

Celem projektu jest ocena zmian ekspresji składowych kompleksu inflamasomu NLRP3, jego aktywności oraz mechanizmów regulacji zależnej od wybranych cząsteczek miRNA w okresie jednego roku od momentu rozpoznania stwardnienia rozsianego (ang. multiple sclerosis, MS). Zaplanowana longitudinalna analiza ma na celu monitorowanie potencjału przeciwzapalnego wybranych terapii anty-CD20 we wczesnym przebiegu MS (bezpośrednio po postawieniu diagnozy). Badanie porównawcze wykonane zostanie w 3 punktach czasowych: (1) niezwłocznie po rozpoznaniu i zakwalifikowaniu pacjenta do leczenia, (2) po pół roku od rozpoczęcia leczenia oraz (3) w kolejnym odstępie półrocznym tj. rok od włączenia leczenia, co pozwoli na określenie bazowych wartości badanych parametrów (przed włączeniem pacjenta do programu lekowego) i ich zmian w odpowiedzi na zastosowaną terapię. Dłuższa analiza ograniczona jest ramami czasowymi trwania projektu. Jednakże kluczowe znaczenie dla wyznaczenia w projekcie wczesnych punktów monitorowania potencjału przeciwzapalnego wybranych terapii ma fakt, że pierwotnie diagnozowana postać MS to w większości przypadków faza rzutowo-remisyjna (RR) charakteryzująca się okresami zaostrzeń oraz remisji rzutów związanych z gwałtownym nasileniem procesów zapalnych. Natomiast dalszy postęp choroby koreluje z częstością i intensywnością rzutów. Przewlekły oraz ostry stan zapalny w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) prowadzi do demielinizacji i degeneracji aksonów zaburzając przewodzenie impulsów nerwowych. Procesy molekularne prowadzące do uszkodzenia neuronów w MS nie są całkowicie poznane. Jednakże, uważa się, że zmieniony zapalnie mikroglej OUN jest doskonałym środowiskiem dla funkcjonowania komórek prezentujących antygen, które mogą regulować ekspresję odpowiedzi immunologicznej. W leczeniu MS stosuje się różne doraźne formy terapii, wśród nich, najbardziej nowatorskie leczenie z zastosowaniem przeciwciał anty-CD20. Dokładny molekularny mechanizm działania tych leków w MS nie jest w pełni wyjaśniony, ale zakłada się, że obejmuje on immunomodulację poprzez wybiórcze zmniejszenie liczby i ograniczenie funkcjonowania limfocytów B z ekspresją antygeny CD20, a także subpopulacji limfocytów T CD3+.

W projekcie zaplanowano monitorowanie zmian w aktywności NLRP3, będącego molekularnym wskaźnikiem intensyfikacji procesów zapalnych w wielu chorobach, w tym o podłożu neurozapalnym. Badania obejmą wieloparametryczną analizę funkcjonalności kompleksu NLRP3 u pacjentów z RRMS otrzymujących okrelizumab - humanizowane przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko antygenowi CD20 lub ofatumumab ludzkie przeciwciało monoklonalne anty-CD20, różniące się sposobem aplikowania, dawkowaniem i farmakologią oraz tolerancją, przeciwwskazaniami i profilem bezpieczeństwa. NLRP3 jest funkcjonalnym kompleksem 3 głównych białek składowych, stanowiącym kluczowy element wrodzonego układu odpornościowego i powszechnie występującym w komórkach immunologicznych, a jego aktywacja odpowiada za produkcję czynników prozapalnych. Wykazano, że regulacja odpowiedzi zapalnej poprzez funkcjonowanie kompleksu NLRP3 ma istotne implikacje dla tworzenia się płytek demielinizacyjnych oraz postępu neurodegeneracji w wyniku procesów neurozapalnych w MS. Projekt ma za zadanie określenie znaczenia zastosowanych terapii na funkcjonalność kompleksu NLRP3 dzięki monitorowaniu zmian ekspresji jego składników (NLRP3, ASC i kaspazy-1) na poziomie mRNA i białka, poprzez strategię podłużnych porównań w 3 punktach czasowych. Równolegle, aktywność NLRP3 zostanie określona poprzez pomiar osocznego stężenia wybranych prozapalnych cytokin efektorowych (IL-1 $\beta$  i IL-18). Ponadto, badania obejmą mechanizm epigenetycznej regulacji kompleksu NLRP3 poprzez pomiar ekspresji cząsteczek egzosomalnego miRNA (7-5p, 22-3p, 30e-5p i 223-3p) posiadających udokumentowany w literaturze potencjał do regulacji funkcji kompleksu NLRP3. Egzozomy są to zewnątrzkomórkowe pęcherzyki, które aktywnie uczestniczą w mechanizmach komunikacji międzykomórkowej. Zawartość aktywnego ładunku biologicznego czyni egzozomy skutecznymi nośnikami cząsteczek sygnałowych m.in. miRNA, które regulują ekspresję wielu genów istotnych dla procesów patogenezy MS, w tym geny kodujące NLRP3. Przy czym ładunek ten, w tym profil ekspresji cząsteczek miRNA, może stanowić odzwierciedlenie procesów fizjo/patologicznych, a co za tym idzie ulegać modyfikacji w wyniku leczenia.

Uzyskane wyniki pomogą odpowiedzieć na pytanie czy aktywność kompleksu NLRP3, istotna dla przebiegu MS oraz wielu chorób przewlekłych, może być hamowana poprzez włączenie wybranej terapii anty-CD20 oraz czy może stanowić jeden z parametrów oceny skuteczności leczenia.

Atutem proponowanego projektu jest pełna diagnostyka włączanych do badania pacjentów oraz monitorowanie wpływu stosowanych terapii (w tym w ważnych dla projektu punktach czasowych) definiowane na podstawie parametrów klinicznych, cech radiologicznych, wskaźnika nawrotów choroby, skali stopnia niepełnosprawności.