

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Emina Milošević

Biomarkeri odgovora na terapiju interferonom- β
kod bolesnika sa relapsno-remitentnom
multiplom sklerozom

Doktorska disertacija

Beograd, 2015. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Dr Emina Milošević

Biomarkers of response to interferon- β
therapy in patients with relapsing remitting
multiple sclerosis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentor:

Prof. dr Dušan Popadić

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor:

Prof. dr Jelena Drulović

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komisija:

Prof. dr Marija Mostarica Stojković

Profesor emeritus Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Dragana Lavrnić

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Dejan Baskić

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu u okviru projekata „Imunopatogenetski i regulatorni mehanizmi u autoimunskim bolestima i hroničnoj inflamaciji“ (broj projekta 175038), čiji je rukovodilac prof. dr Vera Pravica, i “Komparativna analiza kliničkih parametara i biomarkera u prognozi evolucije multiple skleroze i drugih imunski-posredovanih neuroloških bolesti“ (broj projekta 175031), čiji je rukovodilac prof. dr Jelena Drulović, finansiranim od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Srbije.

Zahvaljujem se svom mentoru, profesoru Dušanu Popadiću, od kog sam počela da učim imunologiju kao student i nastaviti da učim dokle god se budem bavila imunologijom.

Profesorka Marija Mostarica Stojković je, zajedno sa profesorom Popadićem, učinila da se doživotno fasciniram otkrićima imunologije i poželim time da se bavim.

Svom komentoru, profesorki Jeleni Drulović, se zahvaljujem na izuzetnoj višegodišnjoj saradnji i podršci i radujem se nastavku.

Zahvaljujem se profesorki Dragani Lavrnić i profesoru Dejanu Baskiću finalnom oblikovanju ove teze, kolegama iz Laboratorije za imunologiju i Klinike za neurologiju koji su doprineli dobijanju rezultata i učili me, i Goranu Rakočeviću za pomoć pri analizi rezultata.

Zahvalnost dugujem svim pacijentima Klinike za neurologiju koji su učestvovali u ovom istraživanju.

Tezu posvećujem svojoj porodici.

Biomarkeri odgovora na terapiju interferonom- β kod bolesnika sa relapsno-remitentnom multiplom sklerozom

SAŽETAK

Multipla skleroza (MS) je hronična, zapaljenska, demijelinizaciona i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS). Smatra se da je MS autoimunska bolest kod koje autoreaktivni pomoćnički T-limfociti (Th) specifični za antigene mijelina pokreću proces oštećenja direktno i aktivacijom drugih imunskih i neimunskih ćelija. Njihovo dejstvo bar delom antagonizuju regulatorni T-limfociti (Treg). Prva linija terapije za najčešću formu MS, relapsno-remitentnu (RR), je interferon- β koji svoje efekte ostvaruje dejstvom na ekspresiju različitih gena. Problem koji se nameće u lečenju ovim lekom je relativno visoka učestalost slabog terapijskog odgovora. U ovoj doktorskoj disertaciji prospektivno je praćena relativna genska ekspresija iRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod bolesnika sa RRMS. Mereni su markeri biološkog odgovora na IFN- β , marker T-limfocita, Th1/17 – polarišući citokini, njihovi receptori, transkripcioni faktori Th1/17 i Treg, efektorski citokini i endogeni IFN- β pre početka terapije sa IFN- β 1b i nakon 6, 12, 24 i 36 meseci trajanja terapije. Pored toga, praćena je kinetika koncentracije odabranih proinflamatornih citokina u plazmi. Analiziran je potencijal ovih medijatora kao biomarkera kliničkog odgovora na terapiju. Tokom IFN- β terapije su se značajno menjali nivoi ekspresije svih ispitivanih gena, i to na isti način kod pacijenata koji dobro odgovaraju na terapiju i kod pacijenata koji suboptimalno odgovaraju na terapiju. IFN- β terapija nije uticala na koncentracije merenih proinflamatornih citokina u plazmi bolesnika sa RRMS. Nije postojala povezanost nivoa RNK, kao ni koncentracije citokina u plazmi sa kliničkim i demografskim parametrima obolelih. Međutim, kada su podaci analizirani u zavisnosti od pojave relapsa, nađena je povezanost niže ekspresije β 2 subjedinice receptora za IL-12 (IL-12R β 2) sa višim rizikom za pojavu relapsa. Relativna genska ekspresija IL-12R β 2 ima potencijal kao biomarker odgovora na terapiju sa IFN- β 1b. Dalja istraživanja koja bi uključila veći broj bolesnika sa RRMS su potrebna kako bi se ispitala ova pretpostavka i procenila primenljivost korišćenja relativne genske ekspresije IL-12R β 2 kao biomarkera odgovora na terapiju sa IFN- β 1b.

Ključne reči: multipla skleroza, interferon- β , odgovor na terapiju, genska ekspresija, β 2 subjedinica interleukin-12 receptora

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: imunologija

UDK broj:

Biomarkers of response to interferon- β therapy in patients with relapsing remitting multiple sclerosis

SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, and demyelinating and neurodegenerative disorder of the central nervous system (CNS). MS is considered an autoimmune disease in which autoreactive T-helper lymphocytes (Th) specific for the myelin antigens initiate the process of CNS damage directly and by activation of other immune and non-immune cells. Their action is, at least partially, antagonized by the regulatory T cells (Treg). The first line of treatment for most common form of MS, relapsing-remitting (RR), is interferon- β , whose effects are mediated via gene expression alteration. Imposed problem in application of this drug is a relatively high incidence of poor treatment response. In this doctoral dissertation relative gene expression of mRNA in mononuclear cells of peripheral blood of patients with RRMS was analyzed prospectively. Markers of the biological response to IFN- β , a marker of T-lymphocytes, Th1/17 – polarizing cytokines, their receptors, transcription factors of Th1/17 and Treg, effector cytokines and endogenous IFN- β were measured before the commencement of treatment with IFN- β 1b and after 6, 12, 24 and 36 months of therapy. In addition, the kinetics of the concentrations of selected proinflammatory cytokines in plasma were assessed. We analyzed the potential of these mediators as biomarkers of clinical response to therapy. During IFN- β treatment, levels of the relative gene expression of all examined genes were significantly changed, and in the same manner in patients who respond well to therapy, and in patients with sub-optimal responders. IFN- β therapy had no effect on the measured concentration proinflammatory cytokines measured in plasma of the patients with RRMS. There was no correlation of the RNA levels nor concentration of the cytokine in the plasma with the clinical or demographic parameters of the diseased. However, when the data was analyzed depending on the relapse timing, association of lower expression of β 2 subunit of the receptor for IL-12 (IL-12R β 2) with a higher risk of relapse was found. Relative gene expression of IL-12R β 2 has the potential as a biomarker of the response to therapy with IFN- β 1b. Further research recruiting a larger number of patients with RRMS is needed to validate this assumption and evaluate the applicability of the use of relative gene expression of IL-12R β 2 as a biomarker of the response to therapy with IFN- β 1b.

Key words: multiple sclerosis, interferon- β , therapy response, gene expression, interleukin-12 receptor β 2 subunit

Research area: medicine

Research field: immunology

UDC number:

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	MULTIPLA SKLEROZA - DEFINICIJA I EPIDEMIOLOGIJA	2
1.1.1	ODREĐIVANJE STEPENA TEŽINE BOLESTI	3
1.2	KLINIČKI TOK I FORME MS	3
1.3	EKSPERIMENTALNI MODELI MS	4
1.4	IMUNOPATOGENEZA MULTIPLE SKLEROZE	6
1.4.1	SREDINSKI FAKTORI	7
1.4.2	GENETSKA PREDISPOZICIJA	7
1.4.3	ULOGA ČELIJA IMUNSKOG SISTEMA U PATOGENEZI MULTIPLE SKLEROZE	8
1.4.3.1	Uloga Th1 i Th17 limfocita	9
1.4.3.2	Uloga regulatornih T-limfocita	11
1.4.3.3	Uloga ostalih ćelija imunskog sistema	12
1.5	TERAPIJA MULTIPLE SKLEROZE	14
1.5.1	INTERFERON-B U TERAPIJI MULTIPLE SKLEROZE	14
1.5.1.1	Farmakološki oblici interferona- β	15
1.5.1.2	Mehanizam dejstva IFN- β	15
1.5.1.3	Terapijski odgovor na IFN- β	18
1.5.1.4	Biomarkeri odgovora na terapiju interferonom- β	19
1.5.2	GLUKOKORTIKOIDI U TERAPIJI MS	20
2	CILJEVI	22
3	MATERIJAL I METODE	24
3.1	ISPITANICI	25
3.2	UZIMANJE UZORAKA KRVI	26
3.3	ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE	26
3.3.1	IZOLACIJA PLAZME I MONONUKLEARNIH ČELIJA PERIFERNE KRVI	26
3.3.2	IZOLACIJA RNK	26
3.3.3	REVERZNA TRANSKRIPCIJA	27
3.3.4	DETEKCIJA I ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE REAKCIJOM LANČANOG UMNOŽAVANJA (PCR) U REALNOM VREMENU (KVANTITATIVNI PCR, QPCR)	27

3.4	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE CITOKINA U PLAZMI	30
3.5	STATISTIČKA ANALIZA	31
4	REZULTATI	33
4.1	KLINIČKI TOK BOLESTI KOD PACIJENATA NA TERAPIJI IFN-B	34
4.2	UTICAJ TERAPIJE IFN-B NA GENSKU EKSPRESIJU	34
4.3	UTICAJ IFN-B TERAPIJE NA GENSKU EKSPRESIJU - POREĐENJE OD I NOD	52
4.4	GM-CSF, IL-17A I IL-17F PLAZMA NIVOI KOD OD I NOD PACIJENATA	60
4.5	ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE U ZAVISNOSTI OD KLINIČKIH I DEMOGRAFSKIH PARAMETARA	62
4.6	ANALIZA PODATAKA U ZAVISNOSTI OD POJAVE RELAPSA	62
5	DISKUSIJA	65
6	ZAKLJUČCI	77
7	SPIŠAK SKRAĆENICA	80
8	LITERATURA	84
9	BIOGRAFIJA	100
10	PRILOZI	102

1 Uvod

1.1 Multipla skleroza - definicija i epidemiologija

Multipla skleroza (MS) je hronična, zapaljenska, demijelinizaciona i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) (1). Bolest se na početku često manifestuje motornim i senzornim neurološkim manifestacijama, a javljaju se i simptomi i znaci zahvaćenosti malog mozga i moždanog stabla, disfunkcija bešike i creva. Prvi atak bolesti ne podrazumeva obavezno i postavljanje dijagnoze MS i naziva se klinički izolovanim sindromom (*engl.* clinically isolated syndrome, CIS). Pogoršanje ili relaps se definiše kao neurološki deficit koji traje duže od 24 h, a koji se javi najranije 30 dana od poslednje epizode, bez povišene telesne temperature i u odsustvu drugih razloga za pojavu neuroloških ispada (1). Nakon relapsa, najčešće se u početku bolesti javlja potpuni oporavak, međutim, tokom vremena neurološki deficit se akumulira. Zbog raznolikosti neurološkog nalaza kod različitih osoba pri prvoj manifestaciji MS, moraju se isključiti ostale bolesti koje dovode do sličnih znakova i simptoma (2).

Morfološki supstrat MS su promene koje se nazivaju plakovi koji nastaju kao rezultat zapaljenskog fokusa sa limfocitnom infiltracijom, praćenog demijelinizacijom i remijelinizacijom, deplecijom oligodendrocita i degeneracijom aksona i neurona. Plakovi se vizualizuju magnetnom rezonancom i, uz kliničku sliku, radiološki nalaz predstavlja jedan od parametara koji se koristi za postavljanje dijagnoze bolesti (3). Plakovi u beloju masi CNS se lakše dijagnostikuju, ali novija istraživanja ukazuju na postojanje kortikalnih lezija (4). Nastanak kortikalnih lezija se povezuje sa javljanjem kognitivnih smetnji (5). Izgleda da razvoju kognitivnih smetnji jednako doprinose i promene u beloju masi (6), smatra se zbog demijelinizacije u kritičnim regionima, a ne neurodegeneracije i akumulacije lezija tokom vremena, jer se kognitivne smetnje javljaju čak i u prvoj epizodi bolesti (7, 8). Kriterijumi za dijagnozu MS podrazumevaju dokazivanje diseminacije u vremenu i prostoru, a prihvaćeno je da se nalaz novih lezija pregledom magnetne rezonance koje ne prati neurološki deficit može koristiti kao dokaz novog ataka, prema McDonald-u i sar. (2, 3, 9).

Prema podacima iz 2013. godine procenjuje se da u svetu 2,3 miliona ljudi boluje od MS. Međutim, učestalost MS značajno varira u zavisnosti od regiona, a najviša je u severnoj Evropi (10). Prevalencija MS je oko 80-100 na 100000 stanovnika u centralnoj Evropi, a incidencija 4,3 na 100000 (11). Prema podacima iz 2001. godine MS se u Srbiji javlja sa

približnom učestalosti od 41 obolelog na 100. 000 stanovnika. Podaci iz 2011. godine dobijeni u Šumadijskom okrugu ukazuju na porast prevalencije na 64. 9 na 100. 000 stanovnika (12), a iz 2015. u Beogradskom regionu na 97 na 100.000 stanovnika (Beogradski registar obolelih od multiple skleroze, neobjavljeni podaci). Incidencija i prevalencija su geografski uslovljene: od Ekvatora ka većim geografskim širinama raste učestalost javljanja MS, kao i na manjim nadmorskim visinama. Bolest češće pogađa žene. Globalno, odnos polova je ≈ 2 (11). U svetu, prosečna starost u kojoj se javlja MS je 30 godina. Bolest se može javiti i u detinjstvu. Oko 5% obolelih je mlađe od 18 godina (10). Ipak, MS pogađa ljude u reproduktivnom periodu, dovodeći do bitnog narušavanja kvaliteta života i onesposobljenosti za rad. Pored toga, visoka cena godišnjeg lečenja obolelih čini da MS, iako ne spada u česte bolesti, značajno opterećuje zdravstveni fond. Dakle, MS ima veliki uticaj na samog bolesnika, zdravstveni fond i društvo u celini.

1.1.1 Određivanje stepena težine bolesti

Težina kliničke slike se izražava kroz skor Proširene skale statusa onesposobljenosti (*engl.* expanded disability status scale, EDSS) (13). EDSS skor izražava koliko funkcionalnih sistema CNS je zahvaćeno i u kojoj meri su disfunkcionalni. Ima raspon od 1 do 10. Vrednost 7 odgovara vezanosti za invalidska kolica, a često se vreme za koje oboleli dosegne ovaj stepen težine bolesti koristi kao merilo brzine progresije (14). Kao mera progresije MS koristi se i skor težine multiple skleroze (*engl.* Multiple Sclerosis Severity Score, MSSS), koji se zasniva na EDSS skoru i trajanju bolesti u trenutku određivanja EDSS skora (15).

1.2 Klinički tok i forme MS

Klinički tok MS varira od bolesnika do bolesnika. Ne postoje pokazatelji na osnovu kojih se sa sigurnošću može predvideti vreme i način ispoljavanja sledećeg ataka. Bolest u 80% slučajeva počinje kao CIS. Relapsi se u proseku javljaju jedanput godišnje, a nakon relapsa se javlja oporavak ili remisija. Ovakav tok je karakterističan za relapsno-remitentnu (RR) formu bolesti (16). Oboleli se nekada ne oporavlja potpuno nakon relapsa, a akumulacija simptoma i znakova između dva relapsa rezultira nastankom sekundarne progresije, koja se dešava kod 65% obolelih (sekundarno progresivna forma, SP). Kod 15% obolelih bolest počinje progresivno (primarno progresivna forma, PP) (17). Progresija se u obe forme javlja oko 40. godine života (14). Progresivno-

relapsni tok se ranije definisao kao posebna klinička forma bolesti (18), a na osnovu novijih saznanja o patogenezi danas se ne izdvaja zasebno (17).

1.3 Eksperimentalni modeli MS

Iako nijedan eksperimentalni model ne reprodukuje sve aspekte MS, mnoga saznanja o imunopatogenezi i terapiji bolesti kod čoveka su stečena upravo ispitivanjem modela na životinjama (19). Eksperimentalni modeli demijelinizacije CNS se mogu indukovati hemijski (kuprizon, etidijum-bromid, lizolecitin) ili inficiranjem virusima koji dovode do demijelinizacije (Tajlerov virus mišjeg encefalomijelitisa, virus mišjeg hepatitisa) (20). Takođe, postoje i modeli demijelinizacije dobijeni genetskim inženjeringom kod kojih su različiti citokini konstitutivno eksprimirani u CNS (21, 22), ili se davanjem difteričnog toksina selektivno eliminišu oligodendrociti (23). Najšire se koristi najstariji model, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE). Prvi dokumentovan eksperiment izveden je još 1925. godine imunizovanjem zeca homogenatom humane kičmene moždine (24). EAE se može izazvati kod glodara i primata, imunizacijom antigenima CNS ili pasivnim transferom encefalitogenih T-limfocita. Podložnost razvijanju EAE-a, klinička slika, i tok EAE zavise od soja, genotipa životinja i načina indukcije. Zbog raznolikosti modela EAE često je teško preneti saznanja na MS, ali su razlike među eksperimentalnim modelima omogućile sagledavanje kompleksnog i heterogenog patogenetskog procesa u MS.

„Klasičan“ model EAE u kojem se eksperimentalna životinja imunizuje antigenima CNS uz dodatak adjuvansa ukazao je na ključnu ulogu CD4⁺ T-limfocita u pokretanju patološkog procesa u CNS, što je potvrđeno činjenicom da CD4⁺ T-limfociti izdvojeni iz imunizovane životinje i restimulirani *in vitro* istim antigenom izazivaju EAE u naivnom primaocu (25). Različiti sojevi miševa su podložni indukciji različitim antigenima CNS, kao što su bazni protein mijelina (*engl.* myelin basic protein, MBP), proteolipoprotein (PLP) i mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG). Sojevi B10. PL ili PL/J, korišćeni u prvim eksperimentima, imunizovani su peptidom koji sadrži od 1-11 aminokiseline MBP. SJL miševi su se pokazali osetljivim na indukciju MBP i PLP (26). Potom je otkriveno da se kod soja C57BL/6 može indukovati bolest nakon imunizacije peptidom koji se sastoji od 35-55 aminokiseline MOG (27). Bolest indukovana MOG-peptidom 35-55 kod C3H. SW soja je hronična, prilično uniformnog toka, ali bez remisije, za razliku od

EAE-a indukovanog uz MBP ili PLP. Isti peptid u soju sa drugim haplotipom glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility kompleks, MHC), kakav je npr. PL, dovodi do hronične relapsirajuće bolesti koja varira od životinje do životinje u pogledu progresije i simptoma. Među visokosrodnim sojevima pacova, Lewis i Dark Agouti (DA) su osetljivi na indukciju.

Pored osetljivih, postoje visokosrodni sojevi miševa (BALB/c) i pacova (Brown Norway, PVG i Fischer 344 (F344)) koji su relativno rezistentni na indukciju EAE-a. U rezistentne sojeve spada i Albino Oxford (AO) soj pacova, za koje je u našoj laboratoriji ranije pokazano da su skoro potpuno otporni na imunizaciju sa antigenima mijelina (28). Osetljivost na indukciju EAE-a je kod pomenutih sojeva životinja genetski determinisana, ali još uvek se ne zna koji geni su za to odgovorni. Značaj ispitivanja sojnih razlika kod životinja je u tome što doprinosi saznanjima o genetskoj osnovi sa rizikom za razvijanje MS u odnosu na ostale ljude u populaciji.

Ciljana delecija pojedinih gena (kod nokaut-životinja) urođene ili stečene imunosti koja rezultira rezistencijom na indukciju EAE ukazuje na značaj konkretnih molekula koje ti geni kodiraju. Tako životinje sa delecijom gena za receptore slične Toll-u (*engl.* Toll-like receptors, TLR), npr. TLR3, TLR4 i TLR9, ili adapterski protein MyD88 (*engl.* myeloid differentiation primary response 88) preko kog se sprovodi signal sa većine TLR, na genetski osetljivoj C57BL/6 osnovi postaju rezistentne na indukciju EAE. U pogledu molekula stečene imunosti, delecija gena za citokine dovodi do blaže kliničke slike EAE, kaonpr. delecija interleukin (IL)-17A (29), ili EAE u potpunosti izostaje u slučaju delecije faktora stimulacije kolonija granulocita i monocita (*engl.* granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)(30).

Osim toga, EAE se razvija spontano u mišijem modelu kod transgenih životinja nosilaca T-ćelijskog receptora (*engl.* T cell receptor, TCR) specifičnog za antigene mijelina, ili dvostruko transgenih životinja, kod kojih su iB-limfociti specifični za MOG (31, 32). Ovim modelima je potvrđeno da naivni T-limfociti specifični za antigene mijelina mogu da dovedu do EAE i bez egzogeno datog antigena.

Što se tiče uticaja načina indukcije, različiti adjuvansi u encefalitogenoj smeši sa istim antigenom mogu bitno da menjaju tok i kliničku sliku EAE. Često se koristi Frojndov adjuvans, smeša parafina i manidin-monooleata, mineralnih ulja koja se ne metabolišu.

Primenjuje se kao emulzija voda-u-ulju, zajedno sa antigenom. Bez dodatka bakterija (*M. tuberculosis*) naziva se nekompletnim Frojndovim adjuvansom (*engl.* incomplete Freund's adjuvant, IFA), a sa dodatkom bakterija, kompletnim Frojndovim adjuvansom (*engl.* complete Freund's adjuvant, CFA). Imunizacioni protokol sa CFA dovodi do bržeg razvoja i težeg toka EAE-a, u odnosu na IFA.

Karakteristično za „klasičan“ EAE je da zapaljenski proces pogađa kičmenu moždinu, dovodeći do ascendentne paralize, relativno štedeći mozak. To predstavlja bitnu razliku u distribuciji lezija u odnosu na MS, verovatno kao rezultat razlike u samoj patogenezi EAE i MS. Međutim, postoji nekoliko modela kod kojih lezije nastaju u mozgu. Životinje sa atipičnim EAE razvijaju ataksiju. Jedan od modela atipičnog EAE dobijen je delecijom gena za interferon (IFN)- γ ili za receptor za IFN- γ (33).

Ispitivanjem EAE na SJL mišu nađeno je da ga karakterišu relapsi i remisije, poput RRMS. Rezultati ukazuju da je za mehanizam ovakvog toka zaslužan fenomen širenja epitopa, tj. da se tokom novih ataka javlja odgovor usled privlačenja naivnih T-limfocita na mesto inflamacije, a čiji su TCR različite specifičnosti od T-limfocita koji su indukovali inicijalno oštećenje. Time se pokreće novi talas autoimunskog odgovora (34-36). Biozzi ABH miševi nakon imunizacije homogenatom kičmene moždine razvijaju EAE koji je u početku relapsno-remitentni, a zatim prelazi u hroničnu progresivnu formu, predstavljajući model za SPMS (37). Ovaj model je značajno doprineo ispitivanju lekova, kao što je fingolimod, za koji se pokazalo da ublažava relapsno-remitentnu fazu, a ali ne i progresivnu fazu u ovom modelu (38).

1.4 Imunopatogeneza multiple skleroze

Najšire prihvaćeno stanovište je da je MS autoimunska bolest kod koje određeni faktori sredine kod osobe sa genetskom predispozicijom doprinose aktivaciji autoreaktivnih T-limfocita specifičnih za antigene mijelina, koji prolaze krvno-moždanu barijeru (KMB), gde se reaktiviraju na lokalnim antigen-prezentujućim ćelijama (*engl.* antigen-presenting cells, APC), i pokreću proces oštećenja direktno i aktivacijom drugih imunskih i neimunskih ćelija (39). Kao i kod većine multifaktorijalnih oboljenja, ne zna se sa sigurnošću koji faktori sredine i na koji način pokreću patološki proces, kao ni šta to determiniše genetsku podložnost obolelih od MS. O uzrocima MS se još uvek govori sa većom ili manjom neizvesnošću.

1.4.1 Sredinski faktori

Studije migranata ukazuju da sigurno postoje faktori iz okruženja koji utiču na nastanak bolesti. Naime, rizik za oboljevanje od MS raste ukoliko osobe sa područja niske prevalencije migriraju u područja visoke prevalencije i obratno. Pri tom, izgleda da je ključno u kom starosnom dobu se promeni prebivalište: selidba iz oblasti visokog rizika u oblast niskog rizika snižava šansu za MS (1). Međutim, nijedan od ispitivanih faktora nije dokazan kao uzročnik ovog fenomena. Najopsežnije su ispitivani infektivni agensi, pre svega virusi, kao što je Epštajn Bar virus (EBV). Nesigurnost dokaza u prilog virusne etiologije MS je rezultirala ispitivanjem čitavog niza potencijalnih činilaca, koji bi mogli i da deluju sinergistički, kao što su nedovoljna izloženost Sunčevoj svetlosti, nedostatak vitamina D, ishrana, toksini i cigarete, način ishrane (1). U EAE modelu je pokazano da bi okidač za aktivaciju autoreaktivnih T-limfocita mogla da bude crevna mikrobiota (40). Međutim, direktni dokazi o mehanizmu dejstva spoljašnjih faktora u MS i dalje nedostaju (41, 42).

1.4.2 Genetska predispozicija

Studije jednojajčanih blizanaca iz Kanade i Velike Britanije ukazuju da je procenat razboljevanja jednojajčanih blizanaca oko 25%, u odnosu na dvojajčane kod kojih je 5% (43, 44). Veća je i učestalost MS kod dece čija su oba roditelja obolela nego kada je jedan roditelj oboleo (45, 46). Rizik se smanjuje sa smanjenjem stepena srodstva (1). Grupisanje obolelih u okviru porodica ukazuje na uticaj genetske osnove u nastanku MS.

Saznanje da su CD4⁺ T-limfociti ključni za otpočinjanje zapaljenskog procesa u EAE je pružilo objašnjenje za jaku korelaciju podložnosti oboljevanja od MS i određenih alelskih varijanti MHC, odnosno gena humanih leukocitnih antigena (HLA). Pojedini, aleli u okviru HLA II klase, i to pre svega HLA-DRB1*15:01, uvećavaju rizik nastanka bolest kod nosilaca, iako su nezavisni geni koji nose rizik identifikovani u okviru HLA I klase i van HLA. Mehanizam povezanosti određenih alelskih varijanti HLA lokusa sa povećanim rizikom za MS nije jasan. Jedno od objašnjenja je da spoljašnji faktori reaguju sa regulatornim sekvencama unutar regiona HLA II klase. Tako je pokazano da vitamin D povećava ekspresiju HLA II klase selektivno u HLA-DRB1*15 pozitivnim ćelijama. To bi moglo da dovede do nedovoljne negativne selekcije autoreaktivnih T-limfocita u timusu kod ljudi sa HLA-DRB1*15:01 alelom, koji bi, usled nedostatka vitamina D, imali sniženu ekspresiju MHC II klase (47). Ipak, prisustvo određenih HLA alela je nedovoljno da

prouzrokuje ili predvidi razvoj MS, implicirajući da postoje drugi genetski faktori koji doprinose razvoju bolesti (48).

Zatim su geni od interesa van HLA lokusa ispitivani kroz studije povezanosti gena kandidata (*engl.* candidate gene association studies, CGAS). Najčešće je analizirano nekoliko stotina obolelih i kontrola, ali nađene pozitivne i negativne korelacije nisu bile reproducibilne. Drugi pristup, studije povezanosti (*engl.* linkage studies) mikrosatelitne DNK nisu imale dovoljnu moć za donošenje zaključaka o udruženosti gena van HLA regiona i podloznosti oboljevanju od MS (49). Tek kada je tehnološki napredak omogućio obimna istraživanja koja uključuju desetine hiljada pacijenata i kontrola, rezultati su i uspešno reprodukovani. Ove najopsežnije studije ne podrazumevaju radnu hipotezu, već ispituju povezanost prisutnih alela sa bolešću skriningom celog genoma (*engl.* genom-wide association studies, GWAS), i to za polimorfizme pojedinačnih nukleotida (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP) (50). U dosada najopsežnijoj GWAS koju je sproveo Međunarodni konzorcijum za genetiku multiple skleroze (*engl.* International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, IMSGC) je analizirano 14498 pacijenata i 24091 kontrola za 161311 autozomalnu SNP varijantu. Nakon validacije, potvrđeni su prethodno otkriveni rizični aleli (51) i ukupno otkriveno je 110 alelskih varijanti sa rizikom za MS izvan MHC lokusa skriningom genoma ukupno 80094 ososbe (52). Pa ipak, smatra se da zajedno sa rizičnim alelima u okviru MHC regiona otkriveni aleli objašnjavaju 28% nasledne sklonosti ka oboljevanju od MS. Izazov koji predstoji je analiza funkcionalne povezanosti identifikovanih alela rizika za MS (50). U tom smeru su učinjeni naponi (53). Interesantno je da se najveći broj rizičnih SNP grupiše u okviru ili u blizini gena čiji produkti regulišu ili učestvuju u imunskom odgovoru, što govori u prilog tvrdnji da je MS imunski posredovana bolest (54).

1.4.3 Uloga ćelija imunskog sistema u patogenezi multiple skleroze

Najčešće se opisuju četiri patohistološka obrasca oštećenja CNS u MS (55, 56): oštećenje tkiva sa prisustvom T-limfocita i makrofaga (obrazac 1); imunska reakcija uperena na oligodendrocite i mijelin posredovana komplementom i antitelima (obrazac 2); oštećenje koje podseća na ono posredovano hipoksijom, moguće usled inflamacijom-indukovanog oštećenja krvnog suda ili toksina makrofaga koji remete funkciju mitohondrija (57) (obrazac 3); i oštećenje primarno nastalo usled degeneracije oligodendrocita, pretpostavlja se usled genskog defekta ili polimorfizma koji ih čini

podložnim imunski-posredovanom oštećenju (obrazac 4). Postoje dva gledišta: jedno, da obrazac demijelinizacije zavisi od stadijuma bolesti tj. da se javlja kod većine obolelih u određenom stadijumu bolesti (bar u ranoj aktivnoj MS) (58, 59), i drugo, da je određeni obrazac oštećenja karakterističan za osobu i da reflektuje individualni patogenetski mehanizam, pre nego zavisnost od trajanja bolesti (60). Ovo drugo gledište nameće zaključak da je za lečenje MS neophodno pronaći individualni terapijski pristup, u skladu sa patogenetskim mehanizmom.

Dakle, pokazano je da skoro sve komponente imunskog sistema u određenoj meri učestvuju u nastanku lezija u CNS, ali je opšte prihvaćeno da autoimunska oštećenja u MS pod kontrolom pomoćničkih T-limfocita (*engl.* T helper, Th) (61). U perifernim limfnim organima, još uvek nepotpuno definisani antigeni aktiviraju mijelin-specifične T-limfocite koji prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) i ulaze u CNS (62). U parenhimu CNS, T-limfociti reaktivirani od strane rezidentnih ćelija koje prezentuju antigene mijelina, iniciraju zapaljenje koje dovodi do povećane propustljivosti KMB i nakupljanja još većeg broja T-limfocita, ali i B-limfocita, monocita i drugih ćelija imunskog sistema. Smatra se da imunski odgovor koji dovodi do inflamacije i posledične demijelinizacije i degeneracije aksona nastaje prvenstveno pod delovanjem Th1 i Th17 limfocita.

1.4.3.1 Uloga Th1 i Th17 limfocita

Kao što je prethodno rečeno, CD4⁺ T-limfociti imaju centralnu ulogu u indukciji zapaljenskog procesa u EAE i MS. Osamdesetih godina XX veka CD4⁺ T ćelije su podeljene na Th1 i Th2 na osnovu citokina koje sekretuju i transkripcionih faktora koje ekspimiraju (63). IL-12 indukuje diferencijaciju Th1 ćelija koje proizvode IFN- γ i ekspimiraju transkripcioni faktor T-bet (*engl.* T-box expressed in T cells). Th2 ćelije indukuje IL-4, one sekretuju IL-4, IL-5 i IL-13, pod kontrolom transkripcionog faktora GATA3. Smatralo se da Th1 imaju patogenu, a Th2 protektivnu ulogu u MS i EAE (64). Međutim, uloga Th1 je dovedena u pitanje kada je pokazano da su miševi bez gena za IL-12p35 subjedinicu, njoj odgovarajuću komponentu receptora (IL-12R β 2) ili gena za IFN- γ podložniji, a miševi sa delecijom gena za IL-12p40 subjedinicu potpuno otporne na indukciju EAE (65-67). Objašnjenje je usledilo kada je otkriveno da je IL-12p40 deo još jednog citokina, IL-23. Zapravo je delecijom gena za p40 onemogućeno dejstvo i IL-23, za koji se pokazalo da je neophodan za indukciju EAE (68). Ispitivanjem njegove uloge

utvrđeno je da učestvuje u indukciji do tada nepoznate populacije pomoćničkih T-limfocita koje su po glavnom citokinu koji proizvode, IL-17, nazvane Th17 (69). Transkripcijski faktor ove ćelijske populacije je ROR γ t (*engl.* retinoic acid orphan receptor gamma t) (70). Th1 i Th2 citokini IFN- γ i IL-4 antagonizuju diferencijaciju Th17 (71, 72). Th17 proizvode 6 citokina iz porodice IL-17 (označenih IL-17A do F), kao i IL-21 i IL-22 (73, 74).

Pokazano je da i Th1 i Th17 populacije imaju ulogu u nastanku EAE. Miševi bez T-bet kao i bez ROR γ t su otporni na indukciju EAE (70, 75). Pasivnim transferom mijelin-specifičnih ćelija se jednako uspešno izaziva EAE, bilo da su tretirane pod Th1 ili Th17 polarišućim uslovima. Razlike postoje u patološkom nalazu: Th1 indukuju zapaljenje sa predominacijom makrofaga, a Th17 sa predominacijom neutrofila u infiltratima u CNS (76). Takođe, lokalizacija lezija i klinička slika se razlikuju: atipični encefalitis sa infiltratima u mozgu nakon transfera Th17 nasuprot tipičnog EAE i zahvaćenosti samo kičmene moždine nakon transfera Th1 ćelija (77). Pored toga, fenomen plastičnosti Th17 dodatno komplikuje razumevanje njihovog značaja za nastanak EAE. Naime, postoje Th koje proizvode i IFN- γ i IL-17 (78) i ispoljavaju transkripcijske faktore karakteristične za obe efektorske populacije, T-bet i ROR- γ t (79, 80). Pokazano je čak i da Th17 nisu homogene u pogledu indukcije i fenotipa i da mogu da se konvertuju u Th1, i ekspresiraju T-bet (81).

Ipak, delecija efektorskih citokina kod miša ne sprečava nastanak EAE, bar ne u potpunosti kao nedostatak IL-23. S druge strane anti-IL-12/23p40 antitelo nije imalo terapijski uspeh (82, 83), a EAE se može izazvati i kod nokauta za IFN- γ i IL-17A (29, 65, 84). Nedostatak IFN- γ daje težu kliničku sliku EAE, što je paradoksalno s obzirom da davanje IFN- γ dovodi do egzacerbacije MS (85, 86). Štaviše, EAE se može indukovati u istovremenom odsustvu IFN γ i IL-17A (87). Evidentno, IFN- γ i IL-17A nisu neophodni za EAE. Nametnulo se pitanje koji citokin nishodno od IL-23 je neophodan. Odgovor bi mogao da bude GM-CSF (87). Pokazano je da Th1 i Th17 izazivaju EAE samo ako proizvode i GM-CSF (88). Delecija *CSF2*, gena koji kodira GM-CSF, rezultira kompletnom rezistencijom na indukciju EAE, a koja se može prevazići davanjem GM-CSF (30). Interesantno je da kod miša produkcija GM-CSF zavisi od IL-23 i ROR γ t, kao i IL-17 (88, 89). Nasuprot tome, izgleda da kod čoveka humane Th koji proizvode GM-CSF indukuje IL-12/T-bet osovina, a inhibiraju ih Th17-polarišućí uslovi. Pri tom, i humane i mišje Th

koje proizvode samo GM-CSF se razlikuju od Th1 i Th17 (90, 91). Najnovija ispitivanja su identifikovala monocite kao ciljane ćelije koje oštećuju tkivo a zavise od GM-CSF (92, 93). Pored opisane proinflamatorne uloge GM-CSF postoje i rezultati koji ukazuju na njegovu regulatornu ulogu zasnovanu na indukciji tolerogenih dendritskih ćelija (94). GM-CSF je detektovan u likvoru i serumu pacijenata obolelih od MS u većoj koncentraciji u relapsu u odnosu na fazu remisije (95). Kliničke studije u kojima se primenjuje anti-GM-CSF antitelo MOR103 u reumatoidnom artritisu (RA) (96) i multiploj sklerozi (97) su u toku.

Među citokinima koje proizvode Th je i TNF, čija je proinflamatorna uloga uopšte (98), kao i u EAE-u dobro dokumentovana (99, 100). Kod obolelih od MS su nađeni povišene koncentracije TNF u CSF (101), prisutan je u lezijama (102), i izgledalo je da koreliše s progresijom bolesti (103). U kontradikciji sa ovim nalazima je činjenica da anti-TNF terapija nema povoljan, već naprotiv, pogoršava MS (104). Povrh toga, tokom anti-TNF terapije u zapaljenskim bolestima kao što su RA i inflamatorna bolest creva (*engl.* inflammatory bowel disease, IBD) se sve češće opisuju neurološki ispadi usled demijelinizacionih promena (105). Prema tome, izgleda da TNF u MS ima dvostruku ulogu.

1.4.3.2 Uloga regulatornih T-limfocita

Nije u potpunosti razjašnjeno zbog čega u MS i EAE dolazi do ograničenja inflamacije. Smatra se da regulatorni CD4⁺CD25^{hi} T limfociti (Treg) imaju ulogu u nastanku kliničkog poboljšanja kod RRMS (106). Postoje dve populacije Treg: prirodne regulatorne ćelije koje već po maturaciji u timusu ispoljavaju svoju supresorsku funkciju (*engl.* natural T regulatory cells, nTreg) (107) i indukovane (iTreg), koje na periferiji nastaju od zrelih CD4⁺ T ćelija i stiču efektorsku funkciju pod dejstvom transformišućeg faktora rasta-β (*engl.* transforming growth factor-β, TGF-β) (108, 109). Za efektorsku funkciju i stabilnost populacije Treg smatra se da je neophodna ekspresija transkripcionog faktora FoxP3 (*engl.* forkhead box P3). Nastanak antiinflamatornih Treg i proinflamatornih Th17 opredeljuje interakcija na nivou transkripcionih faktora. Runx1 posreduje u diferencijaciji reagujući sa FoxP3 ili RORγt (110). Jedan od mehanizama kojima se inhibira imunski odgovor je sekrecija antiinflamatornih citokina, kao što je IL-10 (111). Međutim, pored regulatornih T ćelija, IL-10 mogu da proizvode i same Th1 i Th17, što se

smatra vidom autokrine kontrole (112). Ispitivanja pokazuju da kod obolelih od MS postoji deficit supresorske funkcije i samog broja Treg (113).

1.4.3.3 Uloga ostalih ćelija imunskog sistema

Iako se smatra da pomoćnički T-limfociti imaju ključnu ulogu u otpočinjanju imunopatogenetskog procesa u MS, mnogo drugih ćelija imunskog sistema različitim mehanizmima doprinosi nastanku lezija i potencira zapaljenski proces. Efekti B-limfocita, CD8⁺ T-limfocita, NK (*engl.* natural killer) i NKT ćelija su nedovoljno jasni, sa rezultatima koji objašnjavaju i pozitivne i negativne uticaje.

Iako uloga B-limfocita nije rasvetljena, jedan od parakliničkih parametara za dijagnozu MS je upravo zasnovan na aktivaciji B-limfocita: prisustvo oligoklonalnih traka u likvoru. One govore o prisustvu povećane količine antitela diskretnih specifičnosti. Dalje, jedan od obrazaca oštećenja neurona (obrazac 2) je posredovan antitelima specifičnim za neurone koja aktiviraju komplement i dovode do lize neurona (1). Nezavisno od produkcije mijelin-specifičnih antitela, B-limfociti kao APC aktiviraju patogene Th (114), i stimulišu ih produkcijom IL-6 (115). Takođe, pospešuju propustljivost krvno-moždane barijere sintezom matriksne metaloproteinaze (MMP)-9 (116). Ipak, uspeh anti-CD20 antitela (rituksimaba) se može objasniti i deplecijom CD20⁺ T-limfocita (117). Nasuprot proinflamatornoj ulozi, B-limfociti imaju i regulatorna svojstva posredovana IL-10, kao i nezavisna od IL-10 (118).

CD8⁺ T-ćelije dominiraju u infiltratima CNS kod obolelih od MS. Pri tom je nađen sličan repertoar TCR ovih ćelija u lezijama CNS, likvoru i krvi (119). Pored citotoksičnih efekata, pojedine necitotoksične subpopulacije CD8⁺ T-limfocita imaju sposobnost da sekretuju IFN- γ i IL-17 (120), čime mogu da doprinesu zapaljenskom procesu u MS. Međutim, u eksperimentalnom modelu je pokazano da same nisu dovoljne da pokrenu klinički značajno oštećenje, za razliku od pomoćničkih T-limfocita (121).

Makrofagi u CNS dobijaju proinflamatorni fenotip, moguće pod dejstvom proinflamatornih citokina IFN- γ , IL-1 β , TNF i GM-CSF koje sekretuju mijelin-specifični T-limfociti (122), faktora inhibicije migracije makrofaga (123) i komplementa (124). Makrofagi u CNS nisu homogena populacija i imaju različito poreklo. Makrofagi porekla monocita posreduju u oštećenju mijelina, a oni porekla mikroglije imaju ulogu u eliminaciji ćelijskog debrija (125).

NK ćelije ispoljavaju proinflamatornu i regulatornu ulogu u MS i EAE. Deplecija NK ćelija u EAE je dala oprečne rezultate. Pogoršanje EAE se pripisuje nedostatku lize autoreaktivnih T-limfocita od strane NK ćelija (126), a poboljšanje uticaju na T-limfocite koji rezultira sniženjem njihove reaktivnosti i broja ćelija koji infiltrira CNS (127). Subpopulacija CD56^{bright} NK ćelija sa regulatornim svojstvima je brojnija u odnosu na efektorske CD56^{dim} NK ćelije u likvoru kod MS pacijenata i inflamatornih neuroloških bolesti u odnosu na neinflamatorne neurološke bolesti (128, 129), sugerišući da prave protivtežu zapaljenskom procesu. Tako se uspeh terapije daklizumabom (humanizovano anti-CD25 antitelo) objašnjava i povećanjem broja regulatornih CD56^{bright} ćelija (130).

NKT limfociti mogu da sekretuju citokine i imaju regulatorna svojstva, a njihova specifičnost za glikozilirane lipide koji su sastojci mijelina čini ih potencijalno interesantnom terapijskom metom. Za sada njihova uloga u MS nije rasvetljena, a postoje studije koje su pokazale snižen broj ovih ćelija u perifernoj krvi obolelih u odnosu na druge autoimunski-posredovane neurološke bolesti i bolesti drugih sistema organa (131).

Među manje brojnim populacijama imunskih ćelija koje imaju ulogu u patogenezi MS su $\gamma\delta$ T-limfociti. Oni su značajan izvor IL-17 (132). Interesantno je da proinflamatorna, odnosno regulatorna uloga ovih ćelija povezana sa subpopulacijama sa različitom građom TCR (133).

Urođene limfoidne ćelije (*engl.* innate lymphoid cells, ILC) potiču od zajedničkog limfoidnog prekursora kao i NK ćelije. Diferenciraju se u tri grupe efektorskih ćelija koje su pandan Th (134). Slično $\gamma\delta$ T-limfocitima, citokini koji kontrolišu nastanak Th17 indukuju i ILC da pod kontrolom ROR γ t sintetišu IL-17 i GM-CSF u EAE. Smatra se da ILC 3 koje su rezidentne u meningama, i koje se rapidno dele u uslovima oštećenja tkiva, svojim proinflamatornim kapacitetima podstiču prolazak T-limfocita u parenhim CNS (135). Njihov broj je povećan u krvi obolelih od RRMS u odnosu na zdrave ljude (130).

Granulociti u tkivu žive kratko, retko su prisutni u infiltratima i nisu detaljnije proučavani u MS. Međutim, ne može se isključiti ni uloga neutrofila u MS (136), s obzirom da je osnovno dejstvo Th17 citokina upravo aktivacija neutrofila (137).

1.5 Terapija multiple skleroze

Ne postoji lek koji može izlečiti MS. Savremena terapija MS podrazumeva tretman relapsa, lekove koji menjaju prirodan tok bolesti i simptomatsku terapiju (fizikalna terapija, terapija zamora, spasticiteta i dr.). Relapsi se leče visokim dozama glukokortikoida (GK) ili, ukoliko se oni pokažu neefikasnim, izmenama plazme (plazmaferezom). Lekovi koji menjaju prirodan tok bolesti odobreni od strane evropske i američke administracije za hranu i lekove su: različiti oblici IFN- β , glatiramer-acetat, dimetil-fumarat, fingolimod, teriflunomid, natalizumab, alemtuzumab i mitoksantron. U Srbiji se od ovih lekova primenjuju IFN- β , glatiramer-acetat i mitoksantron. Dalje će biti više reči o terapiji koju su dobijali pacijenti kohorte koja je analizirana u ovoj doktorskoj disertaciji: IFN- β kao osnovnoj terapiji i GK za tretman relapsa.

1.5.1 Interferon- β u terapiji multiple skleroze

Interferoni su otkriveni 1957. godine kao proteini koji imaju ulogu u sprečavanju virusne replikacije (138). Razmatranja viruse etiologije MS su podstakla primenu interferona. Nakon neuspeha terapije IFN- γ (85, 86), pokušalo se sa tipom I interferona. IFN- β 1b je 1993. godine odobren za lečenje MS u SAD. Predstavlja prvu terapiju MS za koju je dokazano da menja prirodan tok bolesti. Danas je IFN- β prva terapijska linija u lečenju RRMS.

IFN- β snižava stopu relapsa i diskretno ublažava progresiju bolesti (139). Ipak, kod 30-50% bolesnika sa RRMS lečenih sa IFN- β ne postiže se očekivani povoljni terapijski odgovor (140). Neželjena dejstva ove terapije su najčešće reakcije na mestu injekcije, simptomi slični gripu, glavobolja, astenija, infekcije gornjeg respiratornog trakta, parestezije, groznica i osip. Najčešći poremećaj u laboratorijskim nalazima je limfopenija, koja se javlja kod značajnog broja pacijenata. Mogu da budu povišeni enzimi jetre (AST, ALT) i snižen broj neutrofila. Najozbiljnija neželjena dejstva su depresija sa suicidalnim idejama i nekroza na mestu uboda (141).

Troškovi IFN- β 1b terapije u SAD su od inicijalnih 11532\$ godišnje za 1993. godinu, kada je terapija uvedena, porasli na procenjenih 61,529\$ za 2013. godinu (142). Jedini razlog koji objašnjava ovaj skoro šestostruki porast cene, kako autori navode, je formiranje cene koja bi bila uporediva sa cenom novih lekova koji modulišu prirodan tok bolesti. Jedan od tih lekova, dimetil-fumarat se koristi i za lečenje psorijaze. Pitanja zašto je

njegova cena za MS desetinu hiljada puta veća nego za lečenje psorijaze i zašto stariji lekovi za MS prate cene novih lekova ostaju bez odgovora (142). Pri tom, cena terapije IFN- β 1b u Evropi nije pratila ovaj trend. Kod nas je veleprodajna cena koju navodi Republički fond za zdravstveno osiguranje (RFZO) u 2015. godini 77752 dinara za 30 dana tj. nešto manje od 8000 EUR godišnje (143).

1.5.1.1 Farmakološki oblici interferona- β

Farmakološki oblici IFN- β su IFN- β 1a (Avonex, primenjuje se intramuskularno; Rebif, primenjuje se supkutano), pegilovani IFN- β 1a (Plegridy, primenjuje se supkutano) i IFN- β 1b (Betaferon, Betaseron, primenjuju se supkutano). Način proizvodnje IFN- β 1a i IFN- β 1b se razlikuje. IFN- β 1b se dobija u genetski modifikovanoj *E. coli*, a IFN- β 1a u modifikovanoj ćelijskoj liniji porekla jajnika kineskog hrčka. IFN- β 1b dobijen iz prokariotske ćelije se razlikuje u sekvenci aminokiselina (serin na poziciji 17 je suspsituisan cisteinom, nedostaje N-terminalni metionin) i nije glikoziliran, dok je IFN- β 1a identičan endogenom IFN- β čoveka. Zbog toga je potrebna veća količina proteina u pojedinačnoj dozi IFN- β 1b da bi se ostvario terapijski efekat, što bi moglo da dovede do agregacije molekula. Nastanak agregata, razlika u aminokiselinskoj sekvenci i nedostatak glikozilacije se smatraju razlozima veće imunogenosti IFN- β 1b (144).

1.5.1.2 Mehanizam dejstva IFN- β

Prirodni IFN- β sekretuju fibroblasti, a vezuje se za receptor koji se sastoji od dve subjedinice IFNAR1 i IFNAR2. Angažovanje receptora aktivira Janus kinazni (JAK) provodnik signala i aktivator transkripcije (*engl.* signal transducer and activator of transcription, STAT) put, gde se fosforilišu STAT1 i STAT2 (145). Oni dimerizuju i vezuju se za IFN regulatorni faktor (IRF) 3, prelaze u jedro i vezuju se za sekvence odgovora na stimulaciju IFN (*engl.* interferon-stimulated response elements). To zauzvrat aktivira gene stimulisane IFN i dovodi do sinteze antivirusnih, antiproliferativnih i antitumorskih genskih produkata (146). IFN- β utiče na ekspresiju preko stotinu gena (147-149). Uopšte, IFN I tipa su citokini sa izraženom plejotropnošću. Ispoljavaju čitav spektar regulatornih svojstava sa uticajem na proliferaciju ćelija, imunoregulaciju i citoprotekciju. Dalje će biti više rečeno o mogućim mehanizmima kojim IFN- β postiže terapijski efekat u MS.

1.5.1.2.1 Dejstvo na T-limfocite

Pored uticaja na aktivaciju dejstvom na smanjenje MHC II klase i kostimulatornih molekula na APC, IFN- β deluje inhibitorno na proliferaciju T-limfocita (150, 151). IFN- β pospešuje apoptozu autoreaktivnih T-limfocita stimulišuću ekspresiju CTLA4, kostimulatornog molekula koji negativno reguliše T-limfocite, i Fas (152).

Takođe, IFN- β snižava produkciju proinflamatornih citokina. Povećava unutraćelijski nivo inhibitora citokina solubilnog TNF-receptora II (sTNF-RII) i IL-1 receptor antagonista (153). Deluje na odnos proinflamatornih i antiinflamatornih citokina inhibicijom Th1/Th17 citokina i stimulisanjem Th2 odgovora, koji deluju antiinflamatorno (154-156). Inhibira efekte IL-12 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNČPK) i T-ćelijama specifičnim za MBP, a s druge strane povećava produkciju IL-10 (157). Međutim, u EAE-u IFN- β tretman zahteva IFN- γ za supresiju bolesti (19). Axtell i sar. postuliraju da IFN- β selektivno pogoršava Th17-posredovanu patologiju (158). Zanimljivo je i da nedovoljna endogena produkcija IFN- β kod pacijenata sa MS može da dovede do povećane produkcije patogenih citokina (159). Moguće objašnjenje je da usled izostanka inhibitornog dejstva IFN- β na produkciju IL-1 β i IL-23 i stimulatornog dejstva na produkciju IL-27 (155, 160) od strane dendritskih ćelija i IL-10 produkciju od strane B-ćelija (161), prevagne uticaj proinflamatornih citokina. Postoje rezultati koji ukazuju da kod pacijenata koji proizvode dosta endogenog IFN- β egzogeno dodat IFN- β ima ograničeno dejstvo (158).

Pored navedenog, IFN- β povećava ekspresiju CCR7 na T-limfocitima, čime se fenotip efektorskih ćelija menja u fenotip centralne memorije, tj. usmerava T-ćelije u limfna tkiva pre nego u CNS (162). IFN- β ometa adheziju T-ćelija za endotel u sastavu KMB (163, 164).

IFN- β povećava broj i pospešuje regulatornu funkciju CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg (165, 166). Ova terapija povećava i broj CD8⁺ T-regulatornih ćelija (167), kao i broj CD56^{bright} NK ćelija koje imaju regulatornu ulogu, što koreliše sa povoljnim kliničkim odgovorom (128).

1.5.1.2.2 Dejstvo na B-limfocite

IFN- β može da utiče na B-ćelije na više načina. IFN- β tretman B-ćelija inhibira proliferaciju T-ćelija. Ovaj mehanizam zahteva ćelijski kontakt i sekreciju citokina (161).

Poslednji rezultati pokazuju da je za dejstvo IFN- β potrebna posebna populacija B-ćelija koje imaju regulatornu ulogu i predstavljaju osnovni izvor IL-10 kod pacijenata (168). Upravo je porast IL-10 je smatran osnovnim dejstvom IFN- β (169). IFN- β takođe povećava ekspresiju kostimulatornog molekula CD40 na B-ćelijama obolelih od MS (161). Ova studija pokazuje i da nakon *in vitro* IFN- β tretmana postoji inhibicija IL-1 i IL-23 i indukcija sekrecije IL-12 i IL-27 od strane B-limfocita. Ove promene u produkciji citokina B-ćelija blokiraju Th17 diferencijaciju što se ogleda u supresiji sekrecije IL-17A. IFN- β smanjuje i antigen-prezentujući potencijal B-limfocita snižavanjem ekspresije MHC molekula II klase i i broja CD80⁺ B-limfocita (170, 171).

1.5.1.2.3 Dejstvo na dendritske ćelije

Kao što je slučaj sa B-limfocitima, IFN- β snižava sposobnost za prezentaciju T-limfocitima i kod dendritskih ćelija (170). Isti efekat ima i na monocite i mikrogliju u CNS (170, 172). Dodatno, smanjuje broj dendritskih ćelija u perifernoj krvi (173), kao i njihovu produkciju proinflammatoryh citokina (172).

1.5.1.2.4 Dejstvo na KMB

IFN- β može da smanji migraciju leukocita kroz KMB uticajem na adhezivne molekule, integrine, aktivnost MMP i proinflammatoryh citokine (174). Naime, IFN- β povećava koncentraciju solubilnog vaskularnog adhezionog molekula 1 (engl. vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM), što koreliše sa smanjenjem broja lezija u CNS. Pretpostavka je da sVCAM smanjuje adheziju leukocita jer se vezuje za VLA-4 integrin i kompetitorno inhibira vezivanje VLA-4 za VCAM, neophodnu interakciju za dijapedezu (175), što zadržava leukocite van CNS. Prolazak kroz KMB T-limfociti i makrofagi olakšavaju sekrecijom endopeptidaza MMP. IFN- β smanjuje broj leukocita kojisekretuju MMP-9 i povećava broj leukocita koji ekspimiraju tivni inhibitor MMP-9, TIMP-1 (164).

1.5.1.2.5 Neuroprotektivno dejstvo

IFN- β može da pomogne u reparaciji oštećenja CNS. Pokazano je da poboljšava preživljavanje neurona *in vitro* i da podstiče produkciju faktora rasta nerava od strane moždanih endotelnih ćelija i mikroglije *in vitro* (176, 177). Pored toga, terapija kod pacijenata koji klinički dobro odgovaraju povećava sekreciju neurotrofičkog faktora moždanog porekla (*engl.* brain-derived neurotrophic factor, BDNF) koja bi mogla da dovede do reparacije aksona (178).

1.5.1.3 Terapijski odgovor na IFN- β

Nažalost, kod 30-50% bolesnika sa RRMS lečenih sa IFN- β ne dolazi do ispoljavanja očekivanog povoljnog terapijskog efekta (140), a ima autora koji tvrde da ova terapija kod nekih pacijenata ima štetno dejstvo (179). Imajući u ovo u vidu, kao i visoku cenu terapije, jasno je zašto je za kliničku primenu imperativ definisanje pacijenata za koje bi ova terapija bila optimalna.

Jedan od razloga za loš odgovor na terapiju može da bude smanjenje ili izostanak biološke aktivnosti IFN- β . Najčešći razlog za to je nastanak neutrališućih antitela za IFN- β (*engl.* neutralizing antibodies, Nabs). Međutim, samo prisustvo Nabs ne znači obavezno i neutralizaciju IFN- β , tj. smanjenje njegove aktivnosti. Pokazano je da Nabs niskog afiniteta mogu da produže polужivot IFN- β (180, 181). Smatra se da zapravo visoki titrovi Nabs korelišu sa neutralizacionom aktivnošću, a predlaže se da se kod pacijenata sa srednjim i niskim titrovima ispita biološka aktivnost IFN- β . Dalje, rezultati ukazuju da postojanje visokih titrova antitela koja vezuju IFN- β (*engl.* binding antibodies, Babs) koreliše sa nastankom Nabs (182). Praktični značaj vezujućih antitela se ogleda u tome što ih je lakše detektovati (enzimski imunotest nasuprot ogledima neutralizacije, koji zahtevaju primenu bioloških sistema, sa ili bez korišćenja virusa u testu). Zato se predlaže ELISA kao metod skrininga, gde bi se kod osoba sa visokim titrom BAbs izvodio neutralizacioni esej (144). Ipak, ovim algoritmom bi se loše dijagnostikovao jedan broj pacijenata čiji bi neutralizacioni test bio pozitivan, uprkos činjenici da u nemaju Babs, a samim tim ni Nabs jer za neutralizaciju IFN- β u odsustvu Nabs može biti odgovorno prisustvo solubilnog receptora za tip I IFN (sIFNAR) (183).

S druge strane prisustvo Nabs u jednom trenutku nije nalaz koji definitivno perzistira. Nabs mogu da iščeznu, i to češće kod primene IFN- β -1b, kod čak 50% Nabs-pozitivnih pacijenata, pri čemu se i dejstvo leka ponovo uspostavlja (184). Nađeno je da je reverzija u vezi s titrom Nabs: češća je kod osoba sa niskom koncentracijom, dok se kod osoba sa visokim titrom retko dešava (185).

Bilo koji razlog izostatnka dejstva IFN- β (Nabs, sIFNAR, ili dosad neutvrđeni ali teorijski mogući genski defekti samog receptora ili molekula u sprovođenju signala sa IFNAR) dovešće do smanjenja ekspresije gena koje indukuje IFN- β . To su geni koje IFN tipa I prirodno indukuju u virusnim infekcijama, kao što je miksovirusom-indukovani protein

1 (*engl.* mixovirus-induced protein 1, MX1) (186) i 2'-5'-oligoadenilat-sintetaza 2 (OAS2) (180). Merenje ekspresije MX1 se do sad pokazalo najpouzdanijim markerom biološke raspoloživosti IFN- β (187).

Međutim, neophodno je precizno i uniformno definisati šta predstavlja dobar, odnosno loš terapijski odgovor. To je teško postići, jer prirodan tok MS može da dovede do iznenadnog pogoršanja ili potpune rezolucije simptoma i znakova, nezavisno od terapije. Zato još uvek ne postoji konsenzus o kriterijumima uspeha, tj. neuspeha IFN- β terapije (188). Kao mere uspešnosti odgovora na IFN- β terapiju se koriste klinički i radiološki parametri: incidencija relapsa, progresija onesposobljenosti i prisustvo lezija na pregledu nuklearne magnetne rezonance (NMR). Ove mere se koriste pojedinačno ili u kombinaciji. Progresija onesposobljenosti u većini studija se izražava kao porast EDSS od 1 stepena, ukoliko je inicijalni skor manji od 5,5 i povećanje od 0,5 za inicijalni skor veći od 5,5, potvrđen nakon 6 meseci, da bi se eliminisao trenutni uticaj relapsa. U dugoročnim studijama (15-16 godina) korišćena je ukupna primena EDSS i period doseganja EDSS 6. Druge studije za definisanje pacijenata koji ne odgovaraju na terapiju koriste promenu EDSS i/ili prisustvo relapsa, zatim porast stope relapsa u odnosu na period pre uvođenja terapije. Pojava novih lezija na NMR uvedena je kao kriterijum i zasnovana je na stanovištu da je znak progresije bolesti. Na kraju, čak se i potreba za promenom terapije smatra kriterijumom neuspeha. U zavisnosti od strogosti kriterijuma, varira i procenat pacijenata koji ne odgovaraju na terapiju (188). Zbog heterogenosti definicije pacijenata koji odgovaraju na terapiju (OD) i koji ne odgovaraju (NOD) teško je porediti rezultate različitih istraživačkih grupa u potrazi za biomarkerima odgovora na terapiju.

1.5.1.4 Biomarkeri odgovora na terapiju interferonom- β

Pouzdana biomarkeri odgovora na terapiju IFN- β još uvek ne postoje. Navode se mnoge poteškoće u potrazi za njima: MS ima vrlo varijabilan klinički tok, heterogena je u smislu imunopatogeneze, dijagnoza se postavlja per exclusionem (ne postoji „zlatni standard“), karakteriše se periodom klinički nemanifestne aktivnosti bolesti (189).

Pre svega je ispitivan potencijal kliničkih parametara pre uvođenja terapije kao prediktora aktivnosti i toka bolesti (190). Saznanja o imunopatogenetskim mehanizmima u MS su usmerila potragu za biomarkerima aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju ka parametrima imunskog sistema kao mogućim prediktorima relapsa,

odnosno progresije bolesti. Među njima su citokini i hemokini, mereni u krvi ili likvoru, površinski molekuli na ćelijama imunskog sistema, adhezivni molekuli, anti-mijelinska antitela, molekuli koji učestvuju u reparaciji tkiva i regeneraciji neurona, i drugi molekuli, kao što je MX1, sistematično prikazani u preglednom radu (189).

1.5.2 Glukokortikoidi u terapiji MS

Glukokortikoidi se u MS primenjuju u terapiji relapsa u vrlo visokim dozama, najčešće i. v. metilprednizolon (MP) 1g dnevno u trajanju 3-5 dana. Pri ispitivanju parametara imunskog sistema treba imati u vidu i to da terapija relapsa može da ih izmeni. Opisano je da trodnevni puls metilprednizolona snižava produkciju proinflamatornih citokina *in vitro*, ali da povećava broj T- i B-limfocita, monocita i neutrofila u perifernoj krvi (191). Drugi rezultati takođe pokazuju pad proinflamatornih citokina, ali je zapaženo sniženje broja CD4⁺ T-limfocita nakon trodnevnog pulsa (192, 193). Obe studije ukazuju da su efekti MP kratkoročni. Nakon pojedinačne dnevne doze uočena je indukcija apoptoze, dominantno CD4⁺ T ćelija (194). Noviji radovi pokazuju prolazno povećanje ekspresije FoxP3 i IL-10 tokom davanja MP u relapsu (195). Izgleda da MP tretman relapsa nema uticaj na pojavu novih relapsa i progresiju bolesti (196). Iako MP ima imunomodulatorno dejstvo, nije pokazano da kratkotrajna terapija relapsa dugoročno utiče na ispitivane parametre imunskog sistema.

Imajući u vidu da i do polovine pacijenata nema korist od IFN- β terapije i da je cena leka visoka, postoji potreba da se pronađu mogući biomarkeri koji bi predvideli uspešnost terapije sa IFN- β . Ova doktorska disertacija analizira uticaj IFN- β terapije na gensku ekspresiju pre svega citokina Th1 i Th17 osovine, za koje literatura ukazuje da imaju prominentnu ulogu u imunopatogenezi MS, kao i njihovih receptora i transkripcionih faktora koji ih kontrolišu kod pacijenata sa RRMS. Isto tako, ispituje se potencijal obrasca genske ekspresije ispitivanih molekula kao prediktora odgovora na terapiju, tj. pojave relapsa tokom tri godine praćenja. Pri tom je primenjen individualizvan pristup pacijentu korišćenjem statističkih metoda koje uzimaju u obzir pojavu relapsa kod pojedinog pacijenta u zavisnosti od njegovog vremenskog obrasca genske ekspresije. Do sada nije sprovedena studija koja bi analizirala gensku ekspresiju ključnih citokina, njihovih receptora i transkripcionih faktora koji ih kontrolišu tokom dužeg vremenskog perioda. Saznanja o modulisanju citokinskog odgovora tokom IFN- β terapije bi mogla da doprinesu boljoj predikciji odgovora na ovaj lek.

2 Ciljevi

Odrediti ekspresiju MX1, OAS2 i CD3 ϵ kod pacijenata sa RRMS pre započinjanja terapije sa IFN- β i nakon 6, 12, 24 i 36 meseci kako bi se utvrdilo da terapija deluje na ciljne ćelije tretiranih pacijenata.

Utvrditi nivoe ekspresije gena za proinflamatorne (IL-12/23p40, IL-12p35, IL-23p19, Tbet, IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R, RoR γ t, IFN- γ , IL-17A, IL-17F, GM-CSF i TNF) i antiinflamatorne (FoxP3, IL-10, IFN- β) molekule kod bolesnika sa RRMS pre početka i posle 6, 12, 24 i 36 meseci terapije sa IFN- β .

Utvrditi kakav je odnos između nivoa ekspresije ispitivanih gena tokom praćenja pacijenata i njihovih demografskih parametara i kliničkih pokazatelja težine bolesti.

Utvrditi da li bi se ekspresija nekih od ispitivanih proinflamatornih i antiinflamatornih molekula pre započinjanja i tokom terapije sa IFN- β mogla koristiti kao biomarker odgovora na terapiju.

3 Materijal i metode

Kohortna studija je sprovedena na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije, a analize genske ekspresije i enzimski imunotestovi su urađeni u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u periodu od juna 2009. do juna 2012. godine. Svaki od ispitanika je bio detaljno obavešten o cilju studije i potpisao dobrovoljan pristanak za učestvovanje u njoj. Studija je izvedena u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije (revidirana verzija iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Odluka br. 26/X-10).

3.1 Ispitanici

Grupu pacijenata su činili 45 uzastopnih bolesnika obolelih od RRMS uzrasta iznad 18. godina, sa potvrđenom RRMS prema McDonald-ovim kriterijumima (2) koji su počinjali terapiju Betaferonom® (IFN- β 1b). Od 45 pacijenata 37 je uključeno u analizu rezultata, 27 žena (73,0%) i 10 muškaraca (27,0%) prosečne starosti $36,1 \pm 7,8$ godina i EDSS skorom u opsegu 0 do 3,5. Određivan je i MSSS na osnovu EDSS skora i trajanja bolesti, a prema tabeli u radu Roxburgh i sar. (15).

Kriterijumi za uključivanje su podrazumevali da ispitanici nikada pre početka ispitivanja nisu dobijali imunomodulatornu ili imunosupresivnu terapiju. Iz analize rezultata je isključeno 8 pacijenata. Četiri pacijenta su razvila SPMS, pa im je promenjen protokol lečenja, prema propisima RFZO. Jedna pacijentkinja je isključena zbog trudnoće tokom perioda praćenja, jedan pacijent je prekinuo terapiju iz ličnih razloga, jedan je počeo da koristi IFN- β 1a, i jedan pacijent je izuzet usled nedovoljne komplijanse prema protokolu studije (propuštena 4 termina za uzorkovanje). Kada su u pitanju nedostajući podaci, od 37 uključenih pacijenata jedan uzorak nije dobijen u terminu 6 meseci i od 4 pacijenta u terminu 12 meseci.

Pacijenti su imali kontrole neurologa svaka 3 meseca. U međuvremenu, ukoliko je pacijent sumnjao na relaps, javljao bi se neurologu telefonom. Relapsi su lečeni intravenskim metilprednizolonom, 1g dnevno, tokom 3-5 dana.

Odgovor na terapiju je procenjen nakon tri godine tretmana. Pacijenti su svrstavani u grupu koja odgovara na terapiju (OD) ukoliko uopšte nisu imali relapse ni povećanje EDSS skora ≥ 1 koje se održava tokom ≥ 6 meseci tokom perioda praćenja. U protivnom, smatrano je da pacijenti ne odgovaraju na terapiju (NOD).

3.2 Uzimanje uzoraka krvi

Uzorci pune krvi (10 ml) su uzimani venepunkcijom na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije. Krv je uzimana u Vacutainer® epruvete (Becton Dickinson, New York, SAD) sa EDTA kao antikoagulansom i transportovana do Laboratorije za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u okviru 2 sata nakon uzimanja, gde su dalje obrađivani. Uzorci su uzeti na dan pre davanja prve injekcije IFN- β , zatim 6, 12, 24 i 36 meseci nakon započinjanja terapije IFN- β 1b u periodu između 8-10 h, što je bilo približno 12 h nakon poslednje injekcije IFN- β .

3.3 Određivanje genske ekspresije

3.3.1 Izolacija plazme i mononuklearnih ćelija periferne krvi

Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi vršena je centrifugiranjem na gustinskom gradijentu Ficoll (Amersham Biosciences). Na 3 ml gustinskog gradijenta u staklenoj epruveti nanošena je krv tako da ne dođe do mešanja. Gradijent sa krvlju je centrifugiran na 800g 20min na 21°C uz minimalno ubrzanje i bez kočnice. Izdvajane su mononuklearne ćelije periferne krvi (MNČPK) i plazma. Plazma (2 mL) je potom centrifugirana 10 min na 10000 g, da bi se izdvojili i zaostali trombociti. Potom su 3 alikvota plazme od po 500 μ L čuvana na -20°C do dalje analize. MNČPK su zatim prane u 10 mL RPMI 1640 i L-glutaminom (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austrija) sa 2% fetalnog goveđeg seruma (PAA Laboratories GmbH), jedanput na 700g 5 min, pa potom 2 puta na 500g, 5 min. Zatim su MNČPK resuspendovane u 1 mL RPMI 1640 i prebrojane. Nakon brojanja, odvajano je 5 miliona ćelija za izolaciju RNK.

3.3.2 Izolacija RNK

Ćelije su centrifugirane 3 min na 2000g u Eppendorf Safe Lock® epruvetama od 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Nakon odlivanja supernatanta, ćelijski pelet je kratko vorteksiran u maloj količini zaostalog medijuma pre dodavanja reagensa za izolaciju RNK. Ukupna RNK je izolovana iz MNČPK korišćenjem mi-Total RNA Isolation Kit, (Metabion, Steinkirchen, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, dodavano je 500 μ L reagensa za izolaciju RNK i nakon kratkog vorteksiranja sipano 100 μ L hloroforma (Zorka, Šabac, Srbija). Uzorci su potom vorteksirani 10 sec i inkubirani na ledu 10 min. Zatim su centrifugirani na 12000 g 15 min na 4°C. Uzimano je oko 300 μ L vodene faze sa RNK u nove epruvete od 1,5 mL i dodavana ista zapremina izopropanola

(Zorka). Epruvete su žustro invertovane 10 puta i inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja na 12000 g 15 min na 4°C pipetom je uzimana tečnost, a na talog dodavan 1 mL 75% etanola (Zorka). RNK peleti su vorteksirani kako bi se postiglo da talog "pliva" u etanolu i onda centrifugirani na 7500 g 5 min na 4°C. Postupak pranja u etanolu je ponavljan još jednom. Uzorci su zatim čuvani u 1 mL etanola 75% etanola na -20°C do reverzne transkripcije.

Pre same reverzne transkripcije, uzorci čuvani u etanolu su centrifugirani 5 min na 7500 g na 4°C. Zatim je pipetom pažljivo uziman 75% etanol i talog RNK ostavljan da se suši na sobnoj temperaturi (dok talog ne postane staklastog izgleda). Po potrebi, kratko centrifugiranje je ponavljano da bi se uzeo sav etanol. Zatim su uzorci resuspendovani u vodi koja nije sadržala nukleaze (Fermentas, Vilnius, Litvanija) u volumenu u zavisnosti od veličine RNK taloga. Posle izolacije RNK vršeno je određivanje čistoće i količine prečišćene RNK merenjem apsorbancije na 230, 260, 280 i 320 nm. Integritet izolovane RNK je proveravan elektroforezom na 1% gelu agaroze (Lonza Rockland, Inc., Rockland, ME, SAD).

3.3.3 Reverzna transkripcija

Za reverznu transkripciju korišćeno je približno 1 μ g RNK. Korišćena je reverzna transkriptaza Moloney mišjeg virusa leukemije (*engl.* Moloney murine leukemia virus, M-MuLV) sa heksamerima nasumične sekvence, dezoksinukleotid trifosfatima i inhibitorom RNKaze (Fermentas) prema uputstvu proizvođača u finalnoj zapremini od 20 μ L. Po uzorku je dodavano 1,5 μ L miksa koji je sadržao 1 μ L heksamera nasumične sekvence i 0,5 μ L 100 mM dezoksinukleotid-trifosfata. Uzorci su stavljeni u termoblok zagrejan na 70°C 10 min (Eppendorf). Zatim je, nakon držanja uzoraka 2 min na ledu, dodavan miks 4 μ L pufera i 0,5 μ L inhibitora RNKaze, i na kraju 1 μ L reverzne transkriptaze po uzorku tako što se nastavkom promeša cela reakciona smeša. Uzorci su vraćani u termoblok na temperaturi 25°C. Program reverzne transkripcije se sastojao od sledećih koraka: 70°C 10 min, 25°C 15 min, 42°C 1 h, 70°C 10 min, 95°C 3 min.

3.3.4 Detekcija i analiza genske ekspresije reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) u realnom vremenu (kvantitativni PCR, qPCR)

Za detekciju i analizu ekspresije gena za MX1, p40, p35, p19, Tbet, IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R, RoRyt, FoxP3, IFN- γ , IL-17A, IL-17F, GM-CSF, TNF, IL-10 i GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, referentni gen) koristišćenje TaqMan princip detekcije pomoću

smeša oligonukleotida dizajniranih pomoću Primer Express 2. 1 softvera (Applied Biosystems) i sintetisanih po porudžbini (Metabion, Invitrogen, Tabela 1a) i komercijalno dostupnih smeša oligonukleotida (PE, Applied Biosystems, Tabela 1b). Amplifikacija cDNK qPCR metodom vršenaje prema preporukama proizvođača testova, dok će oligonukletidi za detekciju ekspresije koji su sintetisani po porudžbini biti korišćeni u koncentracijama koje su optimizovane u prethodnim eksperimentima. Amplifikacija će se vršiti u duplikatu u Realplex² PCR mašini (Eppendorf) pomoću komercijalnog reagensa (Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, Fermentas) u finalnoj zapremini od 10 µl u optičkim pločama sa 96 mesta (PE, Applied Biosystems).

Tabela 1a. Sekvence, finalne koncentracije, obeleživači i pozicije prajmera i proba.

Oligonukleotid	Ciljna sekvenca prajmera/probe(5'-3')	Koncentracija (nM)	Obeleživač	Sekvenca i pozicija
IFN-γ				NM_000619
F	TGTAGCGGATAATGGAACCTTTTC	900		258
Taqman	CACTCTCCTCTTTCCAATTCTTCAAAATGCCTA	200	5'FAM-DNK-TAMRA3'	284
R	AATTTGGCTCTGCATTATTTTCTG	100		342
RORyt				NM_005060
F	AATGACCAGATTGTGCTTCTCAAAG	100		1147
Taqman	TCCTAACCAGCACCCTCCATTGCTCCT	100	5'FAM-DNK-TAMRA3'	1173
R	GGTTGTCAGCATTGTAGGCC	100		1228
T-bet				NM_013351
F	AGGATTCCGGGAGAACTTTGAG	900		1177
Taqman	CCATGTACACATCTGTTGACACCAGCATCC	200	5'FAM-DNK-TAMRA3'	1200
R	AATTGACAGTTGGGTCCAGGC	100		1257
GAPDH				NM_002046
F	CATCCATGACAACCTTTGGTATCG	300		564
Taqman	AAGGACTCATGACCACAGTCCATGCC	100	5'VIC-DNK-TAMRA3'	590
R	CCATCACGCCACAGTTTCC	300		671
GM-CSF				NM_000758. 3
F	GGCCCTTGACCATGATG	900		306
Taqman	CAGCACTGCCCTCCAACCCCG	100	5'FAM-DNK-TAMRA3'	339
R	TCTGGGTTGCACAGGAAGTTT	900		381
IFN-β				NM_002176. 2
F	ATTCATCTAGCACTGGCTGGAA	900		356
Taqman	CTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAG	300	5'FAM-DNK-TAMRA3'	383
R	TCCAGGACTGTCTTCAGATGGT	900		446
IL-12/23p40				NM_002187. 2
F	GATGCCGTTCAAGCTCAA	300		679
Taqman	CCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCA	100	5'FAM-DNK-TAMRA3'	713
R	AGTTCTTGGGTGGGTCAGGTT	100		763
IL-12p35				NM_000882. 3
F	CTCCAAAACCTGCTGAGGG	300		437
Taqman	CAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACTC	100	5'FAM-DNK-TAMRA3'	464
R	CAATCTCTTCAGAAGTGCAAGGG	100		525
IL-23p19				NM_016584. 2
F	TGTGGAGATGGCTGTGACCC	100		383
Taqman	CTCAGGGACAACAGTCAGTTCTGCTTGCA	100	5'FAM-DNK-TAMRA3'	410
R	TCATAAAAAATCAGACCCTGGTGG	100		468
IL-12Rβ2				NM_001559. 2
F	TTATAATCACGTGGCTGTTGATTAAAG	900		681
Taqman	ATAGATGCGTGCAAGAGAGGCGATGTGA	200	5'FAM-DNK-TAMRA3'	713
R	AAATTACATGGGAAGGCTTCACA	900		764

Tabela 1b. Kataloški brojevi komercijalnih eseja.

Gen	Applied Biosystems®Assay kataloški broj
IL-23R	Hs01001359_m1
IL-17A	Hs00174383_m1
IL-17F	Hs00369400_m1
FoxP3	Hs01085834_m1
OAS2	Hs00942643_m1
MX1	Hs00895608_m1
CD3ε	Hs01062241_m1

3.4 Određivanje koncentracije citokina u plazmi

Koncentracije GM-CSF, IL-17A i IL-17F u plazmi su određivane enzimskim imunotestom (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Korišćen je komercijalno dostupan set regenasa (eBioscience, San Diego, CA, SAD) prema uputstvu proizvođača i ploče za mikrotitraciju MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Danska). Protokol se sastojao iz sledećih faza: oblaganje ploče sa primarnim antitelom (100 µL/bazenčić, preko noći na 4°C), ispiranje (5 puta), blokiranje (200 µL/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 puta), inkubacija uzoraka (100 µl/bazenčić, 2 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 puta), inkubacija sa sekundarnim antitelom obeleženim biotinom (100 µl/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 puta), inkubacija sa avidin-enzimskim kompleksom sa peroksidazom rena kao enzimom (100 µl/bazenčić, 30 minuta na sobnoj temperaturi), ispiranje (7 puta), inkubacija sa supstratom (tetrametilbenzidin) (100 µl/bazenčić, do 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku), zaustavljanje reakcije sa jednomolarnom (1M) H₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Nemačka) i očitavanje apsorbance pomoću spektrofotometra (Tecan, Grodig, Austrija) korišćenjem filtra za 450 i 650 nm.

Svaki uzorak je rađen u duplikatu. Količina citokina (u pg/ml) određivana je korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbance za odgovarajući rekombinantni citokin (pripremljen od proizvođača odgovarajućeg kompleta za ELISA-u) koji je prethodno serijski razblažen. Kao negativna kontrola (0 pg/ml citokina)

korišćena je vrednost apsorbance pufera za razblaživanje. Kako prag za detekciju je uzeta najniža koncentracija standarda za koju je srednja apsorbance -2SD bila veća nego srednja apsorbance negativne kontrole +2SD. Prag za detekciju je bio: 7,8 pg/L za GM-CSF i 3,9 pg/L za IL-17A i IL-17F.

3.5 Statistička analiza

Normalnost podataka je ispitivana Kolmogorov-Smirnov-ljevim testom. Za ispitivanje postojanja statistički značajnih razlika u obrascu genske ekspresije i nivoa citokina u plazmi primenjena je ANOVA za ponovljena merenja, gde je postojanje razlike među grupama OD i NOD razmatrano samo ukoliko je interakcija grupa pacijenata \times vreme bila statistički značajna. Analogno tome je primenjena ANOVA za ponovljena merenja kada su pacijenti razvrstani po polu. Ukoliko je prekršena pretpostavka o sferičnosti podataka, primenjivana je Greenhouse-Geisser korekcija značajnosti ANOVA-e. Za utvrđivanje statistički značajne povezanosti primenjen je Pearson-ov odnosno Spearman-ov koeficijent korelacije, ukoliko su bili u pitanju neparametarski podaci. Da bi se prevazišao problem inflacije broja statistički značajnih povezanosti usled višestrukog testiranja primenjena je korekcija po Holm-u na originalno dobijene p-vrednosti. Na osnovu vremenske kinetike ekspresije iRNK je urađeno hijerarhijsko klasterisanje gena. Binarnom logističkom regresijom je ispitano da li bi vrednosti neke od varijabli pre otpočinjanja terapije mogle da predvide terapijski odgovor nakon tri godine praćenja. Potencijalni prediktori odgovora na terapiju tokom perioda praćenja su procenjivani primenom Cox-ovog regresionog modela, prilagođenom za korišćenje vremenski-zavisnih kovarijata, tj. Z-transformisane ΔC_t vrednosti i koncentracije proteina za sve pacijente kroz sve vremenske tačke (197). Kao vreme preživljavanja u regresionoj analizi su uzeti meseci kada su se javljali relapsi. Multivarijantna Cox-ova regresija je urađena na osnovu univarijantnih analiza, uzimajući u obzir kao potencijalno signifikantne prediktore varijable čiji je odnos rizika u univarijantnoj analizi imao $p < 0,1$. Cox-ova regresione analize i testiranje petpostavke o proporcionalnosti rizika su urađene u R programskom jeziku primenom funkcija `coxph` i `cox.zph` iz paketa „Survival“ (198). Procena normalnosti distribucije podataka, mere deskriptivne statistike, Man Withney U test, Hi-kvadrat test, Studentov t-test i ANOVA za ponovljena merenja su urađeni primenom IBM SPSS Statistics program (IBM, verzija 22. 0, Armonk, NY, SAD. U svim testovima vrednosti verovatnoće p manje od 0,05 smatrane su

značajnima, a manje od 0,01 visoko značajnim. Za pravljenje grafika su korišćeni IBM SPSS Statistics, R i GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, verzija 5, La Jolla, CA, SAD).

4 Rezultati

4.1 Klinički tok bolesti kod pacijenata na terapiji IFN- β

Prema zadatim kriterijumima terapijskog uspeha 14 (37,8%) pacijenata je pripadalo OD grupi nakon 36 meseci praćenja i 23 (62,2%) NOD grupi. Grupe OD i NOD se nisu razlikovale po demografskim i kliničkim parametrima na početku IFN- β terapije (Tabla 1). Nakon 3 godine, prosečan broj relapsa u grupi NOD je bio $1,8 \pm 1,3$ (sv \pm SD), u opsegu od 1 do 6. EDSS na kraju perioda praćenja je bio statistički značajno viši ($p < 0,05$) u NOD $2,7 \pm 0,9$ (1,5-5,5) nego u OD grupi $2,2 \pm 0,7$ (1,5-3,5).

Tabela 1. Demografski i klinički parametri pacijenata sa MS pre početka IFN- β 1b terapije.

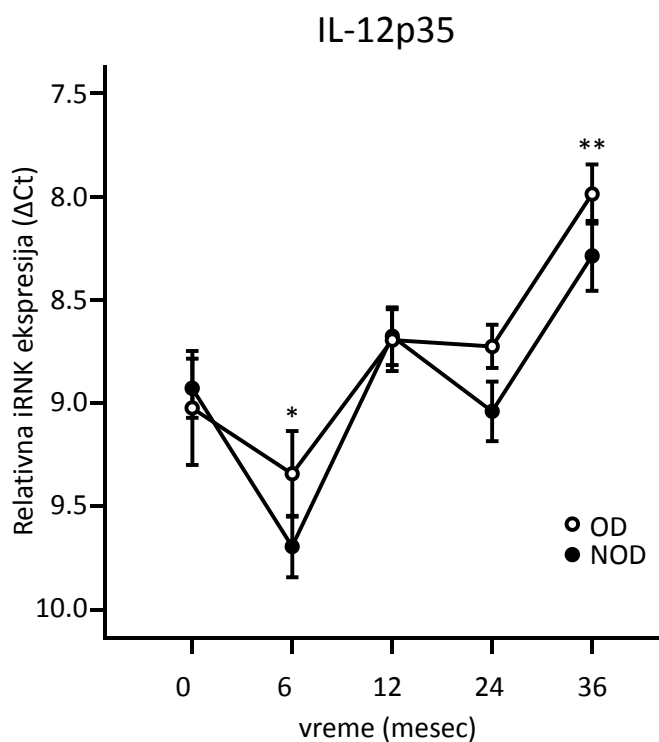
	Pacijenti koji odgovaraju na terapiju	Pacijenti koji ne odgovaraju na terapiju	ukupno	P
Pol				
muški	4	6	10	NZ
ženski	10	17	27	
Starost (godine)	$37,8 \pm 8,5$	$35,1 \pm 7,3$	$36,1 \pm 7,8$	NZ
Trajanje MS (godine)	$7,1 \pm 6,4$	$8,1 \pm 5,7$	$7,7 \pm 5,9$	NZ
Prosečan broj relapsa tokom dve godine pre početka terapije	$1,6 \pm 1,1$	$2,1 \pm 1,6$	$1,9 \pm 1,4$	NZ
EDSS skor	$2,1 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,8$	NZ
MSSS	$3,7 \pm 2,2$	$3,5 \pm 1,8$	$3,6 \pm 2,0$	NZ

Prikazana je srednja vrednost \pm standardna devijacija ili broj pacijenata. NZ, nije značajno ($p > 0,05$).

4.2 Uticaj terapije IFN- β na gensku ekspresiju

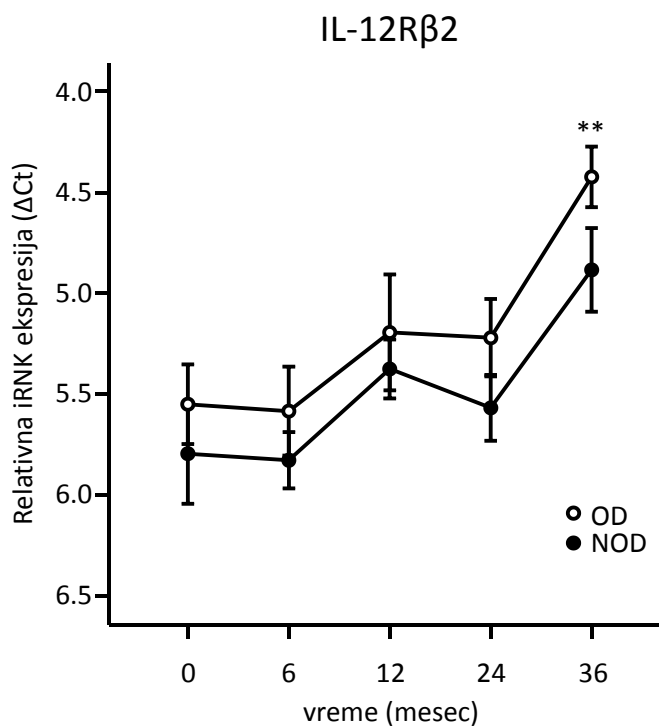
Genska ekspresija je merena u MNČPK za markere biološkog odgovora na IFN- β (MX1, OAS2), marker T-limfocita (CD3 ϵ), Th1/17- polarišuće citokine (IL-12/23p40, IL-12p35, IL-23p19), odgovarajuće subjedinice receptora za ove citokine (IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R), transkripcione faktore (T-bet, ROR γ t, FoxP3), efektorske citokine (IFN- γ , IL-17A, IL-17F, GM-CSF, TNF, IL-10) i endogeni IFN- β pre početka IFN- β terapije i nakon 6, 12, 24 i 36 meseci trajanja terapije. Tokom ovog perioda, svi mereni RNK nivoi su se statistički značajno promenili u odnosu na početne vrednosti.

U MNČPK ekspresija IL-12p35 subjedinice Th1-polarišućeg citokina je statistički značajno snižena nakon 6 meseci terapije IFN- β , da bi zatim rasla do kraja period praćenja. Vrednosti u na kraju perioda praćenja su bile statistički visoko značajno više u odnosu na početak praćenja (Slika 1). Nije bilo statistički značajnih razlika između OD i NOD grupe pacijenata.



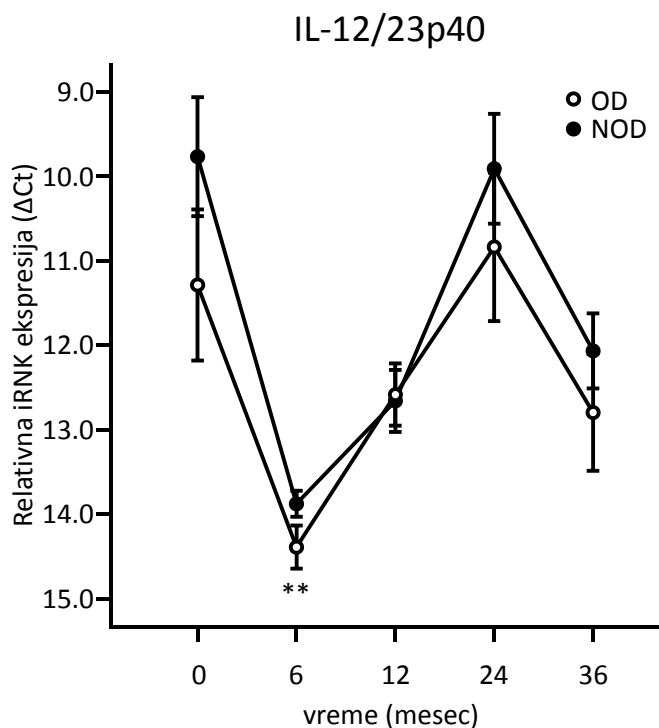
Slika 1. Relativna ekspresija IL-12p35 iRNK tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Slično ekspresiji IL-12p35, ekspresija subjedinice receptora za koju se vezuje, IL-12R β 2 je statistički značajno rasla do kraja period praćenja. Vrednosti na kraju perioda praćenja su bile statistički visoko značajno više u odnosu na početak praćenja (Slika 2). Nije bilo statistički značajnih razlika između OD i NOD grupe pacijenata.



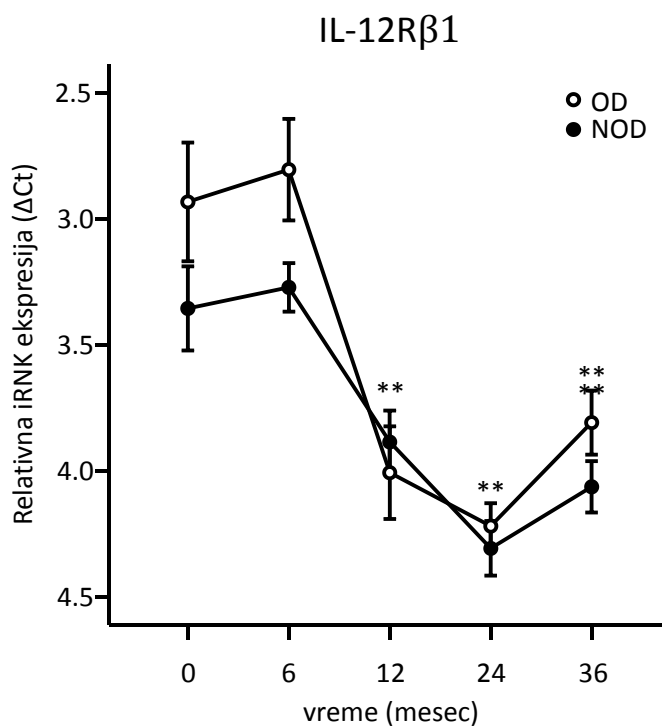
Slika 2. Relativna ekspresija IL-12R β 2 iRNA tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Ekspresija IL-12/23p40, zajedničke subjedinice za IL-12 i IL-23, je statistički visoko značajno snižena nakon 6 meseci IFN- β terapije u odnosu na početak praćenja (Slika 3). Nakon toga, ekspresija je rasla do trenutka 24 meseca terapije, a zatim opala u tački 36 meseci, međutim ove promene nisu dosegle nivo statističke značajnosti u poređenju sa inicijalnim vrednostima genske ekspresije. Nije bilo statistički značajnih razlika između OD i NOD grupe pacijenata.



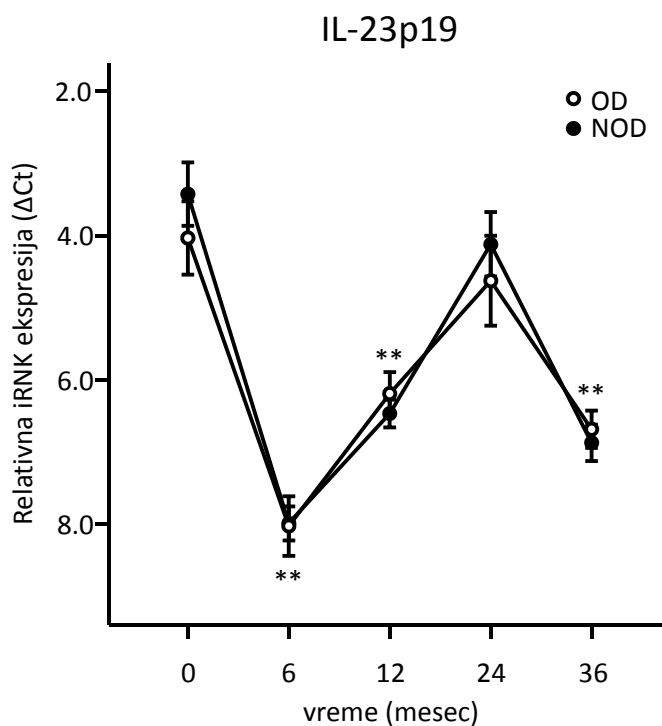
Slika 3. Relativna ekspresija IL-12/23p40 iRNA tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Ekspresija IL-12R β 1, subjedinice receptora za koju se vezuje IL-12/23p40, je statistički visoko značajno smanjena nakon 12 meseci terapije u odnosu na početne nivo. Do kraja perioda praćenja je nastavljen isti trend (Slika 4). Nije bilo statistički značajnih razlika između OD i NOD grupe pacijenata.



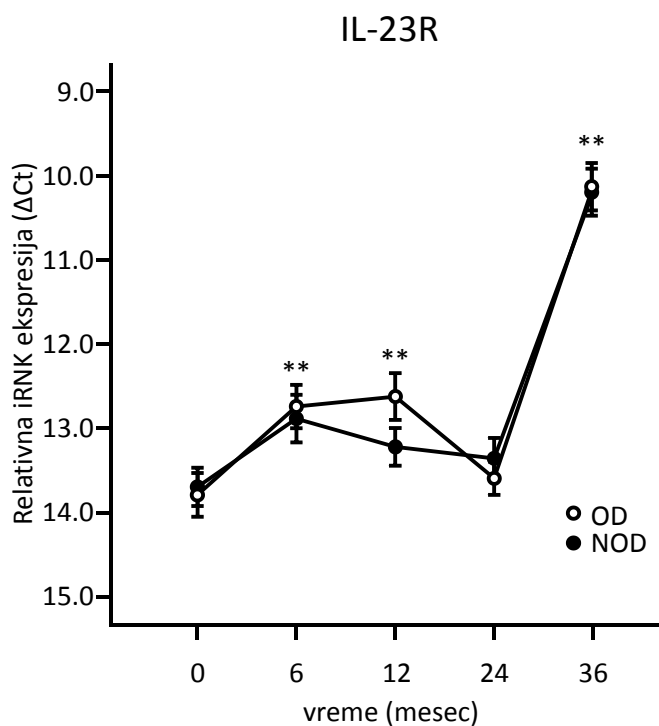
Slika 4. Relativna ekspresija IL-12R β 1 iRNK tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

IL-23-specifična subjedinica, p19, je nakon 6 i 12 meseci terapije IFN- β imala statistički visoko značajno nižu ekspresiju u odnosu na početak terapije (Slika 5). Nakon 24 meseca, vrednosti su bile uporedive sa inicijalnim, da bi u tački 36 meseci ponovo statistički visoko značajno opale u odnosu na početne. Grupe OD i NOD se nisu statistički značajno razlikovale.



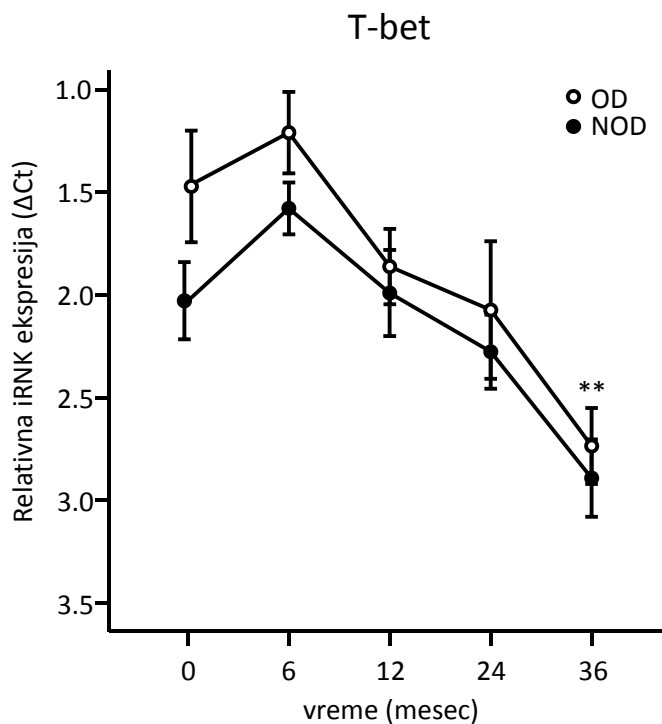
Slika 5. Relativna ekspresija IL-23p19 iRNA tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Receptorska subjedinica koja odgovara p19, IL-23R, je tokom perioda praćenja statistički visoko značajno rasla, sa izuzetkom termina 24 meseca, kada su iRNA nivoi bili slični onima pre otpočinjanja terapije (Slika 6). Maksimalne vrednosti su detektovane na kraju perioda praćenja. Grupe OD i NOD se nisu statistički značajno razlikovale.



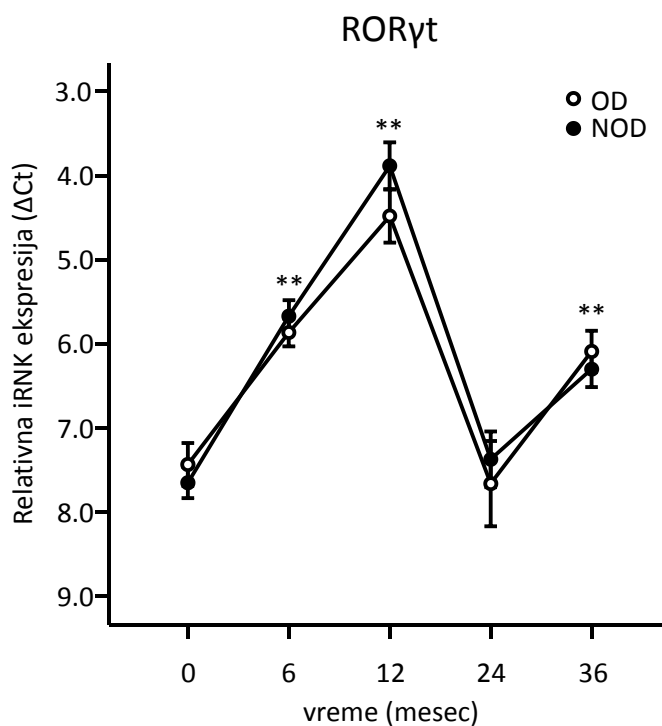
Slika 6. Relativna ekspresija IL-23R iRNA tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Ekspresija transkripcionog faktora Th1 subpopulacije T-bet je opadala tokom perioda praćenja, a ovaj pad je bio statistički visoko značajan u tački 36 meseci (Slika 7). Nije bilo statistički značajne razlike između dve kliničke grpe pacijenata, OD i NOD.



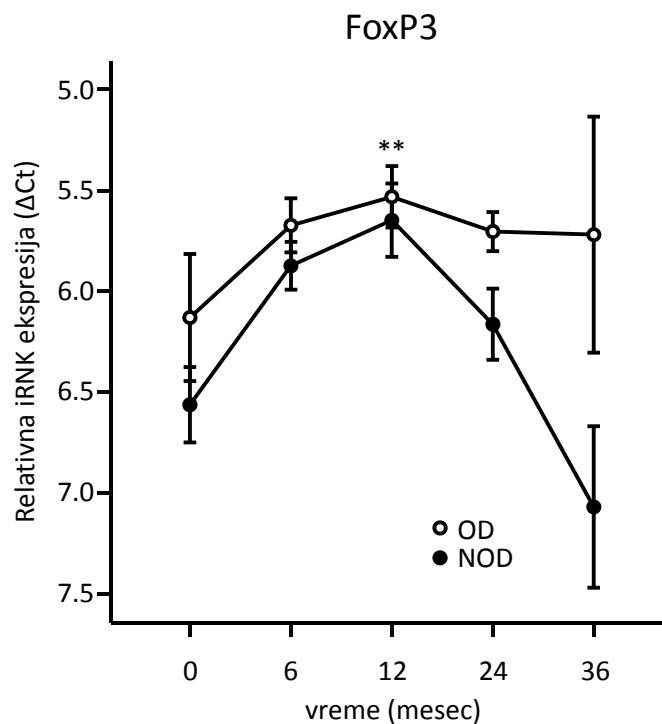
Slika 7. Relativna ekspresija T-bet iRNK tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Relativna ekspresija iRNK transkripcionog faktora ROR γ t, pod čijom kontrolom se održava Th17 populacija, je statistički visoko značajno rasla tokom prvih 12 meseci terapije IFN- β (Slika 8). Nakon 24 meseca je pala na vrednosti slične početim, a zatim opet porasla, manje nego u tački 12 meseci, ali opet statistički visoko značajno. Isti trend je postojao i kod OD i NOD grupe.



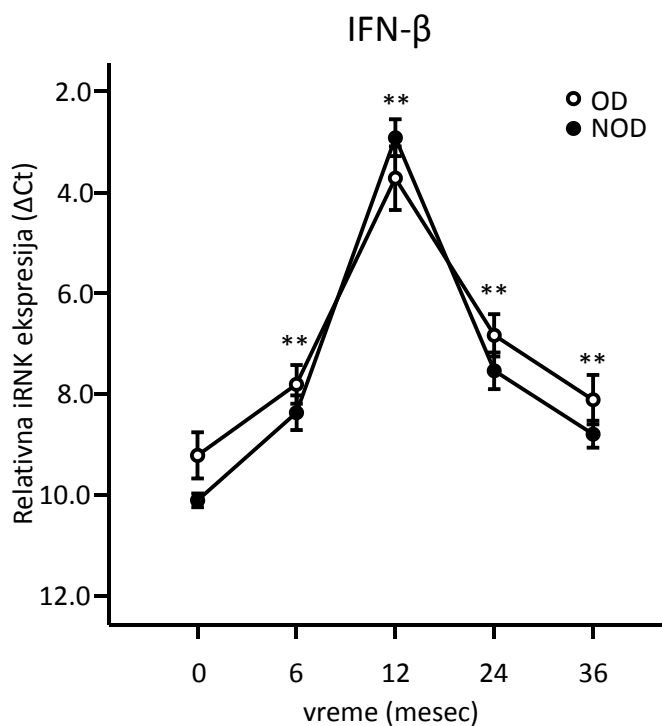
Slika 8. Relativna ekspresija RORyt iRNA tokom tri godine terapije IFN-β1b. Prikzane su srednje vrednosti ±SEM. **p<0,01, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Relativna ekspresija FoxP3, transkripcionog faktora koji karakteriše T-ćelije sa regulatornim kapacitetom, je pod dejstvom IFN-β rasla, kod obe grupe pacijenata, što je bilo statistički visoko značajno u trenutku 12 meseci od početka terapije (Slika 9). Zatim su vrednosti snižene do vrednosti sličnih početnim, ali se zapaža da je pad kod grupe sa nepovoljnim odgovorom na IFN-β terapiju bio prominentniji, iako bez statistički značajne razlike u odnosu na OD.



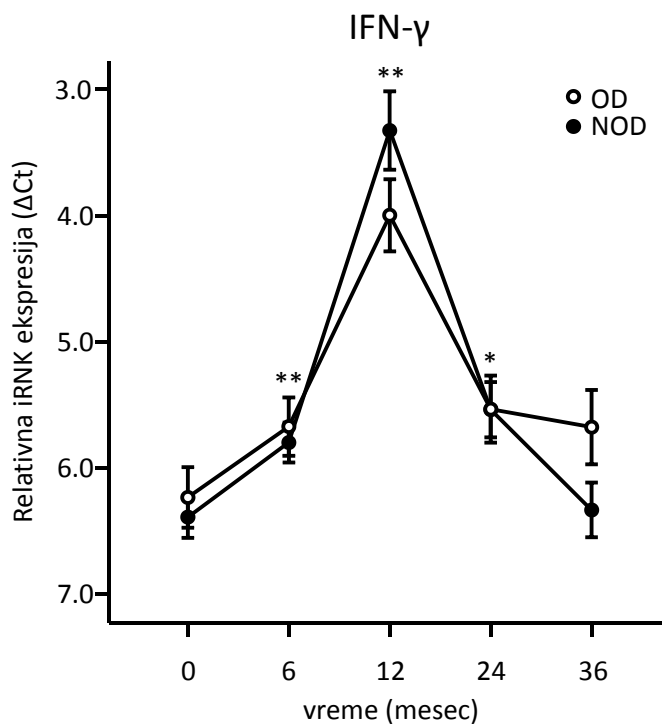
Slika 9. Relativna ekspresija FoxP3 iRNK tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Egzogeni IFN- β je uticao i na nivoe iRNK za endogeni IFN- β : nakon statistički visoko značajnog porasta na 6 meseci praćenja, ekspresija doseže pik u tački 12 meseci, a zatim pada, ali se održava statistički visoko značajno viši nivo u odnosu na vrednosti pre početka lečenja (Slika 10). Slične vrednosti su detektovane u obe grupe pacijenata, OD i NOD.



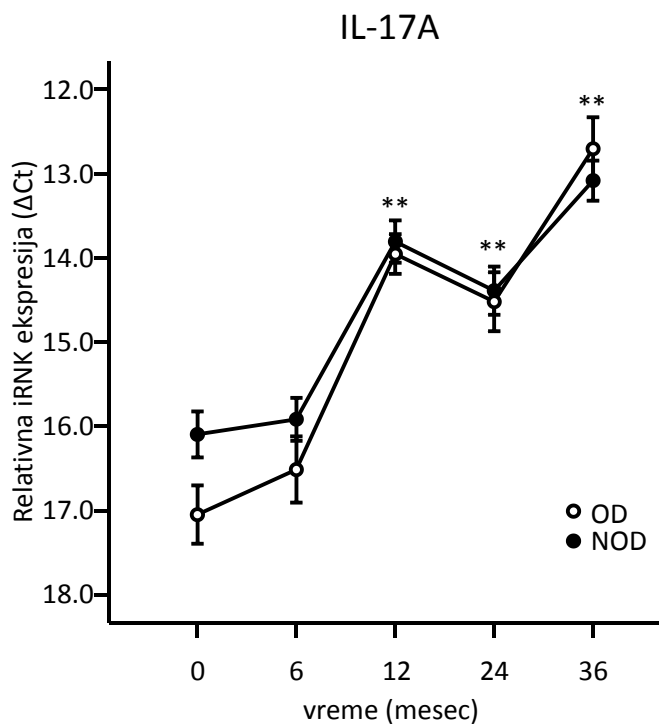
Slika 10. Relativna ekspresija IFN-β iRNA tokom tri godine terapije IFN-β1b. Prikzane su srednje vrednosti ±SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Zanimljivo je da je relativna ekspresija IFN γ , IFN tip II, u potpunosti korelisala sa ekspresijom endogenog IFN-β (Slika 11), sa pikom ekspresije na 12 meseci. Vrednosti nakon 24 meseca terapije su bile statistički značajno više, a nakon 36 meseci uporedive sa početnim. Slične vrednosti su detektovane u obe grupe pacijenata, OD i NOD.



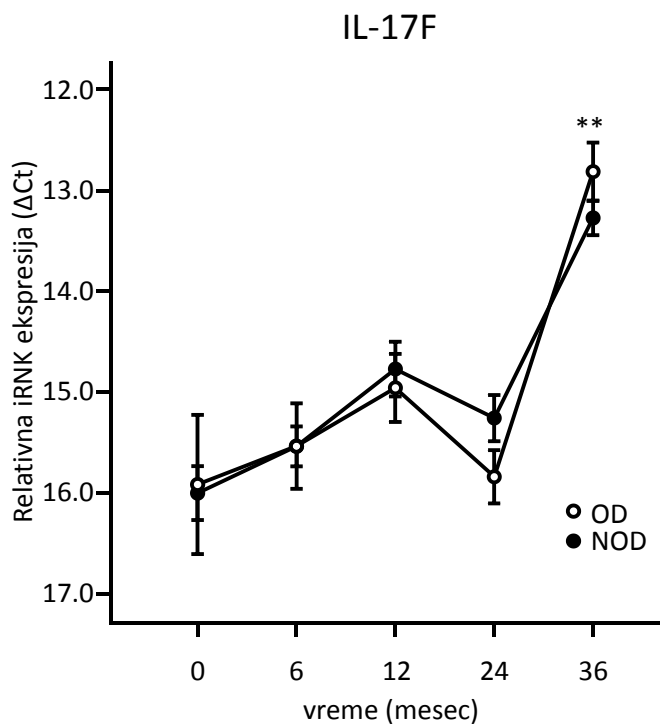
Slika 11. Relativna ekspresija IFN- γ iRNA tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

IL-17A iRNA nivoi su rasli u odnosu na inicijalne, što je bilo statistički visoko značajno od 12 meseci do kraja perioda praćenja (Slika 12). Nije uočena statistički značajna razlika dve grupe pacijenata, OD i NOD.



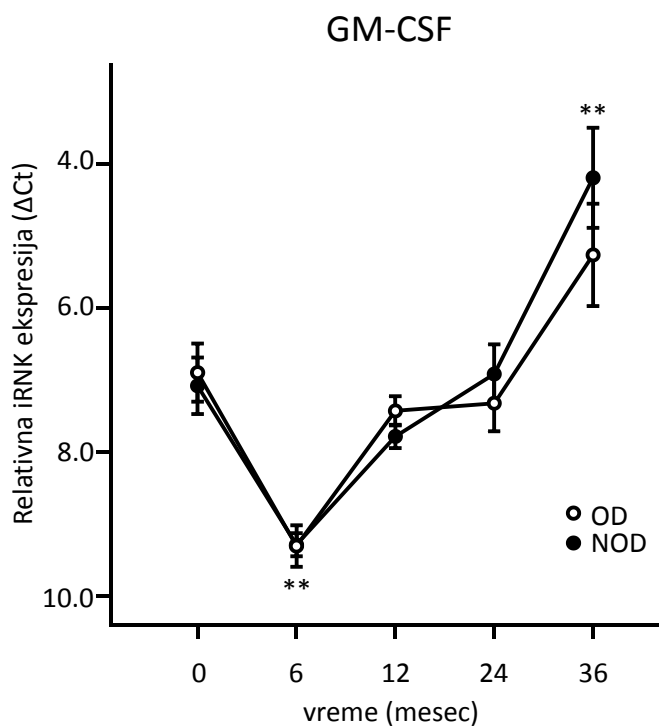
Slika 12. Relativna ekspresija IL-17A iRNA tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Relativna ekspresija IL-17F je nije značajno menjala tokom dve godine davanja IFN- β , da bi se na kraju perioda praćenja uočio statistički visoko značajan porast (Slika 13). Sličan obrazac je zapažen kod OD i NOD grupe.



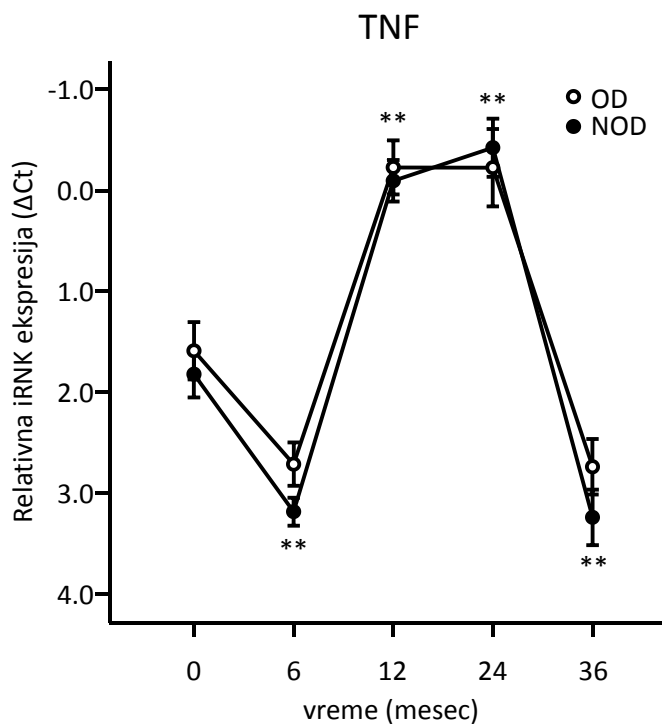
Slika 13. Relativna ekspresija IL-17F iRNA tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

GM-CSF je pod dejstvom IFN- β terapije statistički visoko značajno opao nakon 6 meseci, ali se nakon toga ekspresija vraća na nivoe slične početnim, nastavljajući da raste, što je bilo i statistički visoko značajno nakon 36 meseci (Slika 14). Pri tom nije bilo statistički značajne razlike između OD i NOD pacijenata.



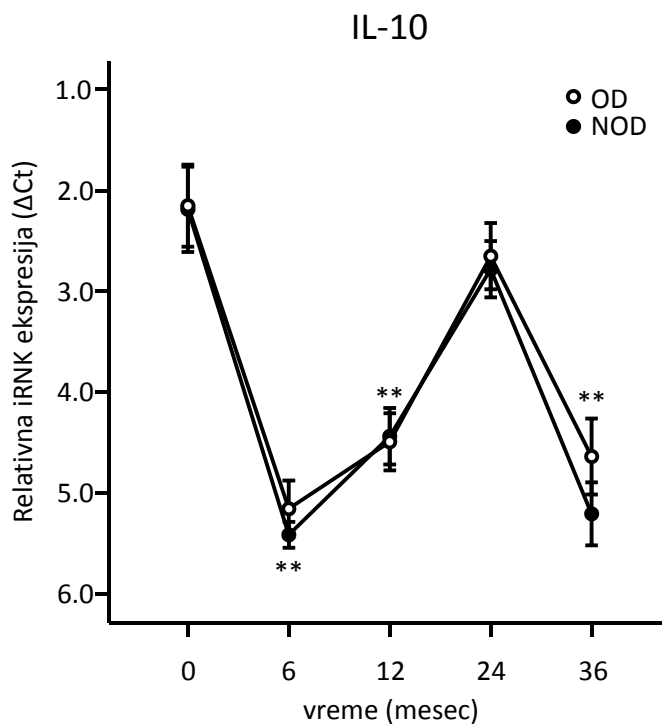
Slika 14. Relativna ekspresija GM-CSF iRNK tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Relativna ekspresija TNF je snižena statistički visoko značajno u terminu 6 meseci (Slika 15). Zatim je porasla statistički visoko značajno u terminima 12 i 24 meseca, da bi opet pala niže od početnih vrednosti, što je akode bilo statistički visoko značajno. Obrazac ekspresije TNF iRNK je bio sličan kod OD i NOD grupe.



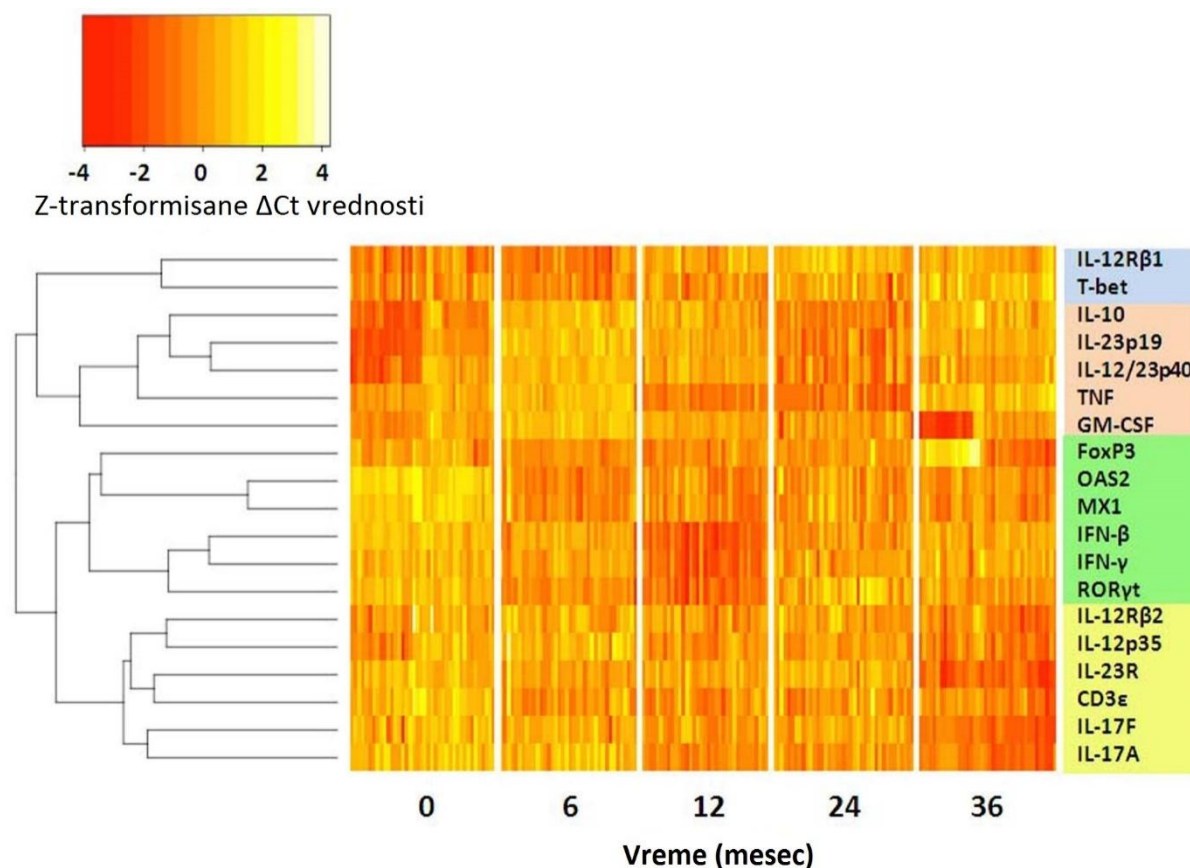
Slika 15. Relativna ekspresija TNF iRNK tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Nivo iRNK za IL-10 je bio statistički visoko značajno niži nakon 6 i 12 meseci nego na početku praćenja, sa trendom vraćanja na početne vrednosti nakon 24 meseca. U terminu 36 meseci nivo ponovo opada statistički visoko značajno u odnosu na incijalni.



Slika 16. Relativna ekspresija IL-10 iRNK tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Uočen je sličan obrazac promene tokom vremena za neke od gena, a da bi se to egzaktno ispitalo, izvršeno je hijerarhijsko klasterisanje vrednosti iRNK nivoa. Kao rezultat, geni su grupisani u 4 klastera, kao što je prikazano (Slika 17).



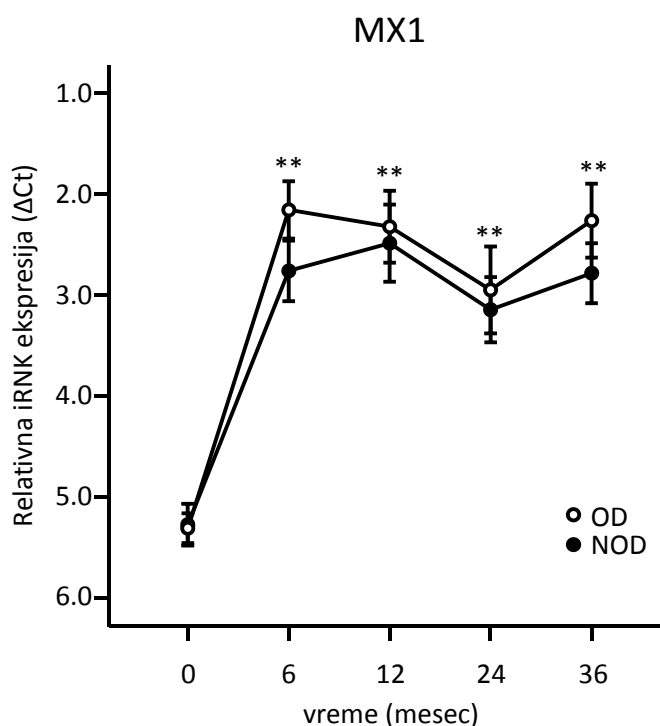
Slika 17. Hijerarhijsko klasterisanje gena na osnovu vremenske kinetike genske ekspresije. Klasteri gena su označeni bojom. Gradijentom su prikazani individualni nivoi relativne ekspresije iRNK, pri čemu je prethodno izvršena Z-transformacija ΔC_t vrednosti, i to za sve pacijente kroz sve vremenske tačke.

T-bet i IL-12R β 1 su imali najvišu ekspresiju pre otpočinjanja terapije (0m) koja se smanjivala tokom 3 godine praćenja. IL-10, IL-23p19, IL-12/23p40 i TNF su pokazali bifaznu ekspresiju, sa padom RNK nivoa u tački 6 meseci i ponovnim pikom na 24 meseca. GM-CSF je pripao ovoj grupi, ali je pik ekspresije imao na 36 meseci. U trećem klasteru, IFN- β , IFN- γ i ROR γ t su imali pik ekspresije na 12 meseci, opadajući na vrednosti uporedive sa početnim na kraju perioda praćenja. FoxP3 ekspresija je imala sličan obrazac, ali promene nisu bile izražene kao kod ostalih gena. MX1 i OAS2 iRNK nivoi su tokom terapije su u tački 6 meseci bili značajno viši u odnosu na početak, što se nastavilo tokom celog perioda praćenja. U četvrtom klasteru su bili geni čiji su iRNK nivoi rasli tokom perioda praćenja i najvišu ekspresiju imali na kraju (IL-12R β 2, IL-12p35, IL-23R, CD3 ϵ , IL-17A i IL-17F).

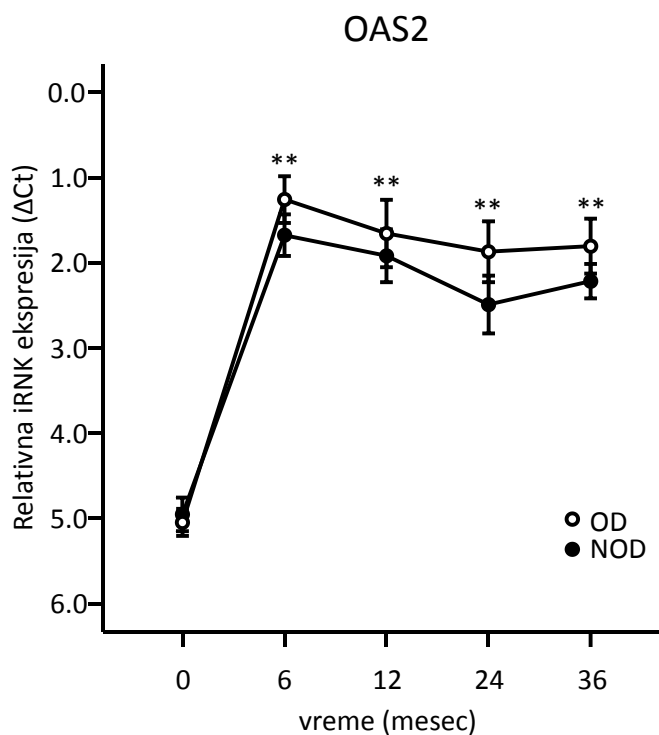
4.3 Uticaj IFN- β terapije na gensku ekspresiju - poređenje OD i NOD

Poređenjem iRNK nivoa između OD i NOD grupe nije nađena statistički značajna razlika ni za jedan od analiziranih gena. Dalje, da bi se utvrdilo da li je razlika u bioraspoloživosti IFN- β uticala na razliku u kliničkom odgovoru OD i NOD, poređena je ekspresija IFN- β -inducibilnih gena, MX1 (Slika 18) i OAS2 (Slika 19).

Kod OD i NOD pacijenata je zapažen isti obrazac ekspresije. Terapija je indukovala MX1 i OAS2 statistički visoko značajno u svakom terminu merenja, što je zapravo bilo približno 12h nakon primanja terapije. Pri tom je ekspresija OAS2 i MX1 je korelisala statistički visoko značajno u svakoj vremenskoj tački. Kod nekoliko pacijenata nije došlo do IFN- β -indukovanog skoka ekspresije MX1 i OAS2 u pojedinim vremenskim tačkama, ali je udeo ovih pacijenata bio sličan u obe grupe ($p > 0,05$).

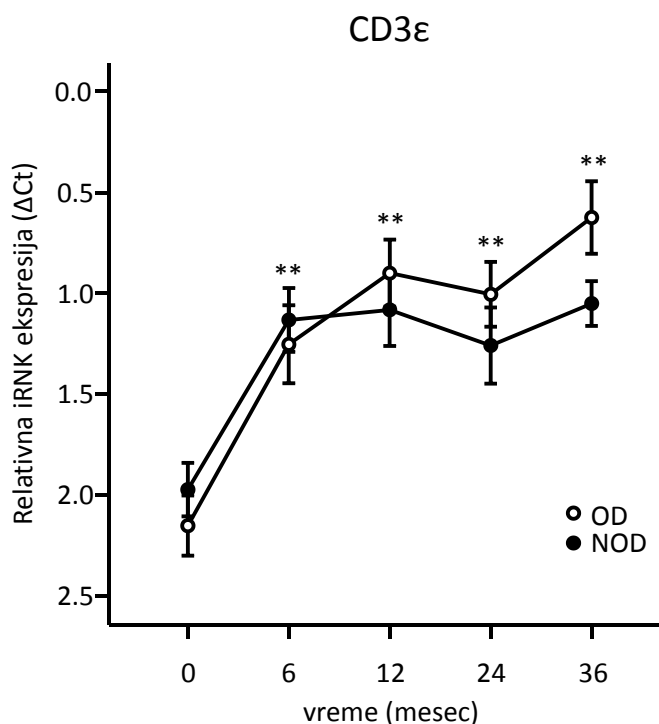


Slika 18. Relativna ekspresija MX1 iRNK tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Prikzane su srednje vrednosti \pm SEM. ** $p < 0,01$, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.



Slika 19. Relativna ekspresija OAS2 iRNK tokom tri godine terapije IFN-β1b. Prikzane su srednje vrednosti ±SEM. **p<0,01, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Pošto je pokazano da IFN-β može da utiče na proliferaciju T-limfocita analizirana je ekspresija CD3ε iRNK kao odraz broja T-limfocita u ukupnom RNK izolatu. CD3ε iRNK nivoi su porasli statistički visoko značajno u obe grupe nakon 6 meseci i nastavili da rastu tokom perioda praćenja.



Slika 20. Relativna ekspresija CD3ε iRNK tokom tri godine terapije IFN-β1b. Prikzane su srednje vrednosti ±SEM. **p<0,01, u odnosu na početne vrednosti, kod OD i NOD.

Kada su korelisane vrednosti relativne genske ekspresije među sobom, sve statistički značajne korelacije su bile pozitivne. Najveći broj korelacija vrednosti relativne genske ekspresije iRNK nađen je u trenutku otpočinjanja terapije (tabela 2), a najmanji u trenutku 6 meseci (tabela 3). U svim vremenskim tačkama ekspresija MX1 je korelisala statistički visoko značajno sa ekspresijom OAS2. Ekspresija IFN-β i IFN-γ su korelisale na početku terapije i u trenutku 12 i 36 meseci. Ekspresija T-bet i IL-12Rβ1, subjedinice receptora koja odgovara p40 subjedinici IL-12, je korelisala na početku, nakon 6 meseci i nakon 36 meseci praćenja. Ekspresija IL-10 je korelisala sa ekspresijom IL-23p19 na početku, nakon 12 i 24 meseca terapije. Među genima čije su se korelacije ponavljale više puta su i IL-12Rβ2 i IL-12p35 (0, 24 i 36 meseci). Ostale statistički značajne korelacije su se javljale dva puta ili jedanput. Rezultati korelacija relativne genske ekspresije za termine 12 meseci, 24 meseca i 36 meseci terapije prikazani su u tabeli 4, 5 i 6, redom.

Tabela 2. Korelacije relativne genske ekspresije pre početka lečenja IFN- β 1b. Radi bolje preglednosti, prikazani su samo koeficijenti za statistički značajne povezanosti: ispod dijagonale sa originalnim statističkim značajnostima, a iznad sa značajnostima nakon korekcije po Holm-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

	T-bet	IL-23p19	IL-12R β 1	TNF	IL-10	CD3 ϵ	IFN- β	IFN- γ	IL-17A	IL-17F	IL-23R	MX1	OAS2	IL-12p35	IL-12/23p40	ROR γ t	FoxP3	GM-CSF	IL-12R β 2	
T-bet	•		0,81**																	0,59*
IL-23p19	0,37*	•		0,65**	0,78**									0,68**	0,94**				0,76**	
IL-12R β 1	0,81**	0,44*	•											0,60*					0,58*	0,56*
TNF		0,65**	0,41*	•											0,68**					
IL-10		0,78**	0,48**	0,52**	•										0,65**				0,83**	
CD3 ϵ						•								0,58*		0,59*				0,59*
IFN- β	0,41*		0,41*				•	0,56*												
IFN- γ	0,45*					0,48**	0,56**	•												
IL-17A									•											
IL-17F	0,34*		0,34*		0,36*					•										
IL-23R						0,54**					•						0,73**			
MX1						0,46**						•	0,77**							
OAS2		-0,35*			-0,52**	0,39*					0,41*	0,77**	•							
IL-12p35	0,46**	0,68**	0,6**	0,53**	0,52**	0,58**		0,44*		0,46**		0,34*		•	0,69**				0,61*	0,57*
IL-12/23p40		0,94**	0,35*	0,68**	0,65**					0,34*				0,69**	•				0,63**	
ROR γ t	0,5**		0,52**			0,59**	0,54**	0,47**			0,73**			0,45**		•				
FoxP3			0,44*			0,39*						0,5**		0,36*		0,44*	•			
GM-CSF	0,38*	0,76**	0,58**	0,52**	0,83**								-0,41*	0,61**	0,63**				•	
IL-12R β 2	0,59**	0,35*	0,56**			0,59**		0,42*			0,47**			0,57**		0,54**	0,54**	0,48**		•

Tabela 3. Korelacije relativne genske ekspresije 6 meseci nakon početka lečenja IFN- β 1b. Radi bolje preglednosti, prikazani su samo koeficijenti za statistički značajne povezanosti: ispod dijagonale sa originalnim statističkim značajnostima, a iznad sa značajnostima nakon korekcije po Holm-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

	T-bet	IL-23p19	IL-12R β 1	TNF	IL-10	CD3 ϵ	IFN- β	IFN- γ	IL-17A	IL-17F	IL-23R	MX1	OAS2	IL-12p35	IL-12/23p40	ROR γ t	FoxP3	GM-CSF	IL-12R β 2	
T-bet	•		0,64**																	
IL-23p19		•																		
IL-12R β 1	0,64**		•																	
TNF			0,42*	•																
IL-10			0,48**	0,35*	•															
CD3 ϵ						•					0,68**									
IFN- β			0,38*			-0,35*	•													
IFN- γ		0,37*					0,43*	•									0,57*			
IL-17A									•											
IL-17F			0,48**		0,43*					•										
IL-23R						0,68**					•									
MX1							-0,34*				0,42*	•	0,94**							
OAS2							-0,43*				0,41*	0,94**	•							
IL-12p35	0,38*		0,47**			0,55**				0,37*	0,51**	0,38*		•						
IL-12/23p40	-0,35*														•					
ROR γ t							0,46**	0,57**	0,36*							•				
FoxP3						0,52**					0,49**	0,45*	0,38*				•			
GM-CSF					-0,35*	0,38*												0,44*	•	
IL-12R β 2	0,37*																	0,44*		•

Tabela 4. Korelacije relativne genske ekspresije 12 meseci nakon početka lečenja IFN- β 1b. Radi bolje preglednosti, prikazani su samo koeficijenti za statistički značajne povezanosti: ispod dijagonale sa originalnim statističkim značajnostima, a iznad sa značajnostima nakon korekcije po Holm-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

	T-bet	IL-23p19	IL-12R β 1	TNF	IL-10	CD3 ϵ	IFN- β	IFN- γ	IL-17A	IL-17F	IL-23R	MX1	OAS2	IL-12p35	IL-12/23p40	ROR γ t	FoxP3	GM-CSF	IL-12R β 2	
T-bet	•																			
IL-23p19		•			0,59*															
IL-12R β 1			•																	
TNF	-0,43*	0,44*		•																
IL-10		0,59**		0,4*	•															
CD3 ϵ			0,44*			•					0,60*							0,69**		
IFN- β	0,43*						•	0,83**									0,69**			
IFN- γ	0,58**			-0,43*			0,83**	•									0,79**			
IL-17A	0,37*		0,44*	-0,46*			0,41*	0,47*	•											
IL-17F						0,38*				•										
IL-23R						0,6**					•									
MX1					0,48**							•	0,90**							
OAS2				0,43*	0,5**			-0,37*				0,90**	•							
IL-12p35			0,54**			0,45*			0,45*	0,39*				•				0,62*		
IL-12/23p40		0,42*		0,55**											•					
ROR γ t	0,56**			-0,4*			0,69**	0,79**					-0,39*			•				
FoxP3			0,53**			0,69**			0,39*	0,45*	0,56**			0,62**			•			
GM-CSF		0,49**			0,37*													•		
IL-12R β 2	0,39*						0,35*					0,38*	0,50**	0,38*						•

Tabela 5. Korelacije relativne genske ekspresije 24 meseca nakon početka lečenja IFN-β1b. Radi bolje preglednosti, prikazani su samo koeficijenti za statistički značajne povezanosti: ispod dijagonale sa originalnim statističkim značajnostima, a iznad sa značajnostima nakon korekcije po Holm-u. *p<0,05, **p<0,01.

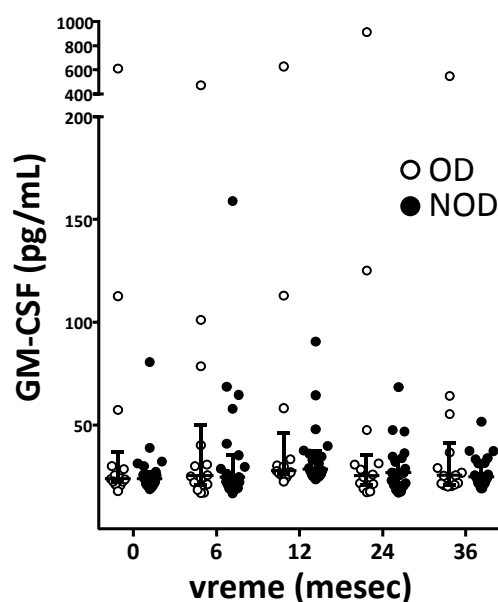
	T-bet	IL-23p19	IL-12Rβ1	TNF	IL-10	CD3ε	IFN-β	IFN-γ	IL-17A	IL-17F	IL-23R	MX1	OAS2	IL-12p35	IL-12/23p40	RORyt	FoxP3	GM-CSF	IL-12Rβ2	
T-bet	•																			
IL-23p19		•		0,64**	0,64**										0,77**			0,57*		
IL-12Rβ1			•																	
TNF		0,64**		•																
IL-10		0,64**		0,48**	•															
CD3ε						•								0,57*			0,74**			
IFN-β		0,37*		0,48**			•													
IFN-γ						0,46**		•												
IL-17A						0,54**		0,42*	•											
IL-17F										•										
IL-23R				-0,34*		0,42*	-0,33*				•									
MX1			0,53**				0,34*					•	0,71**							
OAS2							0,51**					0,71**	•							
IL-12p35						0,57**	0,43*	0,37*	0,51**				0,48**	•						0,58*
IL-12/23p40	-0,36*	0,77**		0,5**	0,56**										•				0,81**	
RORyt	0,40*															•				
FoxP3						0,74**			0,43*					0,36*			•			
GM-CSF		0,57**			0,55**								-0,35*		0,81**			•		
IL-12Rβ2						0,42*			0,44*				0,45*	0,58**						•

Tabela 6. Korelacije relativne genske ekspresije 36 meseci nakon početka lečenja IFN- β 1b. Radi bolje preglednosti, prikazani su samo koeficijenti za statistički značajne povezanosti: ispod dijagonale sa originalnim statističkim značajnostima, a iznad sa značajnostima nakon korekcije po Holm-u. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

	T-bet	IL-23p19	IL-12R β 1	TNF	IL-10	CD3 ϵ	IFN- β	IFN- γ	IL-17A	IL-17F	IL-23R	MX1	OAS2	IL-12p35	IL-12/23p40	ROR γ t	FoxP3	GM-CSF	IL-12R β 2	
T-bet	•		0,64**																	
IL-23p19		•																		
IL-12R β 1	0,64**		•																	
TNF		0,5**	0,47**	•	0,63**															
IL-10		0,48**	0,35*	0,63**	•															
CD3 ϵ						•														
IFN- β							•	0,58*												
IFN- γ	0,38*						0,58**	•												
IL-17A	-0,43*					0,37*			•	0,79**								0,62*		
IL-17F						0,5**			0,79**	•								0,64**		
IL-23R						0,47**					•									
MX1					0,44*							•	0,89**							0,62*
OAS2												0,89**	•							
IL-12p35					0,55**			0,45*			0,43*	0,56**	0,46**	•						0,72**
IL-12/23p40	-0,34*	0,49**						-0,35*	0,36*		-0,55**				•					
ROR γ t							0,54**	0,43*			0,5**					•				
FoxP3	-0,37*					0,53**			0,62**	0,64**	0,33*	0,35*		0,34*			•			
GM-CSF									-0,46**	-0,37*								-0,55**	•	
IL-12R β 2					0,46**			0,40*	0,35*	0,38*		0,62**	0,47**	0,72**				0,54**		•

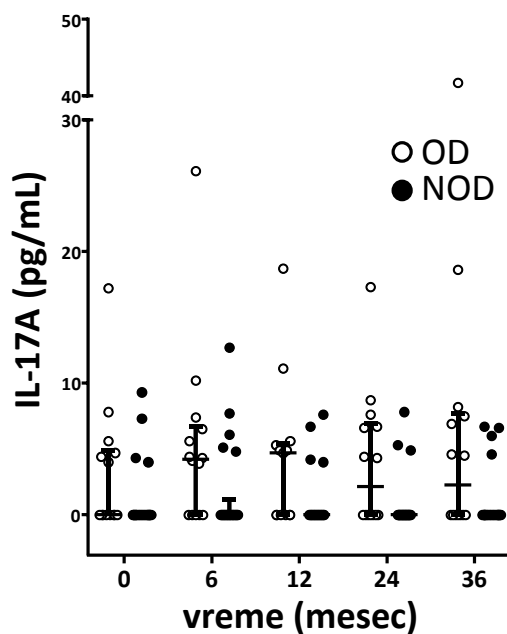
4.4 GM-CSF, IL-17A i IL-17F plazma nivoi kod OD i NOD pacijenata

S obzirom da ne postoje podaci o dugoročnoj kinetici GM-CSF produkcije na nivou proteina, meren je ELISA tehnikom u plazmi. Uz GM-CSF, mereni su i IL-17A i IL-17F, za koje su rezultati kontroverzni (195-199). Koncentracije proteina IL-17A, IL-17F i GM-CSF nisu se statistički značajno menjale tokom perioda praćenja, kako ukupno uzevši, tako i kada su analizirani odvojeno OD i NOD. Na slici 21 prikazani su nivoi GM-CSF u plazmi tokom tri godine terapije IFN- β 1b kod svakog pacijenta. Odvojeno su prikazane grupe OD i NOD. Ni u jednoj vremenskoj tački koncentracije citokina u plazmi nisu korelisale sa odgovarajućim nivoom iRNK.



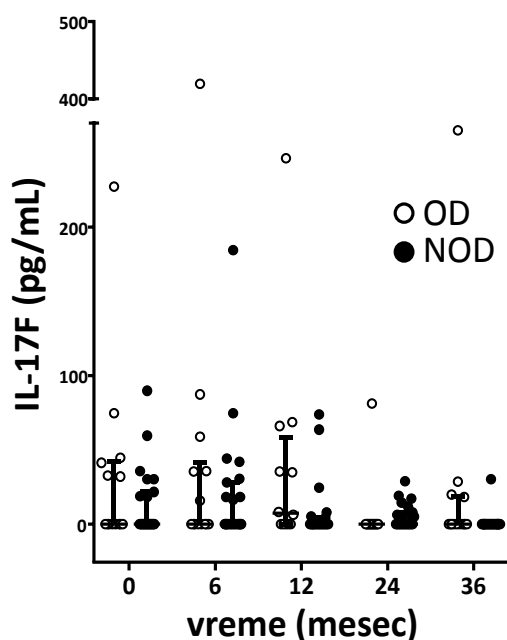
Slika 21. Nivoi GM-CSF u plazmi tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Horizontalne linije predstavljaju vrednost medijane, a vertikalne innterkvartilni opsegza grupu. $p > 0,05$

Na slici 22 prikazani su nivoi IL-17A u plazmi tokom tri godine terapije IFN- β 1b kod svakog pacijenta. Odvojeno su prikazane grupe OD i NOD.



Slika 22. Nivoi IL-17A u plazmi tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Horizontalne linije predstavljaju vrednost medijane, a vertikalne interkvartilni opseg za grupu. $p > 0,05$

Na slici 23 prikazani su nivoi IL-17F u plazmi tokom tri godine terapije IFN- β 1b kod svakog pacijenta. Odvojeno su prikazane grupe OD i NOD.



Slika 23. Nivoi IL-17F u plazmi tokom tri godine terapije IFN- β 1b. Horizontalne linije predstavljaju vrednost medijane, a vertikalne interkvartilni opseg za grupu. $p > 0,05$

4.5 Analiza genske ekspresije u zavisnosti od kliničkih i demografskih parametara

EDSS skor određivan pri svakom uzorkovanju za analizu genske ekspresije i korelisan sa nivoim ekspresije svakog gena ponaosob u odgovarajućim vremenskim tačkama, kao i sa nivom citokina u plazmi. Ni u jednoj vremenskoj tački EDSS nije statistički značajno korelisao sa nivoima iRNK, kao ni sa koncentracijama citokina u plazmi. Isto tako, vrednosti MSSS nisu statistički značajno korelisale sa nivoima iRNK, kao ni sa koncentracijama citokina u plazmi.

Od kliničkih parametara korelisani su još i broj relapsa tokom dve godine pre početka terapije i trajanje bolesti do početka terapije sa inicijalnim nivoima iRNK i citokina u plazmi, pri čemu nije nađena statistički značajna povezanost.

Kada je poređena genska ekspresija kod žena i muškaraca, ustanovljeno je da je ekspresija CD3 ϵ bila statistički značajno niža kod muškaraca u terminu 24 meseca u odnosu na žene, ali ne i u drugim vremenskim tačkama. Ekspresija IL-12R β 2 merena u terminu 12 meseci je bila statistički značajno niža kod muškaraca u odnosu na žene, opet bez razlike u drugim vremenskim tačkama. Za ostale ispitivane gene nije nađena razlika u ekspresiji između polova. Korelisanjem starosti u trenutku otpočinjanja terapije sa nivoima iRNK i koncentracijama citokina u plazmi nije nađena statistički značajna povezanost.

4.6 Analiza podataka u zavisnosti od pojave relapsa

Kako bi od velikog značaja bilo da se što ranije ustanovi koji pacijenti će dobro a koji loše odgovoriti na terapiju IFN- β , analizirano je da li nivoi genske ekspresije ili nivoi citokina u plazmi mereni pre otpočinjanja terapije mogu da predvide kakav će biti terapijski odgovor, i to je vršeno primenom binarne logističke regresije. Nijedna od varijabli nije dosegla nivo statističke značajnosti primenom ovog modela.

Međutim, zapažene su velike varijacije u iRNK kinetici od pacijenta do pacijenta koje mogu da budu u vezi sa relapsima. Pokazano da u relapsu genska ekspresija upadljivo razlikuje u odnosu na period remisije (200). Prema zadatim kriterijumima, NOD su definisani kao bolesnici kod kojih su se javili relapsi tokom perioda praćenja. ANOVA za ponovljena merenja kojim su poređene dve grupe pacijenata uzima u obzir samo

pripadnost jednoj od grupa, a ne i kad su se javljali relapsi u NOD. Imajući to u vidu, da bi se pojava relapsa adekvatnije analizirala u kontekstu promena genske ekspresije, primenjena je metoda koja uzima u obzir vreme javljanja relapsa (izraženo kao broj meseci trajanja terapije). Za ove potrebe primenjen je Cox-ov regresioni model prilagođen za analizu kovarijata promenljivih u vremenu, uzimajući vreme relapsa kao vreme događaja od interesa („survival time“). Za svaki od gena za koje je merena iRNK i proteina je prvo urađena univarijantna regresiona analiza (tabela 2).

Tabela 2. Univarijantne Cox-ove regresione analize iRNK ekspresije i koncentracije citokina u plazmi tokom tri godine terapije IFN- β 1b. * $p < 0,1$

varijabla	p	HR
T-bet	0,091*	1,440
IL-23p19	0,753	1,033
IL-12R β 1	0,358	1,306
TNF	0,649	1,075
IL-10	0,184	1,189
CD3 ϵ	0,604	1,131
IFN- β	0,599	0,949
IFN- γ	0,542	0,902
IL-17A	0,476	0,904
IL-17F	0,767	1,039
IL-23R	0,204	1,228
MX1	0,249	1,148
OAS2	0,064*	1,266
IL-12p35	0,136	1,458
IL-12/23p40	0,367	0,938
ROR γ t	0,250	0,848
FoxP3	0,255	1,296
GM-CSF	0,846	0,974
IL-12R β 2	0,001*	1,932
IL-17A (u plazmi)	0,033*	0,853
IL-17F (u plazmi)	0,239	0,991
GM-CSF (u plazmi)	0,395	0,994

Značajan odnos rizika ($p < 0,1$) je pokazan za IL-12R β 2, OAS2 i T-bet iRNK ekspresiju i IL-17A na nivou proteina u plazmi. Ove varijable su uključene u multivarijantni model u

kojem su kao kovarijate sa značajnim odnosom rizika bile IL-12R β 2 iRNK ekspresija i IL-17A plazma nivo (tabela 3). Niža ekspresija IL-12R β 2 (više Δ Ct vrednosti) i niži nivo IL-17A u plazmi su asocirani sa višim rizikom za pojavu relapsa. Uslov za primenu ove regresione analize, pretpostavka o proporcionalnosti rizika, je bilo ispunjen.

Tabela 3. Multivarijantna Cox-ova regresiona analiza iRNK ekspresije i koncentracije IL-17A u plazmi tokom tri godine terapije IFN- β 1b. *p<0,05, **p<0,01

	HR	p	0. 95% IP
IL-12R β 2	1.983	0.009**	1.187-3.311
T-bet	1.032	0.899	0.640-1.663
OAS2	1.022	0.879	0.776-1.345
IL-17A (u plazmi)	0.853	0.031*	0.738-0.985

IP, interval poverenja

5 Diskusija

U ovoj doktorskoj disertaciji je analizirana ekspresija gena za citokine, njihove receptore i transkripcione faktore karakteristične za Th1, Th17 i Treg subpopulaciju za koje se pretpostavlja da imaju značajnu ulogu u patogenezi MS i to u MNČPK pacijenata sa RRMS tokom tri godine lečenja sa IFN- β 1b. Dodatno, kod ovih pacijenata su merene koncentracije odabranih citokina u plazmi. Analiziran je potencijal ovih medijatora kao biomarkera kliničkog odgovora na terapiju. Tokom IFN- β terapije su se značajno menjali nivoi ekspresije svih ispitivanih gena, i to na isti način kod pacijenata koji dobro odgovaraju na terapiju i kod pacijenata koji suboptimalno odgovaraju na terapiju. IFN- β terapija nije značajno uticala na koncentracije merenih proinlamatornih citokina u plazmi bolesnika sa RRMS. Međutim, kada su podaci analizirani sa ciljem da se proceni rizik od pojave relapsa, nađena je povezanost niže ekspresije β 2 subjedinice receptora za IL-12 (IL-12R β 2) sa višim rizikom za pojavu relapsa.

S obzirom na relativno veliki udeo pacijenata sa multiplom sklerozom koji suboptimalno odgovaraju na terapiju sa IFN- β , na neželjena dejstva ove terapije, i visoke troškove lečenja, potraga za biomarkerima terapijskog odgovora je imperativ u ovoj oblasti. Međutim, pre svega je neophodno definisati šta se podrazumeva pod neadekvatnim odgovorom na terapiju, o čemu i dalje ne postoji konsenzus (188). Nesumnjivo je da kriterijumi kojima se definišu OD i NOD veoma utiču na rezultate istraživanja.

Definicije odgovora na terapiju sa IFN- β se suštinski baziraju na parametrima progresije onesposoblejnosti, kliničkim relapsima i aktivnosti promena na NMR (188). Rio i sar. su u do sada najvećoj studiji koja procenjuje vrednost kriterijuma odgovora na terapiju poredili osetljivost i specifičnost različitih kriterijuma (140). Validnost kriterijuma je procenjivana u odnosu na dosezanje skora 6 na EDSS ili porasta EDSS skora do bar 3 nakon 6 godina od početka terapije. U odnosu na ovaj „zlatni standard“ određivan je procenat pacijenata sa neadekvatnim odgovorom na terapiju. U ovom radu, kriterijumi za loš terapijski odgovor su podrazumevali sledeće:

- A. povećanje EDSS skora od 1 (potvrđeno nakon 6 meseci)
- B. prisustvo bar jednog relapsa
- C. prisustvo ≥ 2 relapsa
- D. sniženje stope relapsa $< 30\%$ (u odnosu na 2 godine pre početka terapije sa IFN- β)

E. sniženje stope relapsa <50% (u odnosu na 2 godine pre početka terapije sa IFN- β)

F. povećanje stope relapsa u odnosu na 2 godine pre početka terapije sa IFN- β

G. kriterijum A ili B

H. kriterijum A ili E

I. kriterijum A i B

J. kriterijum A i E (140)

U zavisnosti od različitih kriterijuma, udeo pacijenata koji loše odgovaraju na terapiju se kreće od 7-45%. Najveću osetljivost je imao kriterijum zasnovan na progresiji EDSS, po kom su NOD definisani kao pacijenti koji tokom 2 godine od početka terapije su imali porast EDSS od bar 1 poen, potvrđen nakon 6 meseci (kriterijum A). Kombinacija progresije EDSS i prisustvo relapsa tokom 2 godine od početka terapije je imala najveću specifičnost (kriterijum G) (140).

Ovaj kriterijum je primenjen i u našoj studiji po kojem je i udeo OD bio najmanji, ali je time izbegnuto arbitrarno definisanje vrednosti praga za broj relapsa i/ili stepen progresije na osnovu kog bi se proglašilo da je odgovor na terapiju dobar ili loš. S druge strane, NOD grupa predstavlja sve pacijente koji nisu ispunili kriterijum za ovako definisan dobar terapijski odgovor, što ih čini relativno heterogenim u pogledu aktivnosti bolesti. Moguće je da se time ujednače vrednosti, koje bi se eventualno upadljivije razlikovale u odnosu na OD. Izbor da se NOD pacijenti ne stratifikuju dodatno je učinjen zbog toga što bi podgrupe bile sa malim brojem pacijenata, pa bi bilo teško donošenje statistički validnih zaključaka. Ograničenje u pogledu definisanja kliničkog statusa pacijenta u ovoj studiji je činjenica da nije sistematski praćena aktivnost promena u CNS na NMR.

Iako je NOD grupa imala relapse, a OD ne, važno je istaći da su uzorci krvi uvek uzimani van relapsa. Time je izbegnut uticaj glukortikoida koji se primenju kao terapija relapsa. Međutim, sigurno je da to bar delimično utiče na same rezultate, jer je pokazano da su razlike u genskoj ekspresiji u relapsu i remisiji upadljive (149, 199, 200). Vrlo verovatno bi neki od nalaza bili drugačiji da su uzorci uzimani tokom relapsa. Dizajn studije bi u

tom slučaju podrazumevao uzimanje uzoraka krvi neposredno pre početka davanja metilprednizolona u relapsu.

Idealno bi bilo kada bi uspeh terapije sa IFN- β mogao da se predvidi na osnovu parametara detektovanih pre otpočinjanja same terapije. Međutim, do sad nisu identifikovani parametri koji bi dovoljno pouzdano dali odgovor da mogu rutinski da se primene u kliničkoj praksi. Korak dalje je pronalaženje prediktora rano nakon otpočinjanja terapije. Istraživanja u potrazi za prediktorima odgovora na IFN- β usmerena su na kliničke i parakliničke parametre. Stopa relapsa i progresija onesposobljenosti su klinički pokazatelji koji se najčešće koriste, a od parakliničkih prisustvo neutrališućih antitela i nalaz NMR: prisustvo lezija koje vezuju gadolinijum na T1 sekvenci, nove i uvećane lezije na T2 sekvenci i atrofija CNS (201). Rio i sar. su osmislili bodovanje kojim bi se nakon prve godine predviđao loš terapijski odgovor nakon sledeće dve godine terapije sa IFN- β , a koje obuhvata prisustvo relapsa, progresije i aktivnih lezija na NMR (202). Pacijenti koji su bili pozitivni bar za dva od tri kriterijuma nakon prve godine su imali veću šansu za javljanje relapsa i progresiju i tokom naredne dve. Pri tom, samo prisustvo relapsa, progresija onesposobljenosti ili aktivnost na NMR pojedinačno tokom prve godine nisu bili značajni prediktori novih relapsa ili progresije onesposobljenosti. Sormani i sar. su pojednostavili ovaj skor i dali modifikovani Rio skor (203), zasnovan na pojavi relapsa i NMR kriterijumima, koji su bili prediktori buduće aktivnosti bolesti i bez procene onesposobljenosti. Nesumnjiva je korist ovih skorova, ali u pogledu procene odgovora svakog pacijenta ponaosob još uvek nije dovoljna da bi se klinički sistematski primenjivali u donošenju odluke o prestanku ili promeni terapije. Potreba za individualnom procenom dovodi do potrage za biomarkerima terapijskog odgovora.

Uopšte, biomarkeri su inicijalno definisani kao “karakteristika koja je objektivno merljiva i procenjiva kao indikator normalnih bioloških procesa, patogenih procesa ili farmakoloških odgovora na terapijsku intervenciju” (204). Bertolotto i sar. dele, teorijski, NOD pacijente u tri podgrupe: genetski (koji imaju izmenjen profil genske ekspresije nakon davanja leka), farmakološki (kod kojih klinički odgovor izostaje zbog faktora koji smanjuju biološku aktivnost IFN- β) i patogenetski (kod kojih je lek neefikasan uprkos tome što biološka raspoloživost leka nije smanjena, usled agresivnog toka bolesti) (205). Shodno tome, biomarkeri odgovora na terapiju sa IFN- β u MS

ispitivani su: prisustvo Nabs, DNK polimorfizmi, genska ekspresija na nivou RNK i proteina, za koje se pretpostavlja imunopatogenetska uloga (189, 206). Slično, i u našoj studiji je ispitivana ekspresija gena za koje se pretpostavlja da imaju značajnu ulogu u patogenezi MS: citokini, njihovi receptori i transkripcioni faktore karakteristične za Th1, Th17 i Treg.

Uobičajeni uzorci u studijama koje analiziraju biomarkere su periferna krv, iz koje mogu da se izdvajaju subpopulacije ćelija, serum ili plazma, i likvor, iz kojeg se takođe mogu da se izdvajaju ćelijske subpopulacije. Imajući u vidu da je cilj potrage za biomarkerima i što šira primenljivost u neurološkoj praksi, dostupnost uzoraka je bitna za praktični aspekt analize. U tom smislu, uzorci periferne krvi imaju prednost, iako likvor bliže reflektuje procese u samom parenhimu CNS.

S obzirom da je dosad za sve tipove imunskih ćelija periferne krvi pokazano da bar delom ima ulogu u patogenezi MS, postavlja se pitanje koju populaciju/populacije ćelija analizirati u potrazi za biomarkerima odgovora na terapiju sa IFN- β . Korišćenje mešovite populacije ćelija, kao što je puna krv ili MNČPK, može da ublaži razlike u obrascu ekspresije onih subpopulacija koje se smatraju ključnim za povoljan efekat IFN- β . S druge strane, prečišćavanje populacija koje se smatraju patogenim, kao što su Th1 i Th17 može da im promeni obrazac ekspresije iRNK (207) i dovede do pogrešnih zaključaka. Stoga se ne može isključiti da se dizajnom studije kao što je naš ne opaža izvesna promena u genskoj ekspresiji moguće bitne iRNK specifične za T-ćelije usled promene udela te iRNK u izolatu iz MNČPK. Pa ipak, s obzirom da su Th podložne fenomenu plastičnosti (208), analizom genske ekspresije izdvojenih pojedinih ćelijskih subpopulacija *ex vivo* može da se previdi širi okvir patološkog procesa.

Kada se ispituje genska ekspresija na nivou transkriptoma, analiza ekspresije velikog broja gena primenom platformi kao što su Affymetrix ili Illumina genski čip svakako da ima prednost zbog svoje sveobuhvatnosti. S druge strane, ako bi se na ovako skupoj tehnologiji bazirala analiza terapijskog odgovora, za mnoge zemlje, uključujući i našu, to ne bi bilo priuštivo. Praktična primena bi bila vrlo usko ograničena na mali broj centara koji raspolažu tehnologijom i materijalnim sredstvima za takvu analizu. Ideja o primeni relativno rasprostranjene savremene tehnike kakva je qPCR za analizu geneske ekspresije upravo uzima u obzir i ta finansijsko-tehnička ograničenja. Prednost qPCR je i

u tome što se rezultati dobijeni primenom mikronizova najčešće validiraju upravo qPCR metodom.

Poželjno bi bilo da biomarker odgovora na terapiju diskriminiše OD i NOD pacijente već pre ili rano nakon otpočinjanja tretmana, u idealnom slučaju merenjem u samo jednom trenutku. Ređe se u studijama prati kinetika genske ekspresije, pogotovo dugoročno (147, 148, 209). Kako pokazuju naši rezultati relativne genske ekspresije, kinetika promena je bila takva da su se za većinu gena javljala značajna snižavanja i povećanja tokom perioda praćenja. U takvoj situaciji, da je bila u pitanju studija preseka rezultati bi se sasvim različito tumačili u zavisnosti od vremenske tačke u kojoj je napravljen presek. Stoga je možda najveća prednost naše studije prospektivnost praćenja.

IFN- β terapija je značajno menjala ekspresiju svih analiziranih gena tokom trogodišnjeg praćenja, ali nije bilo statistički značajne razlike između OD i NOD grupe pacijenata ni za jedan od ispitivanih gena. Ipak, viša ekspresija IL-12R β 2 tokom praćenja je bila povezana sa nižim rizikom za pojavu relapsa. Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima koji analiziraju uticaj IFN- β na ekspresiju IL-12R β 2 Fahey i sar. su prethodno pokazali da IFN- β tretman T-ćelija zdravih donora povećava ekspresiju β 1 i β 2 subjedinice IL-12R, koju prati povećanje fosforilisanog STAT4 (pSTAT4) i indukcija antiinflamatornog citokina IL-10(210). Ovi rezultati su zatim potkrepljeni nalazom da se povećava IL-12R β 2 i pSTAT4 u CD4⁺ T-limfocitima pacijenata sa MS *ex vivo*, nakon tretmana sa IFN- β (211).

Iako su brojne studije analizirale kinetiku genske ekspresije tokom terapije IFN- β , samo nekoliko je analiziralo gene za citokine, njihove receptore i pridružene transkripcione faktore poredeći nivoe ekspresije kod OD i NOD pacijenata. Generalno, ekspresija gena za citokine se retko povezivala sa odgovorom na terapiju (212). Od gena koji su analizirani našom studijom IFN- γ , IL-10 i IL-12 β 1 su prethodno identifikovani kao prediktori (pojedinačno ili u kombinaciji) povoljnog terapijskog odgovora (213-215).

U našoj studiji takva asocijacija nije nađena. Mogući razlozi su razlike u odnosu na grupu bolesnika i dizajn studije, trajanje praćenja i metodologiju. Razlikovali su se: uzorci (puna krv u odnosu na MNČPK); metode detekcije (cDNK mikroniz u odnosu na RT-PCR); postavka qPCR (RT-PCR u jednom koraku u odnosu na RT-PCR iz dva koraka); način normalizacije uzoraka (ukupna količina RNK u odnosu na ekspresiju referentnog

gena). Još uvek nije jasno koja strategija bi bila najkorisnija za praćenje povoljnog efekta IFN- β kod pacijenata sa MS.

Porast IL-10 u serumu, likvoru i iRNK za IL-10 u MNČPK je korelisao sa povoljnim terapijskim odgovorom (156, 216, 217). Hesse i sar. zaključuju da visok endogeni IFN- β , posredno iskazan kroz bazalnu ekspresiju MX1, koreliše sa iRNK za IL-10 i FoxP3 u MNČPK, i pri tom IL-10 negativno koreliše sa brojem lezija na NMR (218). U našoj studiji nismo našli korelacije navedenih gena ni u jednoj vremenskoj tački sa parametrima odgovora na terapiju sa IFN- β , mada nismo imali ni referentnu kontrolnu grupu zdravih osoba u odnosu na koju je u navedenom radu bazalna IFN- β -aktinost ocenjivana kao niska ili visoka.

Mogući mehanizam povoljnog efekta se delom pripisuje povećanju broja i/ili funkcije FoxP3⁺ Treg ćelija (165, 166, 219, 220). Slično ovim studijama u kojima je FoxP3 ekspresija većinom merena nakon 6 meseci terapije, zapazili smo porast ekspresije FoxP3 tokom 12 meseci praćenja i trend viših vrednosti kod OD grupe. Međutim, tokom sledeće dve godine FoxP3 ekspresija se snižavala, što je bilo izraženije kod NOD, ali ne i statistički značajno.

Na širem planu interesantni su noviji rezultati u animalnom modelu koji pokazuju da indukovane FoxP3⁺ Treg sekretuju proinflamatorne citokine *in vitro*, kao što su TNF, IFN- γ i GM-CSF, nakon sekundarne stimulacije TCR. *In vivo*, ove ćelije ne izazivaju EAE, i dalje imaju supresorsku funkciju, iako produkuju TNF i IFN- γ , ali prestaju da produkuju GM-CSF (221). Dakle, Treg verovatno nisu izvor samo antiinflamatornih citokina, već i proinflamatornih, što dodatno komplikuje tumačenje odnosa ovih citokina u odnosu na moguće ćelijske izvore.

S obzirom da IFN- β terapijski efekat ostvaruje preko receptora za koji se vezuje i endogeni c, ispitivan je efekat terapije u zavisnosti od endogene sinteze IFN- β . Nađena je pozitivna korelacija visokog endogenog IFN- β sa produkcijom IL-10 i niskom aktivnosti bolesti (218), međutim postoje rezultati koji govore da kod pacijenata sa MS visokom produkcijom endogenog IFN- β egzogeno dodat IFN- β ima ograničeno dejstvo (158). Dodatno, nedovoljna endogena produkcija IFN- β kod pacijenata sa MS povećava produkciju patogenih citokina (159). U našoj studiji, nivoi iRNK za IFN- β u MNČPK se nisu razlikovali između OD i NOD i nisu korelisali ni sa jednim od proinflamatornih

citokina, osim sa IFN- γ , sa kojim je zapažena pozitivna korelacija u tri navrata tokom perioda praćenja.

Kada je u analizu genske ekspresije uključeno vreme pojave relapsa za svakog pacijenta niža ekspresija iRNK za IL-12R β 2 je bila asocirana sa većom šansom za pojavu relapsa. Iako prethodno nije nađena povezanost IL-12R β 2 sa odgovorom na terapiju ili pojavom relapsa (213), pokazano je da tretman sa IFN- β povećava njegovu ekspresiju u CD4⁺ T-limfocitima kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina (210, 211). Ekspresiju IL-12R β 2 indukuju i IFN- α i IL-27, posredstvom indukcije T-bet, čime se potencira usmerenost ka Th1 koja zavisi od IL-12 (222, 223). Interesantno je da je u prethodnoj studiji naše grupe (224), viša ekspresija T-bet iRNK pre počinjanja IFN- β terapije bila prediktor boljeg kliničkog odgovora. Sada su primenjeni strožiji kriterijumi za povoljan terapijski odgovor (bez povećanja EDSS i bez pojave relapse tokom tri godine) i u analizu je uključeno pet vremenskih tačaka. Opet su OD pacijenti imali inicijalno više nivoe T-bet i, poput IL-12R β 2, niža ekspresija T-bet iRNK je govorila u prilog pojave relapsa, doduše, bez dostizanja statističke značajnosti. Dakle, ekspresije ovih uzajamno zavisnih gena koji deluju u istom smeru sugerišu bolji terapijski odgovor kod pacijenata koji naginju ka Th1 odgovoru, bar sudeći prema iRNK profilu i mogle bi se ubuduće zajedno razmatrati u predikciji relapsa.

Sve je više radova koji potkrepljuju važnu ulogu GM-CSF u EAE, ali je njegova uloga u MS znatno manje jasna. Ipak, nedavni rezultati nekoliko istraživačkih grupa ukazuju na ulogu GM-CSF u MS. Nađeno je da je broj GM-CSF⁺ T-ćelija povišen u krvi MS pacijenata u odnosu na bolesnike sa drugim neurološkim bolestima i da se smanjuje nakon imunomodulatorne terapije (225). Ipak, ovi podaci ne omogućavaju zaključivanje o efektu IFN- β jer je statistička značajnost predstavljena za kombinovanu kohortu pacijenata lečenih sa IFN- β , metilprednizolonom, natalizumabom i glatiramer-acetatom (225). Slično, Rasoulli i sar. su pokazali povišen broj GM-CSF⁺ T-ćelija u krvi nelečenih bolesnika sa MS, dok je kod bolesnika lečenih sa IFN- β taj broj bio uporediv sa zdravom kontrolnom grupom (226). Štaviše, jasno su pokazali da je IFN- β tretman MNČPK i CD4⁺CD45RA⁻ T-ćelija izdvojenih od zdravih donora i pacijenata sa MS smanjio broj GM-CSF⁺ćelija i količinu GM-CSF u supernatantima ćelijskih kultura (226). Nasuprot ovim rezultatima, Peelen i kolege nisu našli povećan broj GM-CSF⁺ T-ćelija kod pacijenta sa MS u poređenju sa zdravima, ni *ex vivo*, ni nakon petodnevne inkubacije sa anti-CD3

antitelom *in vitro* (227). Važno je da se ima u vidu da su navedene studije, iako vrlo korisne u rasvetljavanju značaja GM-CSF u MS, uključivale veoma mali broj pacijenata, da im nedostaju ponovljena merenja GM-CSF tokom terapije i prospektivno praćenje i da ne daju podatke o protokolu IFN- β terapije. Koliko znamo, naša studija je prva koja dugoročno analizira obrazac ekspresije GM-CSF iRNK *ex vivo* u MNČPK RRMS pacijenata primenom qPCR, kao i kinetiku nivoa GM-CSF proteina u plazmi ELISA metodom. GM-CSF ekspresija u MNČPK je imala isti vremenski obrazac kod OD i NOD pacijenata, sa padom u terminu 6 meseci, praćenim porastom do nivoa uporedivog sa početnim nakon 12 i 24 meseca i porastom nakon 36 meseci. Nisu detektovane promene nivoa GM-CSF u plazmi, kao ni razlike u koncentraciji kod OD i NOD pacijenata. Studije preseka su našle povišene nivoe GM-CSF u relapse u likvoru, ali bez razlike u odnosu na druge neurološke bolesti (95, 228, 229). Diskrepanca sa našim rezultatima se može objasniti različitim dizajnom studije (korišćenjem likvora nasuprot krvnoj plazmi) i činjenicom da je u našoj studiji uzorkovanje obavljano kada je pacijent u remisiji da bi se izbegao uticaj glukokortikoida koji se daju kao terapija u relapse. Interesantno je da, uprkos ograničenom broju i nekonzistentnim podacima o ulozi GM-CSF u patogenezi MS, klinička studija u kojoj se primenjuje monoklonsko antitelo koje blokira ovaj citokin (MOR103) u MS je u toku (230).

Među pacijentima sa MS koji se leče sa IFN- β 2-40% razvije Nabs koja utiču na biološku raspoloživost ovog leka (144). Šta više, kod nekih pacijenata se IFN- β neutrališe od strane sIFNAR u odsustvu Nabs (183). Iako je ograničenje naše studije bila činjenica da nisu mereni ni Nabs ni sIFNAR, slični nivoi IFN- β -indukovanih gena MX1 i OAS2 kod OD i NOD grupe sugerišu da biološka raspoloživost IFN- β nije značajno uticala na naše rezultate.

Uporedivi nivoi CD3 ϵ u obe grupe govori u prilog pretpostavci da razlika u kliničkom odgovoru nije uslovljena različitim uticajem IFN- β na broj T-ćelija u dve kliničke grupe. U suprotnosti sa prethodnim studijama koji pokazuju da IFN- β smanjuje broj limfocita u krvi kao i proliferaciju T-ćelija *in vitro* (150, 151), našli smo porast u ekspresiji CD3 ϵ iRNK u MNČPK tokom lečenja sa IFN- β . Međutim, naš rezultat je u skladu sa porastom relativnog broja T-ćelija među mononuklearnim ćelijama periferne krvi (ili leukocitima) nađenim u *in vivo* studiji (231).

Iako to nije bio jedan od ciljeva ove disertacije, dodatno su međusobno korelisane vrednosti ekspresije svih ispitivanih gena, i to na nivou cele kohorte. Kao što se vidi na osnovu grupisanja gena u klastere i analize korelacija genske ekspresije, mnogi geni su imali sličan obrazac ekspresije. Najveći broj statistički značajnih korelacija je detektovan pre početka terapije IFN- β , ali su se malobrojne održale tokom perioda praćenja. Pri tom su sve statistički značajne korelacije koje opstaju nakon korekcije za višestruka testiranja bile pozitivne. Jedino je ekspresija MX1 i OAS2 korelisala, i to statistički visoko značajno, tokom celog perioda praćenja. Ovaj nalaz čini pouzdanijim razmatranja o bioraspodivnosti, jer je obrazac ekspresije dva gena koje indukuje IFN- β bio isti kod obe grupe pacijenata. Još je interesantno da su u tri vremenske tačke od pet korelisale ekspresije IFN- β i IFN- γ , T-bet i IL-12R β 1, subjedinice receptora koja odgovara p40 subjedinici IL-12, kao i IL-12p35 i odgovarajuća subjedinica receptora, IL-12R β 2 – prevashodno medijatori Th1 odgovora. S druge strane, ekspresija IL-10 je pozitivno korelisala sa ekspresijom specifične subjedinice Th17-polarišućeg citokina IL-23p19. Stiče se utisak da je u našim uslovima ekspresija iRNK reflektovala koncentracije IL-23 moguće kao protivteža zapaljenskom procesu (232). Preostale sporadične povezanosti koje su se javile jednom, ili eventualno ponovile još jedanput, iako statistički značajne, najverovatnije su slučajne ibez biološkog značaja.

Pored GM-CSF, analizirali smo IL-17A i IL-17F proteine u krvi istih pacijenata korišćenjem ELISA metode. Ni koncentracije IL-17A i IL-F u plazmi se nisu razlikovale kod OD i NOD tokom celog perioda praćenja, što je bilo u skladu sa rezultatom merenja iRNK. U radovima koji analiziraju korelaciju prisustva i koncentracije IL-17A u serumu sa odgovorom na terapiju IFN- β rezultati nisu jednoznačni (233, 234). Serumski IL-17F je sugerisan kao marker neadekvatnog odgovora na IFN- β terapiju (228, 235), ali u daleko opsežnijoj studiji ovaj nalaz nije potkrepljen (236). Međutim, kada je koncentracija IL-17A u plazmi uvršćena u regresionu analizu koja analizira pojavu relapsa u zavisnosti od ekspresije, nađena je udruženost više koncentracije IL-17A sa nižim rizikom za relaps. Ovakav nalaz je u suprotnosti sa pretpostavljenom patogenom ulogom IL-17A u MS. Ipak, treba ga oprezno tumačiti, jer je većina pacijenata u kohorti (od 21 do 26, zavisno od termina uzorkovanja) imala nedetektabilan nivo ovog citokina, pa su dobijeni rezultati verovatno posledica nesrazmernog uticaja malog broja pozitivnih uzoraka.

Evidentno je da su izostale korelacije iRNK i proteina. Ni u jednoj vremenskoj tački koncentracija nijednog od merenih citokina u plazmi nije korelisala sa ekspresijom iRNK za taj citokin u MNČPK. Brojni su razlozi koji mogu da dovedu do ovakvog rezultata, pre svega usled postranskripcione regulacije genske ekspresije, npr. usled dejstva mikro RNK (237, 238). S tim u vezi, moguć je izostanak povezanosti s obzirom da je poluživot iRNK za citokine višestruko kraći od vremena poluživota proteina (239, 240). Još jedan mogući razlog je činjenica da ELISA detektuje samo slobodnu frakciju citokina. Citokin koji je već vezan za receptore neće se detektovati na ovaj način, a upravo je frakcija vezana za receptore na ćelijama ta koja ostvaruje funkciju. Teško je proceniti u kom odnosu su vezana i slobodna frakcija u krvi. S druge strane, razlog za nepostojanje korelacije količine iRNK iz MNČPK i proteina u plazmi može da bude i sekrecija citokina od strane ćelija koje ne pripadaju MNČPK. Konkretno, kao ćelijski izvori IL-17A i IL-17F navode se $\gamma\delta$ T ćelije, NK i NKT ćelije koje se, osim u perifernoj krvi lokalizuju tkivima gde obavljaju funkcije, urođene limfoidne ćelije u tkivima, zatim makrofagi i Panetove ćelije (241). U psorijazi, pored $\gamma\delta$ T ćelija, NK i NKT ćelija i urođenih limfoidnih ćelija, značajnu količinu IL-17A i IL-17F proizvode i neutrofil i mastociti (242). Smatra se da količina ovih citokina proizvodjena od strane urođenih ćelija i premašuje produkciju od strane Th17 u kožnim lezijama (242). Izvor GM-CSF pored T limfocita mogu da budu fibroblasti, endotelne, epitelne i mezotelne ćelije, makrofagi i mnoge tumorske ćelije (243, 244).

Korelacije kliničkih i demografskih parametara sa nivoima iRNK i citokina u plazmi nisu nađene. Procenjena je udruženost sa starošću u trenutku otpočinjanja terapije, EDSS pre početka terapije IFN- β , trajanjem bolesti do početka terapije, parametar koji predstavlja distribuciju EDSS u zavisnosti od trajanja bolesti – MSSS i brojem relapsa tokom dve godine pre početka terapije. Ranije je pokazano da EDSS nije korelisao sa ekspresijom gena koje indukuje IFN tip I (245) ili drugim, kao što su IL-10 i FoxP3 (218), ali da je korelisao sa ekspresijom mikro RNK (246). Iako su do sada detektovane razlike među polovima u obrascu genske ekspresije (247, 248), nije analizirano da li se održavaju tokom terapije. Pitanje je da li razlike koje smo mi našli u po jednoj vremenskoj tački za CD3 ϵ i IL-12R β 2 predstavljaju biološki značajan nalaz.

Mogući razlozi zbog kojih nisu uočene statistički značajne razlike između pacijentima sa dobrim i lošim odgovorom na terapiju mogli bi da budu:

- 1) Mereni geni nisu relevantni i/ili merenje njihove ekspresije nije dovoljno pouzdan pokazatelj promene procesa koji korelišu sa pozitivnim odgovorom na terapiju sa IFN- β ;
- 2) NOD su relativno nehomogena grupa u odnosu na OD u pogledu težine bolesti, pa je moguće da njihove prosečne vrednosti nisu dovoljno diskriminišuće. Međutim, sa ovim brojem pacijenata bi takva podgrupa bolesnika bila suviše mala;
- 3) Uzimanje uzoraka isključivo u remisiji.

6 Zaključci

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu rezultata ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Kako su pacijenti sa RRMS koji su dobro odgovorili i oni koji su suboptimalno odgovorili na terapiju sa IFN- β imali uporedivo povećanje relativne genske ekspresije MX1, OAS2 i CD3 ϵ nakon 6, 12, 24 i 36 meseci terapije sa IFN- β , uzrok razlike u kliničkom odgovoru najverovatnije nije razlika u biološkoj raspoloživosti leka ili razlika u broju T-limfocita.
- IFN- β terapija je uticala na nivoe ekspresije gena za proinflamatorne (IL-12/23p40, IL-12p35, IL-23p19, T-bet, IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R, RoR γ t, IFN- γ , IL-17A, IL-17F, GM-CSF i TNF) i antiinflamatorne (FoxP3, IL-10) molekule, kao i endogeni IFN- β kod bolesnika sa RRMS tokom celog perioda praćenja, i to na isti način kod OD i NOD grupe.
- IFN- β terapija nije uticala na koncentracije proinflamatornih citokina IL-117A, IL-17F, GM-CSF u plazmi bolesnika sa RRMS.
- Nije utvrđena povezanost inicijalnih nivoa relativne genske ekspresije iRNK, kao ni koncentracije citokina u plazmi sa starosnom dobi pacijenata u trenutku otpočinjanja terapije, brojem relapsa tokom dve godine pre početka terapije i trajanjem bolesti do početka terapije. Nije utvrđena povezanost nivoa relativne genske ekspresije na nivou RNK, kao ni koncentracije citokina u plazmi tokom pre otpočinjanja i nakon 6, 12, 24 i 36 meseci terapije sa IFN- β sa EDSS skorom određenim u istom terminu. Razlike između polova za nivoe relativne genske ekspresije iRNK, kao ni koncentracije citokina u plazmi, nisu nađene, osim za po jedan termin za CD3 ϵ i IL-12R β 2.
- Relativna genska ekspresija iRNK nijednog od ispitivanih molekula, kao ni koncentracija citokina u plazmi, u trenutku otpočinjanja terapije sa IFN- β nije bila prediktor kliničkog odgovora na terapiju. Međutim, tokom celog perioda praćenja, niža ekspresija IL-12R β 2 se asociirala sa višim rizikom za pojavu relapsa, tj. nepovoljan terapijski odgovor.

Mogu se doneti opšti zaključci: da su primenjeni strogi kriterijumi za dobar terapijski odgovor i da je rospektivnost je jedna od osnovnih prednosti ove studije. Dodatnom

analizom nivoa genske ekspresije u odnosu na pojavu relapsa nivo iRNK za IL-12R β 2 je identifikovan kao mogući prediktor relapsa tokom terapije IFN- β RRMS pacijenata, što se može smatrati polaznom osnovom za buduća ispitivanja u većoj kohorti pacijenata.

7 Spisak skraćenica

ANOVA	analiza varijanse
APC	antigen-prezentujuće ćelije (<i>engl.</i> antigen-presenting cells)
Babs	antitela koja vezuju IFN- β (<i>engl.</i> binding antibodies)
BDNF	neurotrofički faktor moždanog porekla (<i>engl.</i> brain-derived neurotrophic factor)
cDNK	komplementarna DNK
CFA	kompletni Frojndov adjuvans (<i>engl.</i> complete Freund's adjuvant)
CGAS	studije povezanosti gena kandidata (<i>engl.</i> candidate gene association studies)
CI	elementarno gvožđe (<i>engl.</i> carbonyl iron)
CIS	klinički izolovani sindrom (<i>engl.</i> clinically isolated syndrome)
CNS	centralni nervni sistem
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EAE	eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis
EBV	Epštajn Bar virus
EDSS	skor proširene skale statusa onesposobljenosti (<i>engl.</i> expanded disability status scale)
ELISA	enzimski imunotest (<i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay).
FoxP3	(<i>engl.</i> forkhead box P3)
GATA3	(<i>engl.</i> GATA binding protein 3)
GK	glukokortikoid
GM-CSF	faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita (<i>engl.</i> granulocyte macrophage colony stimulating factor)
GWAS	studija polimorfizama gena u celokupnom genomu (<i>engl.</i> genom-wide association study)
HLA	humani leukocitni antigen
IBD	inflamatorna bolest creva (<i>engl.</i> inflammatory bowel disease)
IFA	nekompletni Frojndov adjuvans (<i>engl.</i> incomplete Freund's adjuvant)
IFN	interferon
IL	interleukin
ILC	urođene limfoidne ćelije (<i>engl.</i> innate lymphoid cells)
IMSGC	Međunarodni konzorcijum za genetiku multiple skleroze (<i>engl.</i> International Multiple Sclerosis Genetics Consortium)
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina

KMB	krvno-moždana barijera
MBP	bazni protein mijelina (<i>engl.</i> myelin basic protein)
MHC	glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (<i>engl.</i> major histocompatibility complex)
MMP	matriksna metaloproteinaza
M-MuLV	Moloney mišji virus leukemije (<i>engl.</i> Moloney murine leukemia virus)
MNČPK	mononuklearne ćelije periferne krvi
MOG	mijelin oligodendrocitni glikoprotein
MP	metilprednizolon
MS	multipla skleroza
MSSS	skor težine multiple skleroze (<i>engl.</i> multiple sclerosis severity score)
MX1	miksovirusom-indukovani protein 1 (<i>engl.</i> mixovirus-induced protein)
MyD88	(<i>engl.</i> myeloid differentiation primary response 88)
Nabs	neutrališuća antitela za IFN- β (<i>engl.</i> neutralizing antibodies)
NK	urođenoubilačke ćelije (<i>engl.</i> natural killer cells)
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
NOD	pacijenti koji odgovaraju na terapiju IFN- β 1b
OAS2	2'-5'-oligoadenilat-sintetaza 2
OD	pacijenti koji odgovaraju na terapiju IFN- β 1b
PCR	polimerazna reakcija lančanog umnožavanja
PLP	proteolipoprotein
PPMS	primarno progresivna multipla skleroza
qPCR	kvantitativna polimerazna reakcija lančanog umnožavanja
RA	reumatoidni artritis
RNK	ribonukleinska kiselina
ROR γ t	(<i>engl.</i> retinoic acid orphan receptor gamma t)
RRMS	relapsno-remitentna multipla skleroza
Runx1	(<i>engl.</i> Runt-related transcription factor 1)
SD	standardna devijacija
SNP	polimorfizam pojedinačnih nukleotida (<i>engl.</i> single nucleotide polymorphism)
SPMS	sekundarno-progresivna multipla skleroza
STAT	provodnik signala i aktivator transkripcije (<i>engl.</i> signal transducer and activator of transcription)

sv	srednja vrednost
T-bet	(<i>engl.</i> T-box expressed in T cells)
TCR	T-ćelijski receptor (<i>engl.</i> T cell receptor)
Th	pomoćnički T-limfociti (<i>engl.</i> T helper Th)
TLR	receptor sličan Toll-u (<i>engl.</i> Toll-like receptor)
TNF	faktor nekroze tumora (<i>engl.</i> tumor necrosis factor)
ΔCt	ciklus praga detekcije (<i>engl.</i> treshold cycle)

8 Literatura

1. Compston A, Coles A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* 372: 1502-17. [\[Link\]](#)
2. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50: 121-7. [\[Link\]](#)
3. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58: 840-6. [\[Link\]](#)
4. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Bruck W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM. 2011. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365: 2188-97. [\[Link\]](#)
5. Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F, Mattisi I, Grossi P, Favaretto A, Atzori M, Bernardi V, Barachino L, Rinaldi L, Perini P, Gallo P, Filippi M. 2009. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66: 1144-50. [\[Link\]](#)
6. Papadopoulou A, Muller-Lenke N, Naegelin Y, Kalt G, Bendfeldt K, Kuster P, Stoecklin M, Gass A, Sprenger T, Radue EW, Kappos L, Penner IK. 2013. Contribution of cortical and white matter lesions to cognitive impairment in multiple sclerosis. *Mult Scler* 19: 1290-6. [\[Link\]](#)
7. Panou T, Mastorodemos V, Papadaki E, Simos PG, Plaitakis A. 2012. Early signs of memory impairment among multiple sclerosis patients with clinically isolated syndrome. *Behav Neurol* 25: 311-26. [\[Link\]](#)
8. Baysal Kirac L, Ekmekci O, Yuceyar N, Sagduyu Kocaman A. 2014. Assessment of early cognitive impairment in patients with clinically isolated syndromes and multiple sclerosis. *Behav Neurol* 2014: 637694. [\[Link\]](#)
9. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology* 69: 292-302. [\[Link\]](#)
10. Atlas of MS. [\[Link\]](#)
11. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L, Milanov I. 2006. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13: 700-22. [\[Link\]](#)
12. Toncev G, Miletic Drakulic S, Knezevic Z, Boskovic Matic T, Gavrilovic A, Toncev S, Drulovic J, Pekmezovic T. 2011. Prevalence of multiple sclerosis in the Serbian district Sumadija. *Neuroepidemiology* 37: 102-6. [\[Link\]](#)
13. Kurtzke JF. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444-52. [\[Link\]](#)
14. Confavreux C, Vukusic S. 2006. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 129: 595-605. [\[Link\]](#)
15. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, Achiti I, Confavreux C, Coustans M, le Page E, Edan G, McDonnell GV, Hawkins S, Trojano M, Liguori M, Cocco E, Marrosu MG, Tesser F, Leone MA, Weber A, Zipp F, Milterski B, Eppelen JT, Oturai A, Sorensen PS, Celius EG, Lara NT, Montalban X, Villoslada P, Silva AM, Marta M, Leite I, Dubois B, Rubio J, Butzkueven H, Kilpatrick T, Mycko MP, Selmaj KW, Rio ME, Sa M, Salemi G, Savettieri G, Hillert J, Compston DA. 2005. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 64: 1144-51. [\[Link\]](#)

16. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R, Thompson AJ, Miller DH. 2008. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* 131: 808-17. [[Link](#)]
17. Lublin FD. 2014. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol* 72 Suppl 1: 1-5. [[Link](#)]
18. Lublin FD, Reingold SC. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46: 907-11. [[Link](#)]
19. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. 2014. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handbook of clinical neurology* 122: 173-89. [[Link](#)]
20. Rodriguez M. 2007. Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. *Brain Pathol* 17: 219-29. [[Link](#)]
21. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. 1995. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11294-8. [[Link](#)]
22. Campbell IL. 1998. Structural and functional impact of the transgenic expression of cytokines in the CNS. *Ann N Y Acad Sci* 840: 83-96. [[Link](#)]
23. Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TJ, Kremer M, Wunderlich FT, Jung S, Waisman A. 2005. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2: 419-26. [[Link](#)]
24. Koritschoner R, Schweinburg F. 1925. Induktion von Paralyse und Rückenmarksentzündung durch Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitätsf ExpTherapie* 42: 217-83.
25. Paterson PY. 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *The Journal of Experimental Medicine* 111: 119-36. [[Link](#)]
26. Zamvil SS, Steinman L. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8: 579-621. [[Link](#)]
27. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25: 1951-9. [[Link](#)]
28. Mostarica-Stojkovic M, Petrovic M, Lukic ML. 1982. Cellular and genetic basis of the relative resistance to the induction of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in albino oxford (AO) rats. *Adv Exp Med Biol* 149: 699-702. [[Link](#)]
29. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177: 566-73. [[Link](#)]
30. McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CC. 2001. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194: 873-82. [[Link](#)]
31. Goverman J. 1999. Tolerance and autoimmunity in TCR transgenic mice specific for myelin basic protein. *Immunol Rev* 169: 147-59. [[Link](#)]
32. Krishnamoorthy G, Holz A, Wekerle H. 2007. Experimental models of spontaneous autoimmune disease in the central nervous system. *J Mol Med (Berl)* 85: 1161-73. [[Link](#)]
33. Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM. 2013. Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol* 34: 410-22. [[Link](#)]
34. McRae BL, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Miller SD. 1995. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 182: 75-85. [[Link](#)]

35. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 11: 335-9. [[Link](#)]
36. Vanderlugt CL, Begolka WS, Neville KL, Katz-Levy Y, Howard LM, Eagar TN, Bluestone JA, Miller SD. 1998. The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules. *Immunol Rev* 164: 63-72. [[Link](#)]
37. Hampton DW, Anderson J, Pryce G, Irvine KA, Giovannoni G, Fawcett JW, Compston A, Franklin RJ, Baker D, Chandran S. 2008. An experimental model of secondary progressive multiple sclerosis that shows regional variation in gliosis, remyelination, axonal and neuronal loss. *J Neuroimmunol* 201-202: 200-11. [[Link](#)]
38. Al-Izki S, Pryce G, Jackson SJ, Giovannoni G, Baker D. 2011. Immunosuppression with FTY720 is insufficient to prevent secondary progressive neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler* 17: 939-48. [[Link](#)]
39. McFarland HF, Martin R. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8: 913-9. [[Link](#)]
40. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G. 2011. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479: 538-41. [[Link](#)]
41. Owens GP, Bennett JL. 2012. Trigger, pathogen, or bystander: the complex nexus linking Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Mult Scler* 18: 1204-8. [[Link](#)]
42. Pantazou V, Schlupe M, Du Pasquier R. 2015. Environmental factors in multiple sclerosis. *Presse Med* 44: e113-20. [[Link](#)]
43. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. 2003. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12877-82. [[Link](#)]
44. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. 1994. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 44: 11-5. [[Link](#)]
45. Robertson NP, O'Riordan JI, Chataway J, Kingsley DP, Miller DH, Clayton D, Compston DA. 1997. Offspring recurrence rates and clinical characteristics of conjugal multiple sclerosis. *Lancet* 349: 1587-90. [[Link](#)]
46. Ebers GC, Yee IM, Sadovnick AD, Duquette P. 2000. Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol* 48: 927-31. [[Link](#)]
47. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dyment DA, Deluca GC, Herrera BM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Knight JC. 2009. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 5: e1000369. [[Link](#)]
48. McElroy JP, Oksenberg JR. 2008. Multiple sclerosis genetics. *Curr Top Microbiol Immunol* 318: 45-72. [[Link](#)]
49. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, et al. 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306: 234-8. [[Link](#)]
50. Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. 2014. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol* 13: 700-9. [[Link](#)]
51. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, et al. 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476: 214-9. [[Link](#)]
52. International Multiple Sclerosis Genetics C, Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, et al. 2013. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45: 1353-60. [[Link](#)]

53. International Multiple Sclerosis Genetics C. 2013. Network-based multiple sclerosis pathway analysis with GWAS data from 15,000 cases and 30,000 controls. *Am J Hum Genet* 92: 854-65. [[Link](#)]
54. Hollenbach JA, Oksenberg JR. 2015. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun* [[Link](#)]
55. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707-17. [[Link](#)]
56. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. 1996. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6: 259-74. [[Link](#)]
57. Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D. 2008. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 131: 1722-35. [[Link](#)]
58. Barnett MH, Prineas JW. 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55: 458-68. [[Link](#)]
59. Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, Dijkstra CD, van der Valk P, Bo L. 2008. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63: 16-25. [[Link](#)]
60. Metz I, Weigand SD, Popescu BF, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. 2014. Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 75: 728-38. [[Link](#)]
61. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162: 1-11. [[Link](#)]
62. Goverman J. 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9: 393-407. [[Link](#)]
63. Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-73. [[Link](#)]
64. Kuchroo VK, Anderson AC, Waldner H, Munder M, Bettelli E, Nicholson LB. 2002. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 20: 101-23. [[Link](#)]
65. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156: 5-7. [[Link](#)]
66. Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A. 2002. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169: 7104-10. [[Link](#)]
67. Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, Kamoun M, Rostami A. 2003. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 170: 2153-60. [[Link](#)]
68. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744-8. [[Link](#)]
69. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201: 233-40. [[Link](#)]

70. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126: 1121-33. [[Link](#)]
71. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-32. [[Link](#)]
72. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-41. [[Link](#)]
73. Gu C, Wu L, Li X. 2013. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 64: 477-85. [[Link](#)]
74. Ghilardi N, Ouyang W. 2007. Targeting the development and effector functions of TH17 cells. *Semin Immunol* 19: 383-93. [[Link](#)]
75. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. 2004. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 200: 79-87. [[Link](#)]
76. Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. 2008. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *The Journal of Experimental Medicine* 205: 1535-41. [[Link](#)]
77. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nature medicine* 14: 337. [[Link](#)]
78. Boniface K, Blumenschein WM, Brovont-Porth K, McGeachy MJ, Basham B, Desai B, Pierce R, McClanahan TK, Sadekova S, de Waal Malefyt R. 2010. Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage. *J Immunol* 185: 679-87. [[Link](#)]
79. Yang Y, Weiner J, Liu Y, Smith AJ, Huss DJ, Winger R, Peng H, Cravens PD, Racke MK, Lovett-Racke AE. 2009. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* 206: 1549-64. [[Link](#)]
80. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinewietfeld M, Kunder S, Hafler DA, Sobel RA, Regev A, Kuchroo VK. 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 13: 991-9. [[Link](#)]
81. Sundrud MS, Trivigno C. 2013. Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Semin Immunol* 25: 263-72. [[Link](#)]
82. Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH. 2008. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol* 7: 796-804. [[Link](#)]
83. Vollmer TL, Wynn DR, Alam MS, Valdes J. 2011. A phase 2, 24-week, randomized, placebo-controlled, double-blind study examining the efficacy and safety of an anti-interleukin-12 and -23 monoclonal antibody in patients with relapsing-remitting or secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 17: 181-91. [[Link](#)]
84. Krakowski M, Owens T. 1996. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 26: 1641-6. [[Link](#)]
85. Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. 1987. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1: 893-5. [[Link](#)]
86. Billiau A. 1995. Interferons in multiple sclerosis: warnings from experiences. *Neurology* 45: S50-3. [[Link](#)]
87. Kroenke MA, Chensue SW, Segal BM. 2010. EAE mediated by a non-IFN-gamma/non-IL-17 pathway. *Eur J Immunol* 40: 2340-8. [[Link](#)]

88. Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. 2011. ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12: 560-7. [[Link](#)]
89. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A. 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12: 568-75. [[Link](#)]
90. Noster R, Riedel R, Mashreghi MF, Radbruch H, Harms L, Haftmann C, Chang HD, Radbruch A, Zielinski CE. 2014. IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med* 6: 241ra80. [[Link](#)]
91. Zhang J, Roberts AI, Liu C, Ren G, Xu G, Zhang L, Devadas S, Shi Y. 2013. A novel subset of helper T cells promotes immune responses by secreting GM-CSF. *Cell Death Differ* 20: 1731-41. [[Link](#)]
92. Croxford AL, Spath S, Becher B. 2015. GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage. *Trends Immunol* 36: 651-62. [[Link](#)]
93. Croxford AL, Lanzinger M, Hartmann FJ, Schreiner B, Mair F, Pelczar P, Clausen BE, Jung S, Greter M, Becher B. 2015. The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2(+) Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity* 43: 502-14. [[Link](#)]
94. Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thiruppathi M, Alharshawi K, Elshabrawy H, Holterman MJ, Prabhakar BS. 2015. Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. *J Interferon Cytokine Res* [[Link](#)]
95. Carrieri PB, Provitera V, De Rosa T, Tartaglia G, Gorga F, Perrella O. 1998. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20: 373-82. [[Link](#)]
96. Behrens F, Tak PP, Ostergaard M, Stoilov R, Wiland P, Huizinga TW, Berenfs VY, Vladeva S, Rech J, Rubbert-Roth A, Korkosz M, Rekalov D, Zupanets IA, Ejbjerg BJ, Geiseler J, Fresenius J, Korolkiewicz RP, Schottelius AJ, Burkhardt H. 2015. MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Ann Rheum Dis* 74: 1058-64. [[Link](#)]
97. Hamilton JA. 2015. GM-CSF as a target in inflammatory/autoimmune disease: current evidence and future therapeutic potential. *Expert Rev Clin Immunol* 11: 457-65. [[Link](#)]
98. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65. [[Link](#)]
99. Baker D, Butler D, Scallon BJ, O'Neill JK, Turk JL, Feldmann M. 1994. Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur J Immunol* 24: 2040-8. [[Link](#)]
100. Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM, Lingenheld EG, Grunnet ML, Padula SJ, Clark RB. 1990. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 172: 1193-200. [[Link](#)]
101. Hauser SL, Doolittle TH, Lincoln R, Brown RH, Dinarello CA. 1990. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology* 40: 1735-9. [[Link](#)]
102. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. 1989. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 170: 607-12. [[Link](#)]
103. Sharief MK, Hentges R. 1991. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 325: 467-72. [[Link](#)]

104. Dendrou CA, Bell JI, Fugger L. 2013. A clinical conundrum: the detrimental effect of TNF antagonists in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics* 14: 1397-404. [[Link](#)]
105. Kaltsonoudis E, Voulgari PV, Konitsiotis S, Drosos AA. 2014. Demyelination and other neurological adverse events after anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev* 13: 54-8. [[Link](#)]
106. Anderton SM, Liblau RS. 2008. Regulatory T cells in the control of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 21: 248-54. [[Link](#)]
107. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212: 8-27. [[Link](#)]
108. Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF. 2006. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 55: 671-80. [[Link](#)]
109. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. 2007. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 110: 2983-90. [[Link](#)]
110. Zhang F, Meng G, Strober W. 2008. Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 9: 1297-306. [[Link](#)]
111. Romagnani S. 2006. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 36: 1357-66. [[Link](#)]
112. Zhu J, Paul WE. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20: 4-12. [[Link](#)]
113. Kleinewietfeld M, Hafler DA. 2014. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev* 259: 231-44. [[Link](#)]
114. Molnarfi N, Schulze-Toppfhoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, Shetty A, Linington C, Slavin AJ, Hidalgo J, Jenne DE, Wekerle H, Sobel RA, Bernard CC, Shlomchik MJ, Zamvil SS. 2013. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med* 210: 2921-37. [[Link](#)]
115. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A, Fillatreau S, Gray D. 2012. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 209: 1001-10. [[Link](#)]
116. Aung LL, Mouradian MM, Dhib-Jalbut S, Balashov KE. 2015. MMP-9 expression is increased in B lymphocytes during multiple sclerosis exacerbation and is regulated by microRNA-320a. *J Neuroimmunol* 278: 185-9. [[Link](#)]
117. Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, Baranzini SE, Leppert D, von Budingen HC. 2014. Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 193: 580-6. [[Link](#)]
118. Ray A, Wang L, Dittel BN. 2015. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int Immunol* [[Link](#)]
119. Salou M, Garcia A, Michel L, Gainche-Salmon A, Loussouarn D, Nicol B, Guillot F, Hulin P, Nedellec S, Baron D, Ramstein G, Soulillou JP, Brouard S, Nicot AB, Degauque N, Laplaud DA. 2015. Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2: 609-22. [[Link](#)]
120. Lolli F, Martini H, Citro A, Franceschini D, Portaccio E, Amato MP, Mechelli R, Annibaldi V, Sidney J, Sette A, Salvetti M, Barnaba V. 2013. Increased CD8+ T cell responses to apoptotic T cell-associated antigens in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 10: 94. [[Link](#)]

121. Reuter E, Gollan R, Grohmann N, Paterka M, Salmon H, Birkenstock J, Richers S, Leuenberger T, Brandt AU, Kuhlmann T, Zipp F, Siffrin V. 2015. Cross-recognition of a myelin peptide by CD8+ T cells in the CNS is not sufficient to promote neuronal damage. *J Neurosci* 35: 4837-50. [[Link](#)]
122. Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ. 2014. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 128: 191-213. [[Link](#)]
123. Cox GM, Kithcart AP, Pitt D, Guan Z, Alexander J, Williams JL, Shawler T, Dagia NM, Popovich PG, Satoskar AR, Whitacre CC. 2013. Macrophage migration inhibitory factor potentiates autoimmune-mediated neuroinflammation. *J Immunol* 191: 1043-54. [[Link](#)]
124. Ramaglia V, Hughes TR, Donev RM, Ruseva MM, Wu X, Huitinga I, Baas F, Neal JW, Morgan BP. 2012. C3-dependent mechanism of microglial priming relevant to multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 965-70. [[Link](#)]
125. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Cotleur AC, Kidd G, Zorlu MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Floruta CM, Zhu M, Charo IF, Weiner HL, Ransohoff RM. 2014. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 211: 1533-49. [[Link](#)]
126. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. 1997. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 186: 1677-87. [[Link](#)]
127. Winkler-Pickett R, Young HA, Cherry JM, Diehl J, Wine J, Back T, Bere WE, Mason AT, Ortaldo JR. 2008. In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *J Immunol* 180: 4495-506. [[Link](#)]
128. Martinez-Rodriguez JE, Lopez-Botet M, Munteis E, Rio J, Roquer J, Montalban X, Comabella M. 2011. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 141: 348-56. [[Link](#)]
129. Rodriguez-Martin E, Picon C, Costa-Frossard L, Alenda R, Sainz de la Maza S, Roldan E, Espino M, Villar LM, Alvarez-Cermeno JC. 2015. Natural killer cell subsets in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 180: 243-9. [[Link](#)]
130. Lin YC, Winokur P, Blake A, Wu T, Romm E, Bielekova B. 2015. Daclizumab reverses intrathecal immune cell abnormalities in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2: 445-55. [[Link](#)]
131. Van Kaer L, Wu L, Parekh VV. 2015. Natural killer T cells in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology* [[Link](#)]
132. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31: 331-41. [[Link](#)]
133. Blink SE, Caldis MW, Goings GE, Harp CT, Malissen B, Prinz I, Xu D, Miller SD. 2014. $\gamma\delta$ T Cell Subsets Play Opposing Roles in Regulating Experimental Autoimmune Encephalomyelitis(1). *Cell Immunol* 290: 39-51. [[Link](#)]
134. Sonnenberg GF, Artis D. 2015. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med* 21: 698-708. [[Link](#)]
135. Hatfield JK, Brown MA. 2015. Group 3 innate lymphoid cells accumulate and exhibit disease-induced activation in the meninges in EAE. *Cell Immunol* [[Link](#)]
136. Rumble JM, Huber AK, Krishnamoorthy G, Srinivasan A, Giles DA, Zhang X, Wang L, Segal BM. 2015. Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS. *J Exp Med* 212: 23-35. [[Link](#)]
137. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, Cosmi L, Lunardi C, Annunziato F, Romagnani S, Cassatella MA. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115: 335-43. [[Link](#)]

138. Isaacs A, Lindenmann J. 1957. Virus Interference. I. The Interferon. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 147: 258-67. [[Link](#)]
139. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43: 655-61. [[Link](#)]
140. Rio J, Nos C, Tintore M, Tellez N, Galan I, Pelayo R, Comabella M, Montalban X. 2006. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 59: 344-52. [[Link](#)]
141. Plosker GL. 2011. Interferon-beta-1b: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs* 25: 67-88. [[Link](#)]
142. Hartung DM, Bourdette DN, Ahmed SM, Whitham RH. 2015. The cost of multiple sclerosis drugs in the US and the pharmaceutical industry: Too big to fail? *Neurology* 84: 2185-92. [[Link](#)]
143. C lista lekova RFZO. [[Link](#)]
144. Sorensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J, Polman C, Pozzilli C, Ross C. 2005. Guidelines on use of anti-IFN-beta antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-beta antibodies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 12: 817-27. [[Link](#)]
145. Gonzalez-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. 2012. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol* 12: 125-35. [[Link](#)]
146. Bekisz J, Sato Y, Johnson C, Husain SR, Puri RK, Zoon KC. 2013. Immunomodulatory effects of interferons in malignancies. *J Interferon Cytokine Res* 33: 154-61. [[Link](#)]
147. Goertsches RH, Hecker M, Koczan D, Serrano-Fernandez P, Moeller S, Thiesen HJ, Zettl UK. 2010. Long-term genome-wide blood RNA expression profiles yield novel molecular response candidates for IFN-beta-1b treatment in relapsing remitting MS. *Pharmacogenomics* 11: 147-61. [[Link](#)]
148. Hecker M, Goertsches RH, Fatum C, Koczan D, Thiesen HJ, Guthke R, Zettl UK. 2012. Network analysis of transcriptional regulation in response to intramuscular interferon-beta-1a multiple sclerosis treatment. *Pharmacogenomics J* 12: 134-46. [[Link](#)]
149. Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M. 2004. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol* 55: 410-7. [[Link](#)]
150. Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Sorensen PS, Sellebjerg F, Nielsen CH. 2008. The effect of beta-interferon therapy on myelin basic protein-elicited CD4+ T cell proliferation and cytokine production in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 129: 80-9. [[Link](#)]
151. Huang H, Ito K, Dangond F, Dhib-Jalbut S. 2013. Effect of interferon beta-1a on B7.1 and B7.2 B-cell expression and its impact on T-cell proliferation. *J Neuroimmunol* 258: 27-31. [[Link](#)]
152. Hallal-Longo DE, Mirandola SR, Oliveira EC, Farias AS, Pereira FG, Metz IL, Brandao CO, Ruocco HH, Damasceno BP, Santos LM. 2007. Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in multiple sclerosis patients treated with IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res* 27: 865-73. [[Link](#)]
153. Comabella M, Julia E, Tintore M, Brieva L, Tellez N, Rio J, Lopez C, Rovira A, Montalban X. 2008. Induction of serum soluble tumor necrosis factor receptor II (sTNF-RII) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by interferon beta-1b in patients with progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 255: 1136-41. [[Link](#)]
154. Mirandola SR, Hallal DEM, Farias AS, Oliveira EC, Brandão CO, Ruocco HH, Damasceno BP, Santos LMB. 2009. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine

- secretion in patients with multiple sclerosis. *International Immunopharmacology* 9: 824-30. [\[Link\]](#)
155. Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S. 2009. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol* 183: 5418-27. [\[Link\]](#)
156. Rudick RA, Ransohoff RM, Lee JC, Pepler R, Yu M, Mathisen PM, Tuohy VK. 1998. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 50: 1294-300. [\[Link\]](#)
157. Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut S. 2000. IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol* 165: 548-57. [\[Link\]](#)
158. Axtell RC, Raman C, Steinman L. 2013. Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 44: 114-20. [\[Link\]](#)
159. Tao Y, Zhang X, Chopra M, Kim MJ, Buch KR, Kong D, Jin J, Tang Y, Zhu H, Jewells V, Markovic-Plese S. 2014. The role of endogenous IFN-beta in the regulation of Th17 responses in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol* 192: 5610-7. [\[Link\]](#)
160. Sweeney CM, Lonergan R, Basdeo SA, Kinsella K, Dungan LS, Higgins SC, Kelly PJ, Costelloe L, Tubridy N, Mills KH, Fletcher JM. 2011. IL-27 mediates the response to IFN-beta therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain Behav Immun* 25: 1170-81. [\[Link\]](#)
161. Ramgolam VS, Sha Y, Marcus KL, Choudhary N, Troiani L, Chopra M, Markovic-Plese S. 2011. B cells as a therapeutic target for IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol* 186: 4518-26. [\[Link\]](#)
162. Vallittu AM, Saraste M, Airas L. 2007. CCR7 expression on peripheral blood lymphocytes is up-regulated following treatment of multiple sclerosis with interferon-beta. *Neurol Res* 29: 763-6. [\[Link\]](#)
163. Comabella M, Rio J, Espejo C, Ruiz de Villa M, Al-Zayat H, Nos C, Deisenhammer F, Baranzini SE, Nonell L, Lopez C, Julia E, Oksenberg JR, Montalban X. 2009. Changes in matrix metalloproteinases and their inhibitors during interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 130: 145-50. [\[Link\]](#)
164. Ozenci V, Kouwenhoven M, Teleshova N, Pashenkov M, Fredrikson S, Link H. 2000. Multiple sclerosis: pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN-beta. *J Neuroimmunol* 108: 236-43. [\[Link\]](#)
165. Chen M, Chen G, Deng S, Liu X, Hutton GJ, Hong J. 2012. IFN-beta induces the proliferation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 242: 39-46. [\[Link\]](#)
166. Namdar A, Nikbin B, Ghabaee M, Bayati A, Izad M. 2010. Effect of IFN-beta therapy on the frequency and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and Foxp3 gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): a preliminary study. *J Neuroimmunol* 218: 120-4. [\[Link\]](#)
167. Aristimuno C, de Andres C, Bartolome M, de las Heras V, Martinez-Gines ML, Arroyo R, Fernandez-Cruz E, Sanchez-Ramon S. 2010. IFNbeta-1a therapy for multiple sclerosis expands regulatory CD8+ T cells and decreases memory CD8+ subset: a longitudinal 1-year study. *Clin Immunol* 134: 148-57. [\[Link\]](#)
168. Schubert RD, Hu Y, Kumar G, Szeto S, Abraham P, Winderl J, Guthridge JM, Pardo G, Dunn J, Steinman L, Axtell RC. 2015. IFN-beta treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity. *J Immunol* 194: 2110-6. [\[Link\]](#)

169. Rudick RA, Ransohoff RM, Pepler R, VanderBrug Medendorp S, Lehmann P, Alam J. 1996. Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40: 618-27. [[Link](#)]
170. Jiang H, Milo R, Swoveland P, Johnson KP, Panitch H, Dhib-Jalbut S. 1995. Interferon beta-1b reduces interferon gamma-induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *J Neuroimmunol* 61: 17-25. [[Link](#)]
171. Genc K, Dona DL, Reder AT. 1997. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J Clin Invest* 99: 2664-71. [[Link](#)]
172. Li Q, Milo R, Panitch H, Bever CT, Jr. 1998. Effect of propranolol and IFN-beta on the induction of MHC class II expression and cytokine production by IFN-gamma IN THP-1 human monocytic cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20: 39-61. [[Link](#)]
173. Lopez C, Comabella M, Al-zayat H, Tintore M, Montalban X. 2006. Altered maturation of circulating dendritic cells in primary progressive MS patients. *J Neuroimmunol* 175: 183-91. [[Link](#)]
174. Dhib-Jalbut S, Marks S. 2010. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 74 Suppl 1: S17-24. [[Link](#)]
175. Graber J, Zhan M, Ford D, Kursch F, Francis G, Bever C, Panitch H, Calabresi PA, Dhib-Jalbut S. 2005. Interferon-beta-1a induces increases in vascular cell adhesion molecule: implications for its mode of action in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 161: 169-76. [[Link](#)]
176. Jin S, Kawanokuchi J, Mizuno T, Wang J, Sonobe Y, Takeuchi H, Suzumura A. 2007. Interferon- β is neuroprotective against the toxicity induced by activated microglia. *Brain Research* 1179: 140-6. [[Link](#)]
177. Biernacki K, Antel JP, Blain M, Narayanan S, Arnold DL, Prat A. 2005. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62: 563-8. [[Link](#)]
178. Dhib-Jalbut S, Sumandeeep S, Valenzuela R, Ito K, Patel P, Rametta M. 2013. Immune response during interferon beta-1b treatment in patients with multiple sclerosis who experienced relapses and those who were relapse-free in the START study. *J Neuroimmunol* 254: 131-40. [[Link](#)]
179. Axtell RC, Raman C, Steinman L. 2011. Interferon-beta exacerbates Th17-mediated inflammatory disease. *Trends Immunol* 32: 272-7. [[Link](#)]
180. Pachner AR, Narayan K, Pak E. 2006. Multiplex analysis of expression of three IFNbeta-induced genes in antibody-positive MS patients. *Neurology* 66: 444-6. [[Link](#)]
181. Sorensen PS. 2008. Neutralizing antibodies against interferon-Beta. *Ther Adv Neurol Disord* 1: 125-41. [[Link](#)]
182. Hegen H, Millonig A, Bertolotto A, Comabella M, Giovanonni G, Guger M, Hoelzl M, Khalil M, Killestein J, Lindberg R, Malucchi S, Mehling M, Montalban X, Polman C, Rudzki D, Schautzer F, Sellebjerg F, Sørensen P, Deisenhammer F. 2014. Early detection of neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development. *Multiple Sclerosis Journal* 20: 577-87. [[Link](#)]
183. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Valentino P, Granieri L, Di Sapio A, Capobianco M, Sala A, Malucchi S, Kappos L, Lindberg RL, Bertolotto A. 2007. Anti-interferon-beta neutralising activity is not entirely mediated by antibodies. *J Neuroimmunol* 192: 198-205. [[Link](#)]
184. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K. 2005. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 65: 33-9. [[Link](#)]
185. Bellomi F, Scagnolari C, Tomassini V, Gasperini C, Paolillo A, Pozzilli C, Antonelli G. 2003. Fate of neutralizing and binding antibodies to IFN beta in MS patients treated with IFN beta for 6 years. *J Neurol Sci* 215: 3-8. [[Link](#)]

186. Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A. 2004. Measurement of neutralizing antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 251 Suppl 2: I131-9. [[Link](#)]
187. Bertolotto A, Granieri L, Marnetto F, Valentino P, Sala A, Capobianco M, Malucchi S, Di Sapio A, Malentacchi M, Matta M, Caldano M. 2015. Biological monitoring of IFN- β therapy in Multiple Sclerosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26: 241-8. [[Link](#)]
188. Sormani MP, De Stefano N. 2013. Defining and scoring response to IFN-beta in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 9: 504-12. [[Link](#)]
189. Graber JJ, Dhib-Jalbut S. 2011. Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 305: 1-10. [[Link](#)]
190. Levic ZM, Dujmovic I, Pekmezovic T, Jarebinski M, Marinkovic J, Stojsavljevic N, Drulovic J. 1999. Prognostic factors for survival in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5: 171-8. [[Link](#)]
191. Wandinger KP, Wessel K, Trillenber P, Heindl N, Kirchner H. 1998. Effect of high-dose methylprednisolone administration on immune functions in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 97: 359-65. [[Link](#)]
192. Martinez-Caceres EM, Barrau MA, Brieva L, Espejo C, Barbera N, Montalban X. 2002. Treatment with methylprednisolone in relapses of multiple sclerosis patients: immunological evidence of immediate and short-term but not long-lasting effects. *Clin Exp Immunol* 127: 165-71. [[Link](#)]
193. Crockard AD, Treacy MT, Droogan AG, McNeill TA, Hawkins SA. 1995. Transient immunomodulation by intravenous methylprednisolone treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 1: 20-4. [[Link](#)]
194. Leussink VI, Jung S, Merschorf U, Toyka KV, Gold R. 2001. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 58: 91-7. [[Link](#)]
195. Braitch M, Hari Krishnan S, Robins RA, Nichols C, Fahey AJ, Showe L, Constantinescu CS. 2009. Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 119: 239-45. [[Link](#)]
196. Myhr KM, Mellgren SI. 2009. Corticosteroids in the treatment of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl*: 73-80. [[Link](#)]
197. Collett D. 2004. Modelling Survival Data in Medical Research. CRC Press, London, 251-271.
198. Therneau T. 2015. A Package for Survival Analysis in S. version 2.38 [[Link](#)]
199. Irizar H, Muñoz-Culla M, Sepúlveda L, Sáenz-Cuesta M, Prada Á, Castillo-Triviño T, Zamora-López G, de Munain AL, Olascoaga J, Otaegui D. 2014. Transcriptomic Profile Reveals Gender-Specific Molecular Mechanisms Driving Multiple Sclerosis Progression. *PLoS ONE* 9: e90482. [[Link](#)]
200. Gurevich M, Achiron A. 2012. The switch between relapse and remission in multiple sclerosis: continuous inflammatory response balanced by Th1 suppression and neurotrophic factors. *J Neuroimmunol* 252: 83-8. [[Link](#)]
201. Rudick RA, Polman CH. 2009. Current approaches to the identification and management of breakthrough disease in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 8: 545-59. [[Link](#)]
202. Rio J, Castillo J, Rovira A, Tintore M, Sastre-Garriga J, Horga A, Nos C, Comabella M, Aymerich X, Montalban X. 2009. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler* 15: 848-53. [[Link](#)]
203. Sormani MP, Rio J, Tintore M, Signori A, Li D, Cornelisse P, Stubinski B, Stromillo M, Montalban X, De Stefano N. 2013. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 19: 605-12. [[Link](#)]
204. Biomarkers Definitions Working Group, 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69: 89-95. [[Link](#)]

205. Bertolotto A, Gilli F. 2008. Interferon-beta responders and non-responders. A biological approach. *Neurol Sci* 29 Suppl 2: S216-7. [[Link](#)]
206. Comabella M, Vandenbroeck K. 2011. Pharmacogenomics and multiple sclerosis: moving toward individualized medicine. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11: 484-91. [[Link](#)]
207. Bryant PA, Smyth GK, Robins-Browne R, Curtis N. 2009. Detection of gene expression in an individual cell type within a cell mixture using microarray analysis. *PLoS One* 4: e4427. [[Link](#)]
208. Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Guarini P, De Simone M, Pagani M, Abrignani S. 2014. Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol* 5: 630. [[Link](#)]
209. Croze E, Yamaguchi KD, Knappertz V, Reder AT, Salamon H. 2013. Interferon-beta-1b-induced short- and long-term signatures of treatment activity in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics J* 13: 443-51. [[Link](#)]
210. Fahey AJ, Robins RA, Constantinescu CS. 2007. Reciprocal effects of IFN-beta and IL-12 on STAT4 activation and cytokine induction in T cells. *J Leukoc Biol* 81: 1562-7. [[Link](#)]
211. Kress-Bennett JM, Ehrlich GD, Bruno A, Post JC, Hu FZ, Scott TF. 2011. Preliminary study: treatment with intramuscular interferon beta-1a results in increased levels of IL-12Rbeta2+ and decreased levels of IL23R+ CD4+ T - Lymphocytes in multiple sclerosis. *BMC Neurol* 11: 155. [[Link](#)]
212. Hecker M, Paap BK, Goertsches RH, Kandulski O, Fatum C, Koczan D, Hartung HP, Thiesen HJ, Zettl UK. 2011. Reassessment of blood gene expression markers for the prognosis of relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One* 6: e29648. [[Link](#)]
213. Baranzini SE, Mousavi P, Rio J, Caillier SJ, Stillman A, Villoslada P, Wyatt MM, Comabella M, Greller LD, Somogyi R, Montalban X, Oksenberg JR. 2005. Transcription-based prediction of response to IFNbeta using supervised computational methods. *PLoS Biol* 3: e2. [[Link](#)]
214. Baranzini SE, Madireddy LR, Cromer A, D'Antonio M, Lehr L, Beelke M, Farmer P, Battaglini M, Caillier SJ, Stromillo ML, De Stefano N, Monnet E, Cree BA. 2015. Prognostic biomarkers of IFNβ therapy in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 21: 894-904. [[Link](#)]
215. Cucci A, Barbero P, Clerico M, Ferrero B, Versino E, Contessa G, Demercanti S, Viglietta E, Di Liberto A, Vai AG, Durelli L. 2010. Pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA blood level in multiple sclerosis is related to treatment response and interferon-beta dose. *J Neuroimmunol* 226: 150-7. [[Link](#)]
216. Graber JJ, Ford D, Zhan M, Francis G, Panitch H, Dhib-Jalbut S. 2007. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlations with interferon dose and MRI response. *J Neuroimmunol* 185: 168-74. [[Link](#)]
217. van Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, van Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, Ader HJ, van Houwelingen JC, Barkhof F, Polman CH, Nagelkerken L. 1999. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 45: 695-703. [[Link](#)]
218. Hesse D, Krakauer M, Lund H, Sondergaard HB, Limborg SJ, Sorensen PS, Sellebjerg F. 2011. Disease protection and interleukin-10 induction by endogenous interferon-beta in multiple sclerosis? *Eur J Neurol* 18: 266-72. [[Link](#)]
219. de Andres C, Aristimuno C, de Las Heras V, Martinez-Gines ML, Bartolome M, Arroyo R, Navarro J, Gimenez-Roldan S, Fernandez-Cruz E, Sanchez-Ramon S. 2007. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 182: 204-11. [[Link](#)]
220. Korporeal M, Haas J, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Moeller S, Fritz B, Suri-Payer E, Wildemann B. 2008. Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in

- multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch Neurol* 65: 1434-9. [\[Link\]](#)
221. Reynolds BC, Turner DG, McPherson RC, Prendergast CT, Phelps RG, Turner NA, O'Connor RA, Anderton SM. 2014. Exposure to inflammatory cytokines selectively limits GM-CSF production by induced T regulatory cells. *Eur J Immunol* 44: 3342-52. [\[Link\]](#)
222. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907-10. [\[Link\]](#)
223. Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA. 2003. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 23: 513-22. [\[Link\]](#)
224. Drulovic J, Savic E, Pekmezovic T, Mesaros S, Stojkovic N, Dujmovic-Basuroski I, Kostic J, Vasic V, Mostarica Stojkovic M, Popadic D. 2009. Expression of Th1 and Th17 cytokines and transcription factors in multiple sclerosis patients: does baseline T-bet mRNA predict the response to interferon-beta treatment? *J Neuroimmunol* 215: 90-5. [\[Link\]](#)
225. Hartmann FJ, Khademi M, Aram J, Ammann S, Kockum I, Constantinescu C, Gran B, Piehl F, Olsson T, Codarri L, Becher B. 2014. Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nat Commun* 5: 5056. [\[Link\]](#)
226. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, Mari ER, Safavi F, Leist TP, Zhang GX, Rostami A. 2015. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN-beta Therapy. *J Immunol* 194: 5085-93. [\[Link\]](#)
227. Peelen E, Muris AH, Damoiseaux J, Knippenberg S, Broens K, Smolders J, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Thewissen M. 2015. GM-CSF production by CD4+ T cells in MS patients: regulation by regulatory T cells and vitamin D. *J Neuroimmunol* 280: 36-42. [\[Link\]](#)
228. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, Naves R, Han M, Zhong F, Castellanos JG, Mair R, Christakos A, Kolkowitz I, Katz L, Killestein J, Polman CH, de Waal Malefyt R, Steinman L, Raman C. 2010. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16: 406-12. [\[Link\]](#)
229. Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, Murai H, Kira J. 2013. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 8: e61835. [\[Link\]](#)
230. Constantinescu CS, Asher A, Fryze W, Kozubski W, Wagner F, Aram J, Tanasescu R, Korolkiewicz RP, Dirnberger-Hertweck M, Steidl S, Libretto SE, Sprenger T, Radue EW. 2015. Randomized phase 1b trial of MOR103, a human antibody to GM-CSF, in multiple sclerosis. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation* 2: e117. [\[Link\]](#)
231. Michalowska-Wender G, Losy J, Wender M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowak J. 2003. Effect of immunomodulatory treatment of multiple sclerosis on lymphocyte surface immunomarkers. *Pol J Pharmacol* 55: 877-80. [\[Link\]](#)
232. Blazevski J, Petkovic F, Momcilovic M, Jevtic B, Miljkovic D, Mostarica Stojkovic M. 2013. High interleukin-10 expression within the central nervous system may be important for initiation of recovery of Dark Agouti rats from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology* 218: 1192-9. [\[Link\]](#)
233. Bustamante MF, Rio J, Castro Z, Sanchez A, Montalban X, Comabella M. 2013. Cellular immune responses in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Clin Exp Immunol* 171: 243-6. [\[Link\]](#)
234. Balasa R, Bajko Z, Hutanu A. 2013. Serum levels of IL-17A in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon-beta. *Mult Scler* 19: 885-90. [\[Link\]](#)

235. Babaloo Z, Aliparasti MR, Babaiea F, Almasi S, Baradaran B, Farhoudi M. 2015. The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels. *Immunol Lett* 164: 76-80. [[Link](#)]
236. Bushnell SE, Zhao Z, Stebbins CC, Cadavid D, Buko AM, Whalley ET, Davis JA, Versage EM, Richert JR, Axtell RC, Steinman L, Medori R. 2012. Serum IL-17F does not predict poor response to IM IFNbeta-1a in relapsing-remitting MS. *Neurology* 79: 531-7. [[Link](#)]
237. Thamilarasan M, Koczan D, Hecker M, Paap B, Zettl UK. 2012. MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun Rev* 11: 174-9. [[Link](#)]
238. Witwer KW, Sisk JM, Gama L, Clements JE. 2010. MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J Immunol* 184: 2369-76. [[Link](#)]
239. Caldwell AB, Cheng Z, Vargas JD, Birnbaum HA, Hoffmann A. 2014. Network dynamics determine the autocrine and paracrine signaling functions of TNF. *Genes & Development* 28: 2120-33. [[Link](#)]
240. Seko Y, Cole S, Kasprzak W, Shapiro BA, Ragheb JA. 2006. The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 5: 299-305. [[Link](#)]
241. Jin W, Dong C. 2013. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect* 2: e60. [[Link](#)]
242. Keijsers RR, Joosten I, van Erp PE, Koenen HJ, van de Kerkhof PC. 2014. Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Exp Dermatol* 23: 799-803. [[Link](#)]
243. Metcalf D. 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood* 111: 485-91. [[Link](#)]
244. Griffin JD, Cannistra SA, Sullivan R, Demetri GD, Ernst TJ, Kanakura Y. 1990. The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. *Int J Cell Cloning* 8 Suppl 1: 35-44; discussion -5. [[Link](#)]
245. Hundeshagen A, Hecker M, Paap BK, Angerstein C, Kandulski O, Fatum C, Hartmann C, Koczan D, Thiesen H-J, Zettl UK. 2012. Elevated type I interferon-like activity in a subset of multiple sclerosis patients: molecular basis and clinical relevance. *Journal of Neuroinflammation* 9: 140-. [[Link](#)]
246. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Hussain MS, Nejad P, Patel B, Hei H, Khoury S, Quintana F, Kivisakk P, Chitnis T, Weiner HL. 2013. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 73: 729-40. [[Link](#)]
247. Achiron A, Gurevich M. 2009. Gender effects in relapsing-remitting multiple sclerosis: correlation between clinical variables and gene expression molecular pathways. *J Neurol Sci* 286: 47-53. [[Link](#)]
248. Charbit H, Benis A, Geysheis B, Karussis D, Petrou P, Vaknin-Dembinsky A, Lavon I. 2015. Sex-specific prediction of interferon beta therapy response in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 22: 986-9. [[Link](#)]

Dr Emina Milošević je rođena 15. 09. 1982. godine u Šapcu. Osnovnu školu je završila u Bogatiću, srednju školu u Šapcu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2001/2002. godine a diplomirala je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,69.

Doktorske studije smera Molekularna medicina upisala je 2007. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Za saradnika u nastavi za užu naučnu oblast imunologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu izabrana je 2009. godine, reizabrana 2010. godine, 2011. izabrana je za asistenta, i reizabrana u isto zvanje 2014. godine. Specijalizaciju iz imunologije je započela je školske 2009/2010. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a zvanje specijaliste imunologije stekla januara meseca 2014. godine položivši specijalistički ispit sa odličnom ocenom.

Od 2007-2010. godine bila je saradnik na projektu „Mehanizmi urođene i stečene imunosti u autoimunskim bolestima i infekciji“ (br. 145066, Ministarstvo nauke Srbije), rukovodilac prof. dr Marija Mostarica Stojković. Od 2011. angažovana je kao saradnik na projektu „Imunopatogenetski i regulatorni mehanizmi u autoimunskim bolestima i hroničnoj inflamaciji“ (br. 175038 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije), rukovodilac prof. dr Marija Mostarica Stojković do 1.10.2013. a zatim prof. dr Vera Pravica. Od 2010-2014. godine Bila je član je međunarodnog projekta u okviru COST akcije European Network for Translational Immunology Research and Education (ENTIRE): From immunomonitoring to personalized immunotherapy (BMBS COST Action BM0907). U okviru ove COST akcije usavršavala se u Laboratoriji za molekularnu imunodijagnostiku Instituta za imunologiju Univerzitetske bolnice u Hajdelbergu jula meseca 2013. godine. Autor je ili koautor 12 publikacija objavljenih u celini u časopisima indeksiranim u Institute of Science Index bazi podataka (SCI) i većeg broja saopštenja na kongresima u zemlji i inostranstvu.

10 Prilozi

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: Emina Milošević

broj upisa: 11-DS-MM-07

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Biomarkeri odgovora na terapiju interferonom- β kod bolesnika sa relapsno-remitentnom multiplom sklerozom

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.10.2015. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Emina Milošević

Broj upisa: 11-DS-MM-07

Studijski program: molekularna medicina

Naslov rada: Biomarkeri odgovora na terapiju interferonom- β kod bolesnika sa relapsno-remitentnom multiplom sklerozom

Mentor: prof. dr Dušan Popadić

Potpisani: Emina Milošević


izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.10.2015. godine



Prilog 3.**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Biomarkeri odgovora na terapiju interferonom- β kod bolesnika sa relapsno-remitentnom multiplom sklerozom

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.10.2015. godine

