

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.09.2015. godine, odluka broj 4600/16, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

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

kandidata dr Emine Milošević, zaposlene na Medicinskom fakultetu u Beogradu kao asistent na Katedri za imunologiju. Mentor je prof. dr Dušan Popadić, komentor je prof. dr Jelena Drulović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Marija Mostarica Stojković, profesor emeritus Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Dragana Lavrnić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dejan Baskić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Emine Milošević napisana je na 99 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 23 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak

na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **Uvodu** je definisanamultipla skleroza (MS) iforme MS. Navedena su shvatanja o imunopatogenezi MS sa osvrtom na eksperimentalni model eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis. Detaljno je opisana uloga pomoćničkih T-limfocita tipa 1 i 17 (Th1 i Th17) u imunopatogenezi MS uz poseban naglasak na ulozi citokina koje ove ćelije proizvode.

Navedeni su terapijski modaliteti za MS, a zatim je dat pregled literature o mehanizmima terapijskog dejstva interferona (IFN)- β kao prve terapijske linije u relapsno-remitentnoj (RR) formi MS, naročito delovanjem na ćelije imunskog sistema. Definisan je problem nepovoljnog kliničkog odgovora kod značajnog udela bolesnika sa RRMS, kao i potreba za pronalaženjem parametara koji bi predvideli neadekvatan terapijski tok.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u određivanju ekspresije na nivou iRNK gena za proinflamatorne i antiinflamatorne molekule kod bolesnika sa RRMS pre početka i tokom terapije sa IFN- β . Kao cilj rada navedeno je i utvrđivanje odnosa između nivoa ekspresije ispitivanih gena tokom praćenja pacijenata i njihovih demografskih parametara i kliničkih pokazatelja težine bolesti, kao i 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.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da su bolesnici sa RRMS lečeni 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. Studija je izvedena u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Precizno su navedeni način praćenja ispitanika, uzorkovanja krvi, terapijski protokol i kriterijumi uključivanja i isključivanja

iz studije. Detaljno je opisana metodologija ispitivanja genske ekspresije koja podrazumeva način izolacije RNK iz izdvojenih mononuklearnih ćelija periferne krvi i dalje određivanje genske ekspresije primenom PCR u realnom vremenu, kao i određivanje koncentracije citokina u plazmi primenom ELISA.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Dat je kritički osvrt na značaj dobijenih rezultata i mogućnost primene sličnih analiza u kliničkoj praksi radi praćenja odgovora na terapiju.

Zaključci sažeto i jasno prikazuju najvažnija saznanja koja su proistekla iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 248 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje je pokazalo da se tokom tri godine IFN- β terapije nivo ekspresije svih ispitivanih gena značajno menjao, što treba imati u vidu pri tumačenju rezultata studija preseka koje analiziraju gensku ekspresiju kod obolelih od MS. Genska ekspresija je merena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi za markere biološkog odgovora na IFN- β (MX1, OAS2), marker T-limfocita (CD3 ϵ), Th1/17- polarizujuće citokine (IL-12/23p40, IL-12p35, IL-23p19), odgovarajuće subjedinice receptora za ove citokine (IL-12R β 1, IL-12R β 2, IL-23R), opredeljujuće transkripcione faktore Th1, Th17 i regulatornih T limfocita (T-bet, ROR γ t, FoxP3), efektorske citokine (IFN- γ , IL-17A, IL-17F, GM-CSF, TNF, IL-10) kao i endogeni IFN- β pre početka IFN- β terapije i nakon 6, 12,

24 i 36 meseci trajanja terapije. Slična kinetika ekspresije kod pacijenata koji dobro odgovaraju na terapiju i kod pacijenata koji suboptimalno odgovaraju na terapiju nije omogućila razdvajanje ovih grupa. Interesantno je da je ekspresija iRNK mnogih gena međusobno korelirali pre početka terapije sa IFN- β , a manji broj je nastavio da koreliše u nekim od narednih vremenskih tačaka.

Zatim, IFN- β terapija nije statistički značajno uticala na koncentracije merenih proinflamatornih citokina (GM-CSF, IL-17A i IL-17F) u plazmi bolesnika sa RRMS. Nije nađena povezanost ekspresije iRNK, kao ni koncentracije citokina u plazmi sa kliničkim i demografskim parametrima bolesnika. Koncentracija citokina u plazmi nije korelirala sa sopstvenom iRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

Međutim, kada su podaci analizirani u zavisnosti od pojave relapsa, nađena je povezanost niže ekspresije $\beta 2$ subjedinice receptora za IL-12 (IL-12R $\beta 2$) sa višim rizikom za pojavu relapsa. Navedeni rezultati mogu biti od kliničkog značaja u smislu daljeg ispitivanja ekspresije IL-12R $\beta 2$ kao potencijalnog biomarkera kliničkog odgovora na terapiju sa IFN- $\beta 1b$ na većem broju bolesnika.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

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 pacijenata koji dobro i neadekvatno odgovaraju na terapiju. Generalno, ekspresija gena za citokine se retko povezivala sa odgovorom na terapiju. Od gena koji su analizirani u ovoj disertaciji IFN- γ , IL-10 i IL-12 $\beta 1$ su prethodno identifikovani kao prediktori (pojedinačno ili u kombinaciji) povoljnog terapijskog odgovora. U ovoj doktorskoj disertaciji takva povezanost nije potvrđena. Mogući razlozi su razlike u odnosu na grupu bolesnika i dizajn studije, trajanje praćenja i metodologiju.

IFN- β terapija je značajno menjala ekspresiju svih analiziranih gena tokom trogodišnjeg praćenja, ali nije bilo statistički značajne razlike ni za jedan od ispitivanih gena među pacijenatima koji dobro i neadekvatno odgovaraju na terapiju. 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 tretman T-ćelija zdravih donora interferonom- β povećava ekspresiju β 1 i β 2 subjedinice IL-12R, koju prati povećanje fosforilisanog STAT4 (pSTAT4) i indukcija antiinflamatornog citokina IL-10. 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 .

Među citokinima koje proizvode Th1 i Th17 ćelije, noviji podaci ukazuju da je za encefalitogenost ovih ćelija u modelu na životinjama neophodan GM-CSF. Na osnovu dostupne literature se zaključuje da je u ovoj disertaciji prvi put dugoročno analiziran obrazac ekspresije GM-CSF iRNK *ex vivo* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa RRMS primenom qPCR, kao i kinetika koncentracije GM-CSF proteina u plazmi. GM-CSF ekspresija u mononuklearnim ćelijama periferne krvi imala isti vremenski obrazac kod pacijenata koji dobro i neadekvatno odgovaraju na terapiju, 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 koncentracija GM-CSF u plazmi, kao ni razlike u koncentraciji kod pacijenata koji dobro i neadekvatno odgovaraju na terapiju. Studije preseka su našle povišene koncentracije GM-CSF tokom relapsa u likvoru, ali bez razlike u odnosu na druge neurološke bolesti. Diskrepanca sa rezultatima ove teze se može objasniti različitim dizajnom studije (korišćenjem likvora nasuprot krvnoj plazmi) i činjenicom da je za rezultate u tezi uzorkovanje obavljano kada je pacijent u remisiji da bi se izbegao uticaj glukokortikoida koji se daju kao terapija u relapsu.

Među pacijentima sa MS koji se leče sa IFN- β 2-40% razvije neutrališuća antitela na lek koja utiču na njegovu biološku raspoloživost. Iako je ograničenje ove studije bila

činjenica da nisu određivana neutrališuća antitela, slična ekspresija IFN- β -indukovanih gena MX1 i OAS2 kod pacijenata koji dobro i suboptimalno odgovaraju na terapiju sugerišu da biološka raspoloživost IFN- β nije značajno uticala na rezultate.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Milosevic E, Dujmovic I, Markovic M, Mesaros S, Rakocevic G, Drulovic J, MostaricaStojkovic M, Popadic D. 2015. **Higher expression of IL-12R β 2 is associated with lower risk of relapse in relapsing–remitting multiple sclerosis patients on interferon- β 1b therapy during 3-year follow-up.** *Journal of Neuroimmunology* 287: 64-70.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Biomarkeri odgovora na terapiju interferonom- β kod bolesnika sa relapsno-remitentnom multiplom sklerozom**“ dr Emine Milošević predstavlja originalni naučni doprinos razumevanju dejstva terapije IFN- β na gensku ekspresiju Th1/Th17 citokina, receptora za citokine i transkripcionih faktora za koje se pretpostavlja patogenetska uloga u MS. Prvi put je dugoročno analiziran obrazac ekspresije GM-CSF iRNK *ex vivo* u mononuklearim ćelijama periferne krvi RRMS pacijenata primenom qPCR, kao i kinetika nivoa GM-CSF proteina u plazmi, što može biti značajno za procenjivanje rezultata primene anti-GM-CSF antitela, koje je u fazi kliničkih ispitivanja za MS. Povezanost ekspresije IL-12R β 2 sa rizikom za pojavu relapsa ukazuje na potencijal IL-12R β 2 ekspresije kao biomarkera kliničkog odgovora na terapiju sa IFN- β 1b.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo

izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju drEmine Milošević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 12.10.2015.

Članovi Komisije:

Prof. dr Marija Mostarica Stojković

Prof. dr Dragana Lavrnić

Prof. dr Dejan Baskić

Mentor: Prof. dr Dušan Popadić

Komentor: Prof. dr Jelena Drulović
