotype or Metabolism? Front Immunol. 2019 Jun 19;10:1414. doi: 10.3389/fimmu.2019.01414. PMID: 31275330; PMCID: PMC6593107.

129. Benczur M, Petrányl GG, Pálffy G, Varga M, Tálas M, Kotsy B, Földes I, Hollán SR. Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. Clin Exp Immunol. 1980 Mar;39(3):657-62. PMID: 6155232; PMCID: PMC1538133.

130. Kastrukoff LF, Lau A, Wee R, Zecchini D, White R, Paty DW. Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity. J Neuroimmunol. 2003 Dec;145(1-2):103-14. doi: 10.1016/j.jneuroim.2003.10.001. PMID: 14644036.

131. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, White R, Petkau AJ, Satoh J, Paty DW. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 1998 Jun 15;86(2):123-33. doi: 10.1016/s0165-5728(98)00014-9. PMID: 9663557.

132. Kucuksezer UC, Aktas Cetin E, Esen F, Tahrali I, Akdeniz N, Gelmez MY, Deniz G. The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2021 Feb 25;12:622306. doi: 10.3389/fimmu.2021.622306. PMID: 33717125; PMCID: PMC7947192.

133. Lünemann A, Lünemann JD, Roberts S, Messmer B, Barreira da Silva R, Raine CS, Münz C. Human NK cells kill resting but not activated microglia via NKG2D- and NKp46-mediated recognition. J Immunol. 2008 Nov 1;181(9):6170-7. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.6170. PMID: 18941207; PMCID: PMC2596922.

134. Spaggiari GM, Carosio R, Pende D, Marcenaro S, Rivera P, Zocchi MR, Moretta L, Poggi A. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. Eur J Immunol. 2001 Jun;31(6):1656-65. doi: 10.1002/1521-4141(200106)31:6<1656::aid-immu1656>3.0.co;2-v. PMID: 11385609.

135. Durrenberger PF, Ettorre A, Kamel F, Webb LV, Sim M, Nicholas RS, Malik O, Reynolds R, Boyton RJ, Altmann DM. Innate immunity in multiple sclerosis white matter lesions: expression of natural cytotoxicity triggering receptor 1 (NCR1). J Neuroinflammation. 2012 Jan 2;9:1. doi: 10.1186/1742-2094-9-1. PMID: 22212381; PMCID: PMC3269367.

136. Galuppo M, Giacoppo S, Sessa E, Bramanti P, Mazzon E. Are natural killer cells involved in multiple sclerosis etiology? Evidences from NKp46/NCR1 receptor modulation in an observational study. J Neurol Sci. 2014 Oct 15;345(1-2):248-51. doi: 10.1016/j.jns.2014.07.045. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25115502.

137. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcão RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. Hum Immunol. 2011 Apr;72(4):319-29. doi: 10.1016/j.humimm.2011.01.009. Epub 2011 Jan 21. PMID: 21262312.

138. Grimsholm O. CD27 on human memory B cells-more than just a surface marker. Clin Exp Immunol. 2023 Jul 21;213(2):164-172. doi: 10.1093/cei/uxac114. PMID: 36508329; PMCID: PMC10361737.

139. Remedios KA, Meyer L, Zirak B, Pauli ML, Truong HA, Boda D, Rosenblum MD. CD27 Promotes $CD4^{+}$ Effector T Cell Survival in Response to Tissue Self-Antigen. J Immunol. 2019 Aug 1;203(3):639-646. doi: 10.4049/jimmunol.1900288. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31209102; PMCID: PMC6650327.

140. Tesselaar K, Xiao Y, Arens R, van Schijndel GM, Schuurhuis DH, Mebius RE, Borst J, van Lier RA. Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo. J Immunol. 2003 Jan 1;170(1):33-40. doi: 10.4049/jimmunol.170.1.33. PMID: 12496380.

141. Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. J Immunol. 1999 Nov 15;163(10):5358-66. PMID: 10553060.

142.Laouar A, Haridas V, Vargas D, Zhinan X, Chaplin D, van Lier RA, Manjunath N. CD70+ antigen-presenting cells control the proliferation and differentiation of T cells in the intestinal mucosa. Nat Immunol. 2005 Jul;6(7):698-706. doi: 10.1038/ni1212. Epub 2005 Jun 5. PMID: 15937486; PMCID: PMC1444945.

143.Gao M, Yang Y, Li D, Ming B, Chen H, Sun Y, Xiao Y, Lai L, Zou H, Xu Y, Xiong P, Tan Z, Gong F, Zheng F. CD27 natural killer cell subsets play different roles during the pre-onset stage of experimental autoimmune encephalomyelitis. Innate Immun. 2016 Aug;22(6):395-404. doi: 10.1177/1753425916658111. Epub 2016 Jul 1. PMID: 27368310.

144.Nakajima A, Oshima H, Nohara C, Morimoto S, Yoshino S, Kobata T, Yagita H, Okumura K. Involvement of CD70-CD27 interactions in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol. 2000 Sep 22;109(2):188-96. doi: 10.1016/s0165-5728(00)00324-6. PMID: 10996221.

145.Francosalinas G, Cantaert T, Nolte MA, Tak PP, van Lier RA, Baeten DL. Enhanced costimulation by CD70+ B cells aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in autoimmune mice. J Neuroimmunol. 2013 Feb 15;255(1-2):8-17. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.10.010. Epub 2012 Nov 6. PMID: 23137837.

146.Coquet JM, Middendorp S, van der Horst G, Kind J, Veraar EA, Xiao Y, Jacobs H, Borst J. The CD27 and CD70 costimulatory pathway inhibits effector function of T helper 17 cells and attenuates associated autoimmunity. Immunity. 2013 Jan 24;38(1):53-65. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.009. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23159439.

147.Font J, Pallares L, Martorell J, Martinez E, Gaya A, Vives J, Ingelmo M. Elevated soluble CD27 levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol. 1996 Dec;81(3):239-43. doi: 10.1006/clin.1996.0184. PMID: 8938100.

148.Tak PP, Hintzen RQ, Teunissen JJ, Smeets TJ, Daha MR, van Lier RA, Kluin PM, Meinders AE, Swaak AJ, Breedveld FC. Expression of the activation antigen CD27 in rheumatoid arthritis. Clin Immunol Immunopathol. 1996 Aug;80(2):129-38. doi: 10.1006/clin.1996.0106. PMID: 8764557.

149.Hintzen RQ, van Lier RA, Kuijpers KC, Baars PA, Schaasberg W, Lucas CJ, Polman CH. Elevated levels of a soluble form of the T cell activation antigen CD27 in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol. 1991 Dec;35(1-3):211-7. doi: 10.1016/0165-5728(91)90175-7. PMID: 1659587.

150.Komori M, Blake A, Greenwood M, Lin YC, Kosa P, Ghazali D, Winokur P, Natrajan M, Wuest SC, Romm E, Panackal AA, Williamson PR, Wu T, Bielekova B. Cerebrospinal fluid markers reveal intrathecal inflammation in progressive multiple sclerosis. Ann Neurol. 2015 Jul;78(1):3-20. doi: 10.1002/ana.24408. Epub 2015 Apr 16. PMID: 25808056; PMCID: PMC5568079.

151.Dang LV, Nilsson A, Ingelman-Sundberg H, Cagigi A, Gelinck LB, Titanji K, De Milito A, Grutzmeier S, Hedlund J, Kroon FP, Chiodi F. Soluble CD27 induces IgG production through activation of antigen-primed B cells. J Intern Med. 2012 Mar;271(3):282-93. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02444.x. Epub 2011 Sep 14. PMID: 21917027.

152.van der Vuurst de Vries RM, Mescheriakova JY, Runia TF, Jafari N, Siepman TA, Hintzen RQ. Soluble CD27 Levels in Cerebrospinal Fluid as a Prognostic Biomarker in Clinically Isolated Syndrome. JAMA Neurol. 2017 Mar 1;74(3):286-292. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.4997. PMID: 28055081.

153.Kodosaki E, Watkins WJ, Loveless S, Kreft KL, Richards A, Anderson V, Hurler L, Robertson NP, Zelek WM, Tallantyre EC. Combination protein biomarkers predict multiple sclerosis diagnosis and outcomes. J Neuroinflammation. 2024 Feb 17;21(1):52. doi: 10.1186/s12974-024-03036-4. PMID: 38368354; PMCID: PMC10874571.

154.Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. J Exp Med. 2006 Apr 17;203(4):883-95. doi: 10.1084/jem.20051776. Epub 2006 Apr 10. PMID: 16606670; PMCID: PMC2118286.

155.Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Nat Immunol. 2013 Dec;14(12):1212-8. doi: 10.1038/ni.2762. PMID: 24240160.

156.Mohammadzadeh A, Rad IA, Ahmadi-Salmasi B. CTLA-4, PD-1 and TIM-3 expression predominantly downregulated in MS patients. J Neuroimmunol. 2018 Oct 15;323:105-108. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.08.004. Epub 2018 Aug 8. PMID: 30196822.

157.Javan MR, Aslani S, Zamani MR, Rostamnejad J, Asadi M, Farhoodi M, Nicknam MH. Downregulation of Immunosuppressive Molecules, PD-1 and PD-L1 but not PD-L2, in the Patients with Multiple Sclerosis. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2016 Aug;15(4):296-302. PMID: 27921410.

158.Trabattoni D, Saresella M, Pacei M, Marventano I, Mendozzi L, Rovaris M, Caputo D, Borelli M, Clerici M. Costimulatory pathways in multiple sclerosis: distinctive expression of PD-1 and PD-L1 in patients with different patterns of disease. J Immunol. 2009 Oct 15;183(8):4984-93. doi: 10.4049/jimmunol.0901038. Epub 2009 Sep 30. PMID: 19794071.

159.Hassani N, Salmaninejad A, Aslani S, Kamali-Sarvestani E, Vessal M. The association between PD-1 gene polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. Immunol Med. 2023 Jun;46(2):69-76. doi: 10.1080/25785826.2022.2137967. Epub 2022 Oct 28. PMID: 36308011.

160.Feng X, Bao R, Li L, Deisenhammer F, Arnason BGW, Reder AT. Interferon-β corrects massive gene dysregulation in multiple sclerosis: Short-term and long-term effects on immune regulation and neuroprotection. EBioMedicine. 2019 Nov;49:269-283. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.09.059. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31648992; PMCID: PMC6945282.

161.Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, Chen L, Hartung HP, Weller M, Wiendl H. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2004 Oct;155(1-2):172-82. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.06.013. PMID: 15342209.

162. Wu Q, Mills EA, Wang Q, Dowling CA, Fisher C, Kirch B, Lundy SK, Fox DA, Mao-Draayer Y; AMS04 Study Group. Siponimod enriches regulatory T and B lymphocytes in secondary progressive multiple sclerosis. JCI Insight. 2020 Feb 13;5(3):e134251. doi: 10.1172/jci.insight.134251. PMID: 31935197; PMCID: PMC7098784.

163. Claes N, Dhaeze T, Fraussen J, Broux B, Van Wijmeersch B, Stinissen P, Hupperts R, Hellings N, Somers V. Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: a 12-month follow-up study. PLoS One. 2014 Oct 31;9(10):e111115. doi: 10.1371/journal.pone.0111115. PMID: 25360562; PMCID: PMC4215872.

164. Mi Y, Han J, Zhu J, Jin T. Role of the PD-1/PD-L1 Signaling in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Recent Insights and Future Directions. Mol Neurobiol. 2021 Dec;58(12):6249-6271. doi: 10.1007/s12035-021-02495-7. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34480337; PMCID: PMC8639577.

165. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, Moretta L, Moretta A, Marcenaro E. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. J Allergy Clin Immunol. 2017 Jan;139(1):335-346.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2016.04.025. Epub 2016 May 27. PMID: 27372564.

166. Liu Y, Cheng Y, Xu Y, Wang Z, Du X, Li C, Peng J, Gao L, Liang X, Ma C. Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers. Oncogene. 2017 Nov 2;36(44):6143-6153. doi: 10.1038/onc.2017.209. Epub 2017 Jul 10. PMID: 28692048; PMCID: PMC5671935.

167. Iraolagoitia XL, Spallanzani RG, Torres NI, Araya RE, Ziblat A, Domaica CI, Sierra JM, Nuñez SY, Secchiari F, Gajewski TF, Zwirner NW, Fuertes MB. NK Cells Restrain Spontaneous Antitumor CD8+ T Cell Priming through PD-1/PD-L1 Interactions with Dendritic Cells. J Immunol. 2016 Aug 1;197(3):953-61. doi: 10.4049/jimmunol.1502291. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27342842.

168. Zhou J, Peng H, Li K, Qu K, Wang B, Wu Y, Ye L, Dong Z, Wei H, Sun R, Tian Z. Liver-Resident NK Cells Control Antiviral Activity of Hepatic T Cells via the PD-1-PD-L1 Axis. Immunity. 2019 Feb 19;50(2):403-417.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.024. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30709740.

169. Ehlers M, Papewalis C, Stenzel W, Jacobs B, Meyer KL, Deenen R, Willenberg HS, Schinner S, Thiel A, Scherbaum WA, Ullrich E, Zitvogel L, Schott M. Immunoregulatory natural killer cells suppress autoimmunity by down-regulating antigen-specific CD8+ T cells in mice. Endocrinology. 2012 Sep;153(9):4367-79. doi: 10.1210/en.2012-1247. Epub 2012 Jun 25. PMID: 22733969.

170. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. Trends Mol Med. 2013 Jun;19(6):355-67. doi: 10.1016/j.molmed.2013.03.005. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23601906; PMCID: PMC3674206.

171. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL. Generation and accumulation

of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. J Biol Chem. 2010 Mar 5;285(10):7176-86. doi: 10.1074/jbc.M109.047423. Epub 2009 Oct 26. PMID: 19858205; PMCID: PMC2844167.

172. Figueiró F, Muller L, Funk S, Jackson EK, Battastini AM, Whiteside TL. Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg). Oncoimmunology. 2016 Feb 26;5(2):e1082703. doi: 10.1080/2162402X.2015.1082703. PMID: 27057473; PMCID: PMC4801473.

173. Morandi F, Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Chiesa S, Imperatori A, Zanellato S, Mortara L, Gattorno M, Pistoia V, Malavasi F. CD56brightCD16- NK Cells Produce Adenosine through a CD38-Mediated Pathway and Act as Regulatory Cells Inhibiting Autologous CD4+ T Cell Proliferation. J Immunol. 2015 Aug 1;195(3):965-72. doi: 10.4049/jimmunol.1500591. Epub 2015 Jun 19. PMID: 26091716.

174. Németh ZH, Leibovich SJ, Deitch EA, Sperlágh B, Virág L, Vizi ES, Szabó C, Haskó G. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Dec 26;312(4):883-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.006. PMID: 14651954.

175. Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). Int J Oncol. 2008 Mar;32(3):527-35. PMID: 18292929.

176. Ben Addi A, Lefort A, Hua X, Libert F, Communi D, Ledent C, Macours P, Tilley SL, Boeynaems JM, Robaye B. Modulation of murine dendritic cell function by adenine nucleotides and adenosine: involvement of the A(2B) receptor. Eur J Immunol. 2008 Jun;38(6):1610-20. doi: 10.1002/eji.200737781. PMID: 18465770.

177. Le Vraux V, Chen YL, Masson I, De Sousa M, Giroud JP, Florentin I, Chauvelot-Moachon L. Inhibition of human monocyte TNF production by adenosine receptor agonists. Life Sci. 1993;52(24):1917-24. doi: 10.1016/0024-3205(93)90632-d. PMID: 8505858.

178. Airas L, Niemelä J, Yegutkin G, Jalkanen S. Mechanism of action of IFN-beta in the treatment of multiple sclerosis: a special reference to CD73 and adenosine. Ann N Y Acad Sci. 2007 Sep;1110:641-8. doi: 10.1196/annals.1423.067. PMID: 17911479.

179. Safarzadeh E, Jadidi-Niaragh F, Motallebnezhad M, Yousefi M. The role of adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Inflamm Res. 2016 Jul;65(7):511-20. doi: 10.1007/s00011-016-0936-z. Epub 2016 Mar 9. PMID: 26960979.

180. Neo SY, Yang Y, Record J, Ma R, Chen X, Chen Z, Tobin NP, Blake E, Seitz C, Thomas R, Wagner AK, Andersson J, de Boniface J, Bergh J, Murray S, Alici E, Childs R, Johansson M, Westerberg LS, Haglund F, Hartman J, Lundqvist A. CD73 immune checkpoint defines regulatory NK cells within the tumor microenvironment. J Clin Invest. 2020 Mar 2;130(3):1185-1198. doi: 10.1172/JCI128895. PMID: 31770109; PMCID: PMC7269592.

181. Masson D, Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. Cell. 1987 Jun 5;49(5):679-85. doi: 10.1016/0092-8674(87)90544-7. PMID: 3555842.

182. Hahn S, Gehri R, Erb P. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. Immunol Rev. 1995 Aug;146:57-79. doi: 10.1111/j.1600-065x.1995.tb00684.x. PMID: 7493761.

183. Shi L, Kraut RP, Aebersold R, Greenberg AH. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. J Exp Med. 1992 Feb 1;175(2):553-66. doi: 10.1084/jem.175.2.553. PMID: 1732416; PMCID: PMC2119135.

184. Heibein JA, Barry M, Motyka B, Bleackley RC. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential (Delta Psi m) and cytochrome c release are caspase independent. J Immunol. 1999 Nov 1;163(9):4683-93. PMID: 10528165.

185. Wang T, Lee MH, Johnson T, Allie R, Hu L, Calabresi PA, Nath A. Activated T-cells inhibit neurogenesis by releasing granzyme B: rescue by Kv1.3 blockers. J Neurosci. 2010 Apr 7;30(14):5020-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0311-10.2010. PMID: 20371822; PMCID: PMC2878660.

186. Pradella F, Boldrini VO, Marques AM, Morais GAD, Francelin C, Cocenza RS, et al. Cytotoxic Activity of CD4 T Cells During the Early Stage of Autoimmune Neuroinflammation. bioRxiv (2020) 2020.03.10.985614. doi: 10.1101/2020.03.10.985614

187. Raveney BJE, Sato W, Takewaki D, Zhang C, Kanazawa T, Lin Y, Okamoto T, Araki M, Kimura Y, Sato N, Sano T, Saito Y, Oki S, Yamamura T. Involvement of cytotoxic Eomes-expressing $CD4^+$ T cells in secondary progressive multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Mar 16;118(11):e2021818118. doi: 10.1073/pnas.2021818118. PMID: 33836594; PMCID: PMC7980371.

188. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. Trends Neurosci. 2002 Jun;25(6):313-9. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02154-9. PMID: 12086750.

189. Stopnicki B, Blain M, Cui QL, Kennedy TE, Antel JP, Healy LM, Darlington PJ. Helper CD4 T cells expressing granzyme B cause glial fibrillary acidic protein fragmentation in astrocytes in an MHCII-independent manner. Glia. 2019 Apr;67(4):582-593. doi: 10.1002/glia.23503. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30444064.

190. Haile Y, Carmine-Simmen K, Olechowski C, Kerr B, Bleackley RC, Giuliani F. Granzyme B-inhibitor serpina3n induces neuroprotection in vitro and in vivo. J Neuroinflammation. 2015 Sep 4;12:157. doi: 10.1186/s12974-015-0376-7. PMID: 26337722; PMCID: PMC4558826.

191. Bade B, Boettcher HE, Lohrmann J, Hink-Schauer C, Bratke K, Jenne DE, Virchow JC Jr, Luttmann W. Differential expression of the granzymes A, K and M and perforin in human peripheral blood lymphocytes. Int Immunol. 2005 Nov;17(11):1419-28. doi: 10.1093/intimm/dxh320. Epub 2005 Sep 26. PMID: 16186162.

192. Bratke K, Kuepper M, Bade B, Virchow JC Jr, Luttmann W. Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood. Eur J Immunol. 2005 Sep;35(9):2608-16. doi: 10.1002/eji.200526122. PMID: 16106370.

193. Bouwman AC, van Daalen KR, Crnko S, Ten Broeke T, Bovenschen N. Intracellular and Extracellular Roles of Granzyme K. Front Immunol. 2021 May 4;12:677707. doi: 10.3389/fimmu.2021.677707. PMID: 34017346; PMCID: PMC8129556.

194. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. Immunol Rev. 2010 May;235(1):35-54. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00896.x. PMID: 20536554.

195. Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. Cent Eur J Immunol. 2014;39(1):109-15. doi: 10.5114/ceji.2014.42135. Epub 2014 Apr 17. PMID: 26155110; PMCID: PMC4439970.

196. Thanapati S, Ganu M, Giri P, Kulkarni S, Sharma M, Babar P, Ganu A, Tripathy AS. Impaired NK cell functionality and increased TNF-α production as biomarkers of chronic chikungunya arthritis and rheumatoid arthritis. Hum Immunol. 2017 Apr;78(4):370-374. doi: 10.1016/j.humimm.2017.02.006. Epub 2017 Feb 14. PMID: 28213049.

197. Nekoua MP, Dechaumes A, Sane F, Alidjinou EK, Moutairou K, Yessoufou A, Hober D. Enteroviral Pathogenesis of Type 1 Diabetes: The Role of Natural Killer Cells. Microorganisms. 2020 Jul 1;8(7):989. doi: 10.3390/microorganisms8070989. PMID: 32630332; PMCID: PMC7409131.

198. Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiocchetti A, Bocca S, Boggio E, Bernardone IS, Cometa A, Clementi R, Barizzone N, D'Alfonso S, Corrado L, Galimberti D, Scarpini E, Guerini FR, Caputo D, Paolicelli D, Trojano M, Figà-Talamanca L, Salvetti M, Perla F, Leone M, Monaco F, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis. Genes Immun. 2008 Jul;9(5):438-44. doi: 10.1038/gene.2008.35. Epub 2008 May 22. PMID: 18496551.

199. Plantone D, Marti A, Frisullo G, Iorio R, Damato V, Nociti V, Patanella AK, Bianco A, Mirabella M, Batocchi AP. Circulating CD56dim NK cells expressing perforin are increased in progressive multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2013 Dec 15;265(1-2):124-7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.10.004. Epub 2013 Oct 12. PMID: 24157130.

200. Chanvillard C, Jacolik RF, Infante-Duarte C, Nayak RC. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. Front Immunol. 2013 Mar 13;4:63. doi: 10.3389/fimmu.2013.00063. PMID: 23493880; PMCID: PMC3595639.

201. Gray JD, Hirokawa M, Ohtsuka K, Horwitz DA. Generation of an inhibitory circuit involving CD8+ T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF-beta: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3. J Immunol. 1998 Mar 1;160(5):2248-54. PMID: 9498764.

202. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple

sclerosis. J Exp Med. 2004 Apr 5;199(7):971-9. doi: 10.1084/jem.20031579. PMID: 15067033; PMCID: PMC2211881.

203. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, Hupperts R, Stinissen P. Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. Immunology. 2008 Jan;123(1):79-89. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02690.x. Epub 2007 Sep 25. PMID: 17897326; PMCID: PMC2433271.

204. Moharami S, Nourazarian A, Nikanfar M, Laghousi D, Shademan B, Joodi Khanghah O, Khaki-Khatibi F. Investigation of serum levels of orexin-A, transforming growth factor β, and leptin in patients with multiple sclerosis. J Clin Lab Anal. 2022 Jan;36(1):e24170. doi: 10.1002/jcla.24170. Epub 2021 Dec 11. PMID: 34894407; PMCID: PMC8761413.

205. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature. 2006 May 11;441(7090):231-4. doi: 10.1038/nature04754. Epub 2006 Apr 30. PMID: 16648837.

206. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. Nat Immunol. 2008 Dec;9(12):1341-6. doi: 10.1038/ni.1659. Epub 2008 Oct 19. PMID: 18931678.

207. Lee PW, Severin ME, Lovett-Racke AE. TGF-β regulation of encephalitogenic and regulatory T cells in multiple sclerosis. Eur J Immunol. 2017 Mar;47(3):446-453. doi: 10.1002/eji.201646716. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28102541; PMCID: PMC5499671.

208. De Groot CJ, Montagne L, Barten AD, Sminia P, Van Der Valk P. Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. J Neuropathol Exp Neurol. 1999 Feb;58(2):174-87. doi: 10.1097/00005072-199902000-00007. PMID: 10029100.

209. Luo J, Ho PP, Buckwalter MS, Hsu T, Lee LY, Zhang H, Kim DK, Kim SJ, Gambhir SS, Steinman L, Wyss-Coray T. Glia-dependent TGF-beta signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest. 2007 Nov;117(11):3306-15. doi: 10.1172/JCI31763. PMID: 17965773; PMCID: PMC2040317.

210. Lanz TV, Ding Z, Ho PP, Luo J, Agrawal AN, Srinagesh H, Axtell R, Zhang H, Platten M, Wyss-Coray T, Steinman L. Angiotensin II sustains brain inflammation in mice via TGF-beta. J Clin Invest. 2010 Aug;120(8):2782-94. doi: 10.1172/JCI41709. Epub 2010 Jul 12. PMID: 20628203; PMCID: PMC2912186.

211. Nataf S, Barritault M, Pays L. A Unique TGFB1-Driven Genomic Program Links Astrocytosis, Low-Grade Inflammation and Partial Demyelination in Spinal Cord Periplaques from Progressive Multiple Sclerosis Patients. Int J Mol

Sci. 2017 Oct 5;18(10):2097. doi: 10.3390/ijms18102097. PMID: 28981455; PMCID: PMC5666779.

212. Nataf S, Guillen M, Pays L. TGFB1-Mediated Gliosis in Multiple Sclerosis Spinal Cords Is Favored by the Regionalized Expression of HOXA5 and the Age-Dependent Decline in Androgen Receptor Ligands. Int J Mol Sci. 2019 Nov 26;20(23):5934. doi: 10.3390/ijms20235934. PMID: 31779094; PMCID: PMC6928867.

213. Luo J. TGF-β as a Key Modulator of Astrocyte Reactivity: Disease Relevance and Therapeutic Implications. Biomedicines. 2022 May 23;10(5):1206. doi: 10.3390/biomedicines10051206. PMID: 35625943; PMCID: PMC9138510.

214. Xu J, Wang Y, Jiang H, Sun M, Gao J, Xie A. TGF-β in Mice Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Regulating NK Cell Activity. Cell Transplant. 2019 Sep-Oct;28(9-10):1155-1160. doi: 10.1177/0963689719852354. Epub 2019 May 29. PMID: 31137960; PMCID: PMC6767886.

215. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Adv Immunol. 2007;96:41-101. doi: 10.1016/S0065-2776(07)96002-2. PMID: 17981204.

216. Meyer O. Interferons and autoimmune disorders. Joint Bone Spine. 2009 Oct;76(5):464-73. doi: 10.1016/j.jbspin.2009.03.012. Epub 2009 Sep 20. PMID: 19773191.

217. Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M, Izui S. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. Springer Semin Immunopathol. 2006 Oct;28(2):175-84. doi: 10.1007/s00281-006-0037-0. Epub 2006 Sep 5. PMID: 16953439.

218. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular Mechanisms Regulating Th1 Immune Responses. Annu Rev Immunol. 2003; 21:713–758.

219. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annu Rev Immunol. 2010;28:445-89. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212. PMID: 20192806; PMCID: PMC3502616.

220. Theofilopoulos AN, Koundouris S, Kono DH, Lawson BR. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. Arthritis Res. 2001;3(3):136-41. doi: 10.1186/ar290. Epub 2001 Feb 14. PMID: 11299053; PMCID: PMC128889.

221. Panitch HS. Interferons in multiple sclerosis. A review of the evidence. Drugs. 1992 Dec;44(6):946-62. doi: 10.2165/00003495-199244060-00004. PMID: 1282865.

222. Skurkovich S, Boiko A, Beliaeva I, Buglak A, Alekseeva T, Smirnova N, Kulakova O, Tchechonin V, Gurova O, Deomina T, Favorova OO, Skurkovic B, Gusev E. Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis. Mult Scler. 2001 Oct;7(5):277-84. doi: 10.1177/135245850100700502. PMID: 11724442.

223. Chitnis T, Najafian N, Benou C, Salama AD, Grusby MJ, Sayegh MH, Khoury SJ. Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest. 2001

Sep;108(5):739-47. doi: 10.1172/JCI12563. PMID: 11544280; PMCID: PMC209380.

224.Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). J Immunol. 1996 Jan 1;156(1):5-7. PMID: 8598493.

225.Jagessar SA, Gran B, Heijmans N, Bauer J, Laman JD, 't Hart BA, Constantinescu CS. Discrepant effects of human interferon-gamma on clinical and immunological disease parameters in a novel marmoset model for multiple sclerosis. J Neuroimmune Pharmacol. 2012 Mar;7(1):253-65. doi: 10.1007/s11481-011-9320-5. Epub 2011 Oct 20. PMID: 22012268; PMCID: PMC3280389.

226.Lünemann A, Tackenberg B, DeAngelis T, da Silva RB, Messmer B, Vanoaica LD, Miller A, Apatoff B, Lublin FD, Lünemann JD, Münz C. Impaired IFN-γ production and proliferation of NK cells in multiple sclerosis. Int Immunol. 2011 Feb;23(2):139-48. doi: 10.1093/intimm/dxq463. Epub 2011 Jan 6. PMID: 21212154; PMCID: PMC3030728.

227.Tahrali I, Kucuksezer UC, Akdeniz N, Altintas A, Uygunoglu U, Aktas-Cetin E, Deniz G. $CD3^{-}CD56^{+}$ NK cells display an inflammatory profile in RR-MS patients. Immunol Lett. 2019 Dec;216:63-69. doi: 10.1016/j.imlet.2019.10.006. Epub 2019 Oct 4. PMID: 31589897.

228.Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O'Garra A. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. Immunity. 2009 Aug 21;31(2):209-19. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.012. Epub 2009 Jul 30. PMID: 19646904; PMCID: PMC2791889.

229.Itakura E, Huang RR, Wen DR, Paul E, Wünsch PH, Cochran AJ. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. Mod Pathol. 2011 Jun;24(6):801-9. doi: 10.1038/modpathol.2011.5. Epub 2011 Feb 11. PMID: 21317876; PMCID: PMC3106125.

230.Koya T, Matsuda H, Takeda K, Matsubara S, Miyahara N, Balhorn A, Dakhama A, Gelfand EW. IL-10-treated dendritic cells decrease airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. J Allergy Clin Immunol. 2007 May;119(5):1241-50. doi: 10.1016/j.jaci.2007.01.039. Epub 2007 Mar 13. PMID: 17353041.

231.Batista ML Jr, Lopes RD, Seelaender MC, Lopes AC. Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-alpha and IL-10. Arq Bras Cardiol. 2009 Dec;93(6):643-51, 692-700. English, Portuguese. Erratum in: Arq Bras Cardiol. 2010 Aug;95(2):279. Batista Júnior, Miguel Luiz [corrected to Batista, Miguel Luiz Jr]. PMID: 20379646.

232.Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol. 2001;19:683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683. PMID: 11244051.

233.de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory

role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med. 1991 Nov 1;174(5):1209-20. doi: 10.1084/jem.174.5.1209. PMID: 1940799; PMCID: PMC2119001.

234. Issazadeh S, Ljungdahl A, Höjeberg B, Mustafa M, Olsson T. Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. J Neuroimmunol. 1995 Sep;61(2):205-12. doi: 10.1016/0165-5728(95)00100-g. PMID: 7593556.

235. Crisi GM, Santambrogio L, Hochwald GM, Smith SR, Carlino JA, Thorbecke GJ. Staphylococcal enterotoxin B and tumor-necrosis factor-alpha-induced relapses of experimental allergic encephalomyelitis: protection by transforming growth factor-beta and interleukin-10. Eur J Immunol. 1995 Nov;25(11):3035-40. doi: 10.1002/eji.1830251108. PMID: 7489740.

236. Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. J Immunol. 1998 Oct 1;161(7):3299-306. PMID: 9759845.

237. Korniotis S, Gras C, Letscher H, Montandon R, Mégret J, Siegert S, Ezine S, Fallon PG, Luther SA, Fillatreau S, Zavala F. Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells. Nat Commun. 2016 Jul 11;7:12134. doi: 10.1038/ncomms12134. PMID: 27396388; PMCID: PMC4942579.

238. Sedeeq MS, El-Nahrery EMA, Shalaby N, Hussein M, Shehata H, El Aal RA, Abdel Ghaffar NF, Mohamed MM. Micro-RNA-96 and interleukin-10 are independent biomarkers for multiple sclerosis activity. J Neurol Sci. 2019 Aug 15;403:92-96. doi: 10.1016/j.jns.2019.06.022. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31238191.

239. Soldan SS, Alvarez Retuerto AI, Sicotte NL, Voskuhl RR. Dysregulation of IL-10 and IL-12p40 in secondary progressive multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2004 Jan;146(1-2):209-15. doi: 10.1016/j.jneuroim.2003.10.033. PMID: 14698865.

240. Barry A, Cronin O, Ryan AM, Sweeney B, O'Toole O, O'Halloran KD, Downer EJ. Cycle ergometer training enhances plasma interleukin-10 in multiple sclerosis. Neurol Sci. 2019 Sep;40(9):1933-1936. doi: 10.1007/s10072-019-03915-2. Epub 2019 Apr 30. Erratum in: Neurol Sci. 2019 May 21;: PMID: 31041609.

241. Deniz G, Erten G, Kücüksezer UC, Kocacik D, Karagiannidis C, Aktas E, Akdis CA, Akdis M. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. J Immunol. 2008 Jan 15;180(2):850-7. doi: 10.4049/jimmunol.180.2.850. PMID: 18178824.

242. Cosan F, Aktas Cetin E, Akdeniz N, Emrence Z, Cefle A, Deniz G. Natural Killer Cell Subsets and Their Functional Activity in Behçet's Disease. Immunol Invest. 2017 May;46(4):419-432. doi: 10.1080/08820139.2017.1288240. Epub 2017 Apr 7. PMID: 28388249.

243. Kucuksezer UC, Aktas-Cetin E, Bilgic-Gazioglu S, Tugal-Tutkun I, Gül A, Deniz G. Natural killer cells dominate a Th-1 polarized response in Behçet's

disease patients with uveitis. Clin Exp Rheumatol. 2015 Nov-Dec;33(6 Suppl 94):S24-9. Epub 2015 Apr 28. PMID: 25937098.

244. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. Front Immunol. 2018 Jun 7;9:888. doi: 10.3389/fimmu.2018.00888. PMID: 29930549; PMCID: PMC6001902.

245. Mori S, Maher P, Conti B. Neuroimmunology of the Interleukins 13 and 4. Brain Sci. 2016 Jun 13;6(2):18. doi: 10.3390/brainsci6020018. PMID: 27304970; PMCID: PMC4931495.

246. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. Biochem Pharmacol. 2009 Sep 15;78(6):539-52. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.029. Epub 2009 May 4. PMID: 19413999; PMCID: PMC2730638.

247. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". J Leukoc Biol. 2012 Oct;92(4):753-64. doi: 10.1189/jlb.0412214. Epub 2012 Jul 10. PMID: 22782966; PMCID: PMC3441310.

248. Powers R, Garrett DS, March CJ, Frieden EA, Gronenborn AM, Clore GM. Three-dimensional solution structure of human interleukin-4 by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. Science. 1992 Jun 19;256(5064):1673-7. doi: 10.1126/science.256.5064.1673. PMID: 1609277.

249. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 May;86(10):3803-7. doi: 10.1073/pnas.86.10.3803. PMID: 2786204; PMCID: PMC287229.

250. Major J, Fletcher JE, Hamilton TA. IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. J Immunol. 2002 Mar 1;168(5):2456-63. doi: 10.4049/jimmunol.168.5.2456. PMID: 11859138.

251. Chao CC, Hu S, Peterson PK. Modulation of human microglial cell superoxide production by cytokines. J Leukoc Biol. 1995 Jul;58(1):65-70. doi: 10.1002/jlb.58.1.65. PMID: 7616108.

252. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. Nat Neurosci. 2006 Feb;9(2):268-75. doi: 10.1038/nn1629. Epub 2006 Jan 15. PMID: 16415867.

253. Hulshof S, Montagne L, De Groot CJ, Van Der Valk P. Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. Glia. 2002 Apr 1;38(1):24-35. doi: 10.1002/glia.10050. PMID: 11921201.

254. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. J Neurosci. 2007 Oct 3;27(40):10714-21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1922-07.2007. PMID: 17913905; PMCID: PMC6672829.

255.Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, Moore CS, Michel L, Althekair F, Rajasekharan S, Gommerman JL, Prat A, Fillatreau S, Bar-Or A; Canadian B cells in MS Team. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. Sci Transl Med. 2015 Oct 21;7(310):310ra166. doi: 10.1126/scitranslmed.aab4176. PMID: 26491076.

256.Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM, Lingenheld EG, Grunnet ML, Padula SJ, Clark RB. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. J Exp Med. 1990 Oct 1;172(4):1193-200. doi: 10.1084/jem.172.4.1193. PMID: 2212948; PMCID: PMC2188622.

257.Tahani S, Dehghani L, Jahanbani-Ardakani H, Shaygannejad V, Fazli A, Hamidavi A, Eskandari N. Elevated serum level of IL-4 in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients. J Immunoassay Immunochem. 2019;40(5):555-563. doi: 10.1080/15321819.2019.1655649. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31422745.

258.Furlan R, Bergami A, Lang R, Brambilla E, Franciotta D, Martinelli V, Comi G, Panina P, Martino G. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. J Neuroimmunol. 2000 Nov 1;111(1-2):86-92. doi: 10.1016/s0165-5728(00)00377-5. PMID: 11063825.

259.Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. Correlations between IL-4, IL-12 levels and CCL2, CCL5 levels in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. J Neural Transm (Vienna). 2005 Jun;112(6):797-803. doi: 10.1007/s00702-004-0225-9. Epub 2004 Oct 12. PMID: 15480850.

260.Wei H, Zheng X, Lou D, Zhang L, Zhang R, Sun R, Tian Z. Tumor-induced suppression of interferon-gamma production and enhancement of interleukin-10 production by natural killer (NK) cells: paralleled to CD4+ T cells. Mol Immunol. 2005 May;42(9):1023-31. doi: 10.1016/j.molimm.2004.09.035. Epub 2004 Nov 23. PMID: 15829292.

261.Yang X, Tian Y, Zheng L, Luu T, Kwak-Kim J. The Update Immune-Regulatory Role of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses. Int J Mol Sci. 2022 Dec 21;24(1):132. doi: 10.3390/ijms24010132. PMID: 36613575; PMCID: PMC9820098.

262.Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature. 1993 Mar 18;362(6417):248-50. doi: 10.1038/362248a0. PMID: 8096327.

263.Schmid-Grendelmeier P, Altznauer F, Fischer B, Bizer C, Straumann A, Menz G, Blaser K, Wüthrich B, Simon HU. Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases. J Immunol. 2002 Jul 15;169(2):1021-7. doi: 10.4049/jimmunol.169.2.1021. PMID: 12097410.

264.Seyfizadeh N, Kazemi T, Farhoudi M, Aliparasti MR, Sadeghi-Bazargani H, Almasi S, Babaloo Z. Association of IL-13 single nucleotide polymorphisms in Iranian patients to multiple sclerosis. Am J Clin Exp Immunol. 2014 Dec 5;3(3):124-9. PMID: 25628961; PMCID: PMC4299763.

265. Iwaszko M, Biały S, Bogunia-Kubik K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. Cells. 2021 Nov 3;10(11):3000. doi: 10.3390/cells10113000. PMID: 34831223; PMCID: PMC8616130.

266. Silverberg JI, Kantor R. The Role of Interleukins 4 and/or 13 in the Pathophysiology and Treatment of Atopic Dermatitis. Dermatol Clin. 2017 Jul;35(3):327-334. doi: 10.1016/j.det.2017.02.005. Epub 2017 Apr 22. PMID: 28577802.

267. Wilson MS, Ramalingam TR, Rivollier A, Shenderov K, Mentink-Kane MM, Madala SK, Cheever AW, Artis D, Kelsall BL, Wynn TA. Colitis and intestinal inflammation in IL10-/- mice results from IL-13Rα2-mediated attenuation of IL-13 activity. Gastroenterology. 2011 Jan;140(1):254-64. doi: 10.1053/j.gastro.2010.09.047. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20951137; PMCID: PMC3006653.

268. Majeed AY, Zulkafli NES, Ad'hiah AH. Serum profiles of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in non-hospitalized patients with mild/moderate COVID-19 infection. Immunol Lett. 2023 Aug;260:24-34. doi: 10.1016/j.imlet.2023.06.008. Epub 2023 Jun 18. PMID: 37339685; PMCID: PMC10276899.

269. Ghezzi L, Cantoni C, Cignarella F, Bollman B, Cross AH, Salter A, Galimberti D, Cella M, Piccio L. T cells producing GM-CSF and IL-13 are enriched in the cerebrospinal fluid of relapsing MS patients. Mult Scler. 2020 Sep;26(10):1172-1186. doi: 10.1177/1352458519852092. Epub 2019 Jun 25. PMID: 31237799.

270. Rossi S, Mancino R, Bergami A, Mori F, Castelli M, De Chiara V, Studer V, Mataluni G, Sancesario G, Parisi V, Kusayanagi H, Bernardi G, Nucci C, Bernardini S, Martino G, Furlan R, Centonze D. Potential role of IL-13 in neuroprotection and cortical excitability regulation in multiple sclerosis. Mult Scler. 2011 Nov;17(11):1301-12. doi: 10.1177/1352458511410342. Epub 2011 Jun 15. PMID: 21677024.

271. Sanna A, Fois ML, Arru G, Huang YM, Link H, Pugliatti M, Rosati G, Sotgiu S. Glatiramer acetate reduces lymphocyte proliferation and enhances IL-5 and IL-13 production through modulation of monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis. Clin Exp Immunol. 2006 Feb;143(2):357-62. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.02997.x. PMID: 16412061; PMCID: PMC1809576.

272. Cash E, Minty A, Ferrara P, Caput D, Fradelizi D, Rott O. Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. J Immunol. 1994 Nov 1;153(9):4258-67. PMID: 7523520.

273. Zhang C, Tian Z. NK cell subsets in autoimmune diseases. J Autoimmun. 2017 Sep;83:22-30. doi: 10.1016/j.jaut.2017.02.005. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28285736.

274. Bahadorian D, Mollazadeh S, Mirazi H, Faraj TA, Kheder RK, Esmaeili SA. Regulatory NK cells in autoimmune disease. Iran J Basic Med Sci. 2023;26(6):609-616. doi: 10.22038/IJBMS.2023.68653.14969. PMID: 37275764; PMCID: PMC10237161.

10. Spis tabel

Tabela 1. Kryteria McDonalda 2017 – rozpoznanie postaci rzutowo-remisyjnej MS.... 18
Tabela 2. Elementy odpowiedzi wrodzonej i ich funkcje. Przygotowano na podstawie: Aristizábal B., et.al. *Innate immune system* [42] 20
Tabela 3. Podział ILCs z uwzględnieniem ich funkcji, czynników transkrypcji i wydzielanych cytokin 24
Tabela 4. Charakterystyka grupy badanej 51
Tabela 5. Charakterystyka grupy kontrolnej 52
Tabela 6. Statystyki opisowe wartości odsetkowych [%] komórek NK oraz głównych subpopulacji: $CD56^{bright}$ i $CD56^{dim}$……..53
Tabela 7. Statystyki opisowe wartości odsetkowych subpopulacji komórek NK CD335-, NK CD335+, NK CD27-, NK CD27+, NK CD274-, NK CD274+, NK CD73- i NK CD73+ oraz MFI subpopulacji komórek NK CD335+, NK CD27+, NK CD274+, NK CD73+ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego ... 54
Tabela 8. Statystyki opisowe wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym B w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 58
Tabela 9. Statystyki opisowe wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+, NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających granzym K w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 62
Tabela 10. Statystyki opisowe wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$, NK $CD56^{dim}$, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających perforynę w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 67

Tabela 11. Statystyki opisowe wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 70
Tabela 12. Rozkład wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego…76
Tabela 13. Statystyki opisowe dla wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 83
Tabela 14. Statystyki opisowe dla wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 90
Tabela 15. Rozkład wartości odsetkowych oraz mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD56^{bright}, NK CD56^{dim}, NK CD335+, NK CD335-, NK CD27+,NK CD27-, NK CD274+, NK CD274-, NK CD73+, NK CD73- zawierających IL-13 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego…96
Tabela 16. Podsumowanie wyników porównania fenotypu komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą 123
Tabela 17. Podsumowanie wyników porównania wewnątrzkomórkowej zawartości enzymów cytolitycznych komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą 124

Tabela 18. Podsumowanie wyników porównania wewnątrzkomórkowej zawartości cytokin komórek NK pomiędzy grupami pacjentów z RRMS, PPMS i zdrową kontrolą 126

11. Spis rycin

Rycina 1. Rozszerzona skala niepełnosprawności – EDSS. Schemat. Opracowanie własne (BioRender.com) 16
Rycina 2. Schemat dojrzewania komórek NK. Opracowanie własne (BioRender.com) 28
Rycina 3. Schemat głównych fenotypów komórek NK wraz z ich funkcjami. Opracowanie własne (BioRender.com) 30
Rycina 4. Komórki NK w CNS. Opracowanie własne, na podstawie: Ning Z. et.al. *Natural killer cells in the central nervous system* [106], (BioRender.com) 36
Rycina 5. Izolacja PBMC. Opis w tekście. Opracowanie własne (BioRender.com) 42
Rycina 6. Proces liczenia komórek (objaśnienia znajdują się w tekście) – opracowanie własne (BioRender.com) 42
Rycina 7. Mrożenie PBMC. Objaśnienia w tekście. Opracowanie własne (BioRender.com) 43
Rycina 8. Oznaczenie markerów powierzchniowych komórek. Objaśnienia w tekście. Opracowanie własne (BioRender.com) 45
Rycina 9. Reprezentatywna analiza cytometryczna na przykładzie komórek pobranych od pacjenta ze stwardnieniem rozsianym i oceny ekspresji granzymu B 48
Rycina 10. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD335+ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 56
Rycina 11. Rozkład mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD27+ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego ... 56
Rycina 12. Rozkład mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD274+ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego ... 57
Rycina 13. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27+ zawierającej granzym B w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 60
Rycina 14. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD73- zawierającej granzym B w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 61

Rycina 15. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierającej granzym K w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 65
Rycina 16. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierającej granzym K w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 65
Rycina 17. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD56^{dim} zawierającej granzym K w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 66
Rycina 18. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 73
Rycina 19. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27+ zawierajacych TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 73
Rycina 20. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 74
Rycina 21. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK 335+ zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 75
Rycina 22. Rozkład mediany intensywności fluorescencji subpopulacji komórek NK CD274- zawierających TGF-β w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 75
Rycina 23. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD56^{bright} zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 79
Rycina 24. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 80
Rycina 25. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335- zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 81

Rycina 26. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 81
Rycina 27. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD274- zawierających IFN-γ w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 82
Rycina 28. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 86
Rycina 29. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 86
Rycina 30. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 87
Rycina 31. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK $CD56^{bright}$ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 88
Rycina 32. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 88
Rycina 33. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD27+ zawierających IL-10 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 89
Rycina 34. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 93
Rycina 35. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD27- zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 93
Rycina 36. Rozkład odsetka subpopulacji komórek NK CD274- zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 94

Rycina 37. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD335+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 95
Rycina 38. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD274+ zawierających IL-4 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 95
Rycina 39. Rozkład MFI subpopulacji komórek NK CD27+ zawierających IL-13 w grupie kontrolnej, w grupie pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią stwardnienia rozsianego i pierwotnie postępująca postacią stwardnienia rozsianego 99
Rycina 40. Komórki NK w MS w piśmiennictwie 100

12. Uchwała Komisji Bioetycznej

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej
35-030 Rzeszów, ul. Dekerta 2
tel. 17 717 77 17

UCHWAŁA Nr 85/2023/B
Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej
z dnia 18 września 2023 r.

Komisja Bioetyczna Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie działając na podstawie art. 29 ust. 3 pkt. 2 ustawy z dnia 5.12.1996 r. o zawodzie lekarza (Dz. U. z dnia 26.03.1997 r. Nr 28, poz. 152), działając zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 r.) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania, oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, Kodeksu Etyki Lekarskiej, z uwzględnieniem zasad Deklaracji Helsińskiej (Declaration of Helsinki) oraz zasad prawidłowego prowadzenia badań klinicznych (Good Clinical Practice) i Międzynarodowej Konferencji na rzecz harmonizacji wymogów technicznych dla rejestracji środków farmaceutycznych (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH), po zapoznaniu się z dokumentami przedłożonymi wraz ze „Zgłoszeniem badań" oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę :

postanawia

w wyniku przeprowadzonej dyskusji i głosowania, Komisja pozytywnie zaopiniowała projekt badania pt. :

„Ocena odporności nieswoistej u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz chorobami z kręgu zapalenia nerwów wzrokowych i rdzenia kręgowego (NMOSD)".

Badacz : lek. med. Julia Rudnicka - Czerwiec

Ośrodek : Klinika Neurologii
Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 w Rzeszowie
35-301 Rzeszów, ul. Lwowska 60

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej
Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie
dr hab. n. med. Andrzej Płuta

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej
35-030 Rzeszów, ul. Dekerta 2
tel. 17 717 77 17

UCHWAŁA Nr 12/2024/B
Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej
z dnia 19 lutego 2024 r.

Komisja Bioetyczna Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie działając na podstawie art. 29 ust. 3 pkt. 2 ustawy z dnia 5.12.1996 r. o zawodzie lekarza (Dz. U. z dnia 26.03.1997 r. Nr 28, poz. 152), działając zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 r.) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania, oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, Kodeksu Etyki Lekarskiej, z uwzględnieniem zasad Deklaracji Helsińskiej (Declaration of Helsinki) oraz zasad prawidłowego prowadzenia badań klinicznych (Good Clinical Practice) i Międzynarodowej Konferencji na rzecz harmonizacji wymogów technicznych dla rejestracji środków farmaceutycznych (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH), po zapoznaniu się z dokumentami przedłożonymi wraz ze „Zgłoszeniem badań" oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę :

postanawia

w wyniku przeprowadzonej dyskusji i głosowania, Komisja wyraziła zgodę na :

zawężenia tytułu badania pt. : „ Ocena odporności nieswoistej u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz chorobami z kręgu zapalenia nerwów wzrokowych i rdzenia kręgowego" – zgoda wydana przez komisję w dniu 18.09.2023 r. Uchwałą Nr 85/2023/B .

Tytuł badania zawężony to :

„ Ocena komórek NK u pacjentów nieleczonych z rzutowo- remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do zdrowej kontroli".

Skrócenie tytułu jest konieczne do pracy doktorskiej.

Badacz : lek. med. Julia Rudnicka - Czerwiec

Ośrodek : Klinika Neurologii
Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 w Rzeszowie
35-301 Rzeszów, ul. Lwowska 60

Przewodniczący
Komisji Bioetycznej
Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie
dr hab. n. med. Andrzej Plu...

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej
35-030 Rzeszów, ul. Dekerta 2
tel. 17 717 77 17

„ Ocena komórek NK u pacjentów nieleczonych z rzutowo- remisyjną i pierwotnie postępującą postacią stwardnienia rozsianego w porównaniu do zdrowej kontroli".

Członkowie Komisji Bioetycznej OIL w Rzeszowie *Osoby podpisane – obecne na posiedzeniu w dniu 19.02.2024 r.*	*Podpis*
1. dr hab. n.med. Andrzej Pluta /lekarz/ - Prywatny Gabinet Lekarski w Rzeszowie	
2. dr n. med. Wojciech Domka /lekarz/ Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 1 w Rzeszowie	
3. dr filozofii Anna Habrat/filozof/ Uniwersytet Rzeszowski	
4. mgr Jerzy Halat /prawnik/ Sąd Pracy w Rzeszowie	
5. dr n. med. Marzena Janas /lekarz/ Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 1 w Rzeszowie	
6. dr n. med. Artur Kozłowski /lekarz/ Szpital Specjalistyczny w Mielcu	
7. dr n. med. Jerzy Kuźniar /lekarz/ Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 w Rzeszowie	
8. mgr Zbigniew Machnio /pielęgniarz/ Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 1 w Rzeszowie	
9. lek. dent. Radosław Maksymowicz /lekarz dentysta/ NZOZ DentAR w Rzeszowie	
10. lek. Krzysztof Marchewka /lekarz/ Szpital Wojewódzki w Tarnobrzegu	
11. Ks.dr hab. Janusz Miąso/duchowny/ Uniwersytet Rzeszowski	
12. dr n. farm. Maria Michna-Ciąpała /farmaceuta/ Prywatna Apteka w Rzeszowie	