

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Jasna Nekić

UTJECAJ POLIMORFIZAMA GENA AUTOIMUNOSNOG
ODGOVORA NA UČINKOVITOST IMUNOMODULACIJSKE
TERAPIJE INTERFERONOM- β I TIJEK MULTIPLE SKLEROZE

Doktorski rad

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Jasna Nekić

UTJECAJ POLIMORFIZAMA GENA AUTOIMUNOSNOG
ODGOVORA NA UČINKOVITOST IMUNOMODULACIJSKE
TERAPIJE INTERFERONOM- β I TIJEK MULTIPLE SKLEROZE

Doktorski rad

Mentorica: prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević,
dipl.sanit.ing.

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA
FACULTY OF MEDICINE

Jasna Nekić

INFLUENCE OF AUTOIMMUNE RESPONSE GENE
POLYMORPHISM ON THE EFFICACY OF
IMMUNOMODULATORY THERAPY WITH INTERFERON- β
AND THE COURSE OF MULTIPLE SCLEROSIS

DOCTORAL THESIS

Mentor: Prof. Nada Starčević Čizmarević, Ph D

Rijeka, 2026.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević, dipl. sanit. ing.

Doktorski rad obranjen je dana _____ 2026. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____ (titula, ime i prezime)

2. _____ (titula, ime i prezime)

3. _____ (titula, ime i prezime)

4. _____ (titula, ime i prezime)

5. _____ (titula, ime i prezime)

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

1. PREDGOVOR

Rad je izrađen na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci, Sveučilišta u Rijeci pod mentorstvom prof. dr. sc. Nade Starčević Čizmarević, dipl. sanit. ing. u sklopu znanstveno-istraživačkih projekata „Farmakogenetika multiple skleroze: odgovor na imunomodulacijsku terapiju“. (Uniri-biomed-18-137) i „Utjecaj gena autoimunskog odgovora na učinkovitost imunomodulacijske terapije interferonom beta u multiploj sklerozi“. (MedRi potpora-100.24.0004.).

ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Nadi Starčević Čizmarević na pruženoj prilici da budem dio njenog istraživačkog tima, prijenosu znanja i otvaranju novih svjetova.

Veliko hvala Ivani Stanković Matić, dr. med. na nesebičnom dijeljenju znanja i vještina, sretna sam da me dotakla tvoja iskričava genijalnost kojom zračiš.

Hvala Ivani Pleša, med. lab. ing. i cijelom laboratoriju na pomoći u laboratorijskom dijelu rada.

Posebno se zahvaljujem umirovljenoj prof. dr. sc. Smiljani Ristić na stručnim savjetima i intervencijama u vremenima kada nije sve išlo glatko.

Hvala prof. dr. sc. Borutu Peterlinu i njegovim suradnicima iz Kliničkog instituta za medicinsku genetiku u Ljubljani koji su u suradnji sa Zavodom za biologiju i medicinsku genetiku prikupili bazu DNA na kojoj je istraživanje provedeno.

Svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku, neizmjereno hvala što mi je svaki dolazak na Zavod bio bez napetosti te u potpunosti lišen osjećaja nepripadanja.

Na samom kraju hvala mojoj obitelji na strpljenju, podršci i ljubavi.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Budući da je multipla skleroza (MS) poligenetska bolest, a interferon beta (IFN- β) plejotropan agens, osnovni cilj bio je utvrditi postoji li povezanost polimorfizama gena autoimunskog odgovora *CCR5* (rs333), *CTLA4* (rs231775, rs3087243) i *TNFR10A* (rs20576) s odgovorom na IFN- β te ima li specifičnih spolnih razlika u genetičkoj pozadini djelotvornosti terapije.

Ispitanici i metode: U istraživanju je provedena genotipizacija metodama lančane reakcije polimerazom (PCR)/PCR-polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata/ Real-time PCR na 295 uzoraka genomske DNA izolirane iz limfocita krvi MS bolesnika (230 žena i 65 muškaraca) sa klinički sigurnom MS prema McDonaldovim kriterijima i relapsno remitirajućim početkom. Prema kriterijima učinkovitosti terapije bolesnici su podijeljeni u skupine s pozitivnim (N=173) i bez odgovora (N=122) na terapiju IFN- β .

Rezultati istraživanja: Nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u distribuciji alela i genotipova +49 A/G i CT60 A/G *CTLA4*, $\Delta 32$ u *CCR5* i *TNFRSF10A* rs20576 gena između bolesnika s pozitivnim i onih bez odgovora na terapiju IFN- β . Utvrđena je značajno veća (42,1%) učestalost *CTLA4* +49 AA genotipa u žena s pozitivnim odgovorom na terapiju nego u bolesnica bez odgovora na terapiju (28,9%, OR=1,79, $p=0,039$), a kodominantni genetički model AA vs. AG pokazao je statističku značajnost ($p=0,042$), kao i kombinacije ovog s CT60 AG ($p=0,011$) i *CCR5* wt/wt genotipom ($p=0,025$). Također, genotip *CTLA-4* +49 AA značajno predviđa pozitivan odgovor na terapiju u žena ($p=0,011$) i pridonosi 4,5% varijabilnosti odgovora. Isti AA genotip u kombinaciji CT60 AG i s *TNFRSF10A* AA povezan je s pozitivnim odgovorom na terapiju u MS bolesnika ($p=0,005$ i $p=0,046$). U skupini muških bolesnika *TNFRSF10A* rs20576 AA povezan je s povoljnim ($p=0,044$) odgovorom na terapiju.

Zaključak: U ukupnom uzorku MS bolesnika polimorfizmi *CTLA4* +49 A/G i CT60 A/G, *CCR5*- $\Delta 32$ i *TNFRSF10A* rs20576, pojedinačno ili u kombinaciji, ne doprinose značajno odgovoru na terapiju IFN- β . Međutim, nakon stratifikacije prema spolu, genotip *CTLA4* +49 AA pokazao se prediktorom povoljnog odgovora u na liječenje IFN- β u MS bolesnica, što ukazuje na važnost terapijskog pristupa MS ovisno o spolu.

Ključne riječi: CC kemokinski receptor 5; Interferon beta; Imunomodulacijska terapija; Multipla skleroza; Polimorfizam, genski; Protein 4 vezan uz citotoksični limfocit T; Receptor 10A čimbenika nekroze tumora

SUMMARY

Objectives: Considering that multiple sclerosis (MS) is a polygenic disease and interferon beta (IFN- β) a pleiotropic agent, the main objective of this research was to determine whether there is an association between polymorphisms of autoimmunity-related genes *CCR5* (rs333), *CTLA4* (rs231775, rs3087243) and *TNFR10A* (rs20576) with the therapeutic response to IFN- β and to assess possible sex-specific genetic differences in treatment efficacy.

Patients and Methods: A molecular-genetic analysis was performed using polymerase chain reaction (PCR), PCR-restriction fragment length polymorphism, and Real-time PCR methods on 295 genomic DNA samples from MS patients (230 females and 65 males) clinically diagnosed (McDonald criteria) with relapsing-remitting MS. According to the therapeutic response to IFN- β , patients were categorized into responders (n=173) and non-responders (n=122) based on established clinical efficacy criteria.

Results: There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) in the distribution of alleles and genotypes of *CTLA4* +49 A/G and CT60 A/G, *CCR5*- Δ 32, and *TNFRSF10A* rs20576 between responder and non-responder groups. However, a significantly higher frequency (42.1%) of the *CTLA4* +49 AA genotype was observed in females with a positive therapeutic response (28.9%, OR=1.79, $p=0.039$). The codominant genetic model (AA vs. AG) was statistically significant ($p=0.042$), as well as combinations of this genotype with CT60 AG ($p=0.011$) and *CCR5* wt/wt ($p=0.025$). Moreover, the *CTLA4* +49 AA genotype significantly predicted a favorable response in women ($p=0.011$), and contributed to 4.5% of response variability. The same AA genotype, in combination with CT60 AG and *TNFRSF10A* AA, was associated with a positive therapeutic outcome in all patients ($p=0.005$ and $p=0.046$, respectively). In the smaller male subgroup, *TNFRSF10A* rs20576 AA was associated with a favorable response to therapy ($p=0.044$).

Conclusion: In the overall MS patient sample, *CTLA4* +49 A/G and CT60 A/G, *CCR5*- Δ 32, and *TNFRSF10A* rs20576 polymorphisms, individually or in combination, do not significantly influence the therapeutic response to IFN- β . However, after stratification by sex, the *CTLA4* +49 AA genotype emerged as a predictor of favorable therapeutic response in women indicating the importance of a gender-specific therapeutic approach to MS.

Keywords: CC chemokine receptor 5; Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; Genetic polymorphism; Immunomodulatory therapy; Interferon beta; Multiple sclerosis; Tumor necrosis factor receptor 10A.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1. Epidemiologija multiple skleroze	1
1.2. Etiologija i patogeneza multiple skleroze.....	2
1.3. Klinička slika i tijek multiple skleroze	5
1.4. Dijagnostika i praćenje multiple skleroze.....	7
1.5. Liječenje multiple skleroze	11
1.5.1. Liječenje akutnog relapsa.....	11
1.5.2. Liječenje koje modificira tijek bolesti.....	11
1.5.3. Simptomatska i potporna terapija u multiploj sklerozi	18
1.6. Genetika multiple skleroze	18
1.6.1. Genetički čimbenici u multiploj sklerozi.....	18
1.6.2. <i>CTLA4</i> gen	21
1.6.3. <i>CCR5</i> gen	22
1.6.4. <i>TNFRSF10A</i> gen	23
1.6.4. <i>CCR5</i> , <i>CTLA4</i> i <i>TNFRSF10A</i> geni u etiopatogenezi multiple skleroze i odgovoru na imunomodulacijsku terapiju.....	24
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	27
3. ISPITANICI I METODE	28
3.1. Vrsta istraživanja, ispitanici i prikupljanje materijala	28
3.2. Metode.....	29
3.2.1. Molekularno-genetička analiza	29
3.2.1.1. Analiza polimorfizma $\Delta 32$ <i>CCR5</i> gena	30
3.2.1.2. Analiza polimorfizama <i>CTLA4</i> gena	32
3.2.1.3. Analiza polimorfizma <i>TNFRSF10A</i> gena	35
3.3. Etički aspekti istraživanja	37
3.4. Statistička obrada podataka	37
4. REZULTATI	39
4.1. Kliničke karakteristike bolesnika i odgovor na terapiju IFN- β	39
4.2. Utjecaj <i>CCR5</i> gena u odgovoru na terapiju IFN- β	41
4.3. Utjecaj <i>CTLA4</i> gena u odgovoru na terapiju IFN- β	45
4.3.1. <i>CTLA4</i> +49 A/G polimorfizam (rs231775).....	45
4.3.2. <i>CTLA4</i> CT60 A/G polimorfizam (rs3087243).....	50
4.3.3. Međudjelovanje +49 i CT60 polimorfizama <i>CTLA4</i> gena	54
4.4. Utjecaj <i>TNFRSF10A</i> gena u odgovoru na terapiju IFN- β	56
4.5. Međudjelovanje <i>CCR5</i> , <i>CTLA4</i> i <i>TNFRSF10A</i> gena u odgovoru na terapiju IFN- β 61	
5. RASPRAVA	70
6. ZAKLJUČCI.....	81

LITERATURA	83
Popis slika	97
Popis tablica	97
POPIS POKRATA.....	101
ŽIVOTOPIS	103

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Mutipla skleroza (MS) je kronična, upalna, autoimunosna i neurodegenerativna bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS). Razvija se u genetički predisponiranih osoba potaknuta okolišnim čimbenicima, češće u žena, u dobi između 20. i 40. godine i vodeći je uzrok netraumatske neurološke onesposobljenosti u mladim odraslim osoba.

Od vremena Jeana Charcota, koji je 1868. godine tijekom serije predavanja o do tada nepoznatim stanjima i neprepoznatim bolestima prvi opisao karakteristične lezije u leđnoj moždini i skovao naziv *sclerose en plaque* dajući ime onomu što i danas zovemo multiplom sklerozom, do danas, provedena su brojna istraživanja, koja su doprinijela razumijevanju ove složene bolesti, među kojima su i istraživanja gena.

MS je posredovana odgovorom imunskog sustava protiv antigena SŽS-a. Upalne stanice kroz oštećenu krvno-moždanu barijeru (KMB) infiltriraju SŽS. Aktivirani limfociti T izlučuju upalne posrednike (kemokine i citokine) i potiču kaskadu upale pri kojoj dolazi do oštećenja oligodendrocita, destrukcije mijelinskih ovojnica i oštećenja aksona te formiranja plakova u bijeloj tvari mozga i kraljezničke moždine [1]

Bolest nije u potpunosti izlječiva, no tijek bolesti je izmjenjiv lijekovima koji su razvijeni posljednjih tridesetak godina i modificiraju tijek bolesti (engl. *Disease modifying therapy* – DMT).

1.1. Epidemiologija multiple skleroze

Incidencija MS-a raste i procjenjuje se da je u svijetu oko 2,9 milijuna oboljelih te da je globalna prevalencija 36 na 100.000 stanovnika, a incidencija 2,1 na 100.000 stanovnika godišnje [2]. U posljednjih 15 godina zabilježen je porast broja oboljelih za gotovo milijun, što se povezuje s boljom dijagnostikom, duljim preživljenjem i napretkom u liječenju, ali i s mogućim stvarnim porastom incidencije [3]. U europskim zemljama bilježi se najveće opterećenje MS-om, s prosječnom prevalencijom od 133–137 na 100.000 stanovnika i incidencijom od 6–7 na 100.000 stanovnika godišnje [2]. Procjenjuje se da se u svijetu svakih pet minuta registrira jedna novooboljela osoba s MS-om.

U Republici Hrvatskoj od MS-a boluje oko 6500 bolesnika te je prevalencija bolesti oko 145 na 100.000 stanovnika što nas svrstava u zemlje s visokom prevalencijom, uz više od 6000 registriranih oboljelih, od čega 72% su žene [4].

Neravnomjerna rasprostranjenost MS-a u svijetu poznata je više desetljeća i dijelom je posljedica genetičkih i etničkih varijacija u svjetskoj populaciji. Općenito, prevalencija MS raste s udaljavanjem od ekvatora prema polovima i češća je u zemljama koje su smještene između 40. i 65. stupnja sjeverne geografske širine, rijetka je u tropima i na Dalekom istoku [5], pri čemu su opisane zone visokog, srednjeg i niskog rizika za oboljevanje od MS-a. Iako i dalje postoji opisani gradijent prevalencije MS-a, danas razlike nisu toliko izražene, moguće zbog bolje i ujednačenije dijagnostike MS-a. Nadalje, MS je značajno češći kod žena nego kod muškaraca te su one zastupljene više od 70% i u incidenciji i u prevalenciji oboljelih [3].

1.2. Etiologija i patogeneza multiple skleroze

Etiologija MS-a nije u potpunosti razjašnjena, no istraživanja ukazuju da bolest nastaje kao rezultat međudjelovanja genetske predispozicije i okolišnih čimbenika tijekom razvoja i rane odrasle dobi. Među čimbenicima okoliša ističu se nedostatak vitamina D, sezonski čimbenici rođenja, pušenje duhana te izloženost Epstein–Barr virusu (EBV) [6].

Temeljni patološki procesi u MS-u su upala, demijelinizacija, oštećenje aksona i neurodegeneracija. Demijelinizirani plak je osnovna patohistološka lezija u SZS-a karakteristična za MS. Nastaje kao posljedica infiltracije perivaskularnih prostora mononuklearnim stanicama, pretežito limfocitima T i B, koje prodiru u okolnu bijelu tvar, zahvaćajući određena, pojedinačna mjesta u SZS-u, pri čemu lokalizacija lezija određuje kako će se bolest klinički očitovati.

Pretpostavlja se da je za nastanak bolesti potrebno međudjelovanje imunoloških i neurodegeneracijskih mehanizama koji se odvijaju istovremeno. Što točno pokreće nastanak bolesti nije utvrđeno. Prema jednoj teoriji, MS je potaknuta abnormalnim imunološkim odgovorom na vlastite mijelinske antigene te se imunostani sustav, pod utjecajem genetičkih i okolišnih čimbenika (EBV, vitamin D, pušenje) aktivira na periferiji, zatim prolaze narušenom KMB i započinju autoimunosni napad na mijelin i

oligodendrocite. Ova teorija podupirana je nalaskom limfocita T i B, kao i upalnih citokina, u aktivnim MS lezijama, i činjenicom da su imunomodulacijske terapije iznimno učinkovite u ranim, upalnim fazama bolesti. Prema drugoj se teoriji pretpostavlja da je primarno zbivanje neurodegeneracija, odnosno metabolička i mitohondrijska disfunkcija oligodendrocita i aksona, što vodi ka spontanoj razgradnji mijelina, a tek sekundarno, izloženi mijelinski proteini potiču imunosti sustav i izazivaju autoimuni odgovor. Ova je hipoteza podržana nalazima koji ukazuju da su aksonalno oštećenje i mitohondrijske promjene prisutne i prije pojave klasične upale [6,7].

Temeljni principi autoimunosti, odnosno gubitak periferne imunološke tolerancije, važni su za razvoj MS-a. Studije provedene na mišjem modelu MS-a, eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu (EAE), potvrdile su središnju ulogu CD4+ limfocita T koji fiziološki prepoznaju strane antigene koje prezentiraju antigen predodne stanice (engl. *Antigen presenting cells* – APC), putem molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti klase II (engl. *Major histocompatibility complex* – MHC II) ekvivalent kojega je u čovjeka sustav humanih leukocitnih antigena (engl. *Human leukocyte antigen* – HLA). U MS-u se CD4+ limfociti T aktiviraju i prema vlastitim antigenima mijelina poput osnovnog proteina mijelina (engl. *Myelin basic protein* – MBP), proteolipidnog proteina (engl. *Proteolipid protein* – PLP) i mijelinskog oligodendrocitnog glikoproteina (engl. *Myelin oligodendrocyte glycoprotein* – MOG). Nakon aktivacije u perifernim limfnim čvorovima CD4+ limfociti T prolaze kroz oštećenu KMB, ulaze u SŽS i započinju kaskadu upale, izlučuju citokine koji usmjeravaju i pojačavaju imunološki odgovor te aktiviraju drugih stanica uključujući mikrogliju, makrofage, citotoksične CD8+ limfocite T i limfocite B [8,9]. Oslobođanje posrednika upale, slobodnih radikala i enzima dovodi do oštećenja mijelinskih ovojnica i aksona neurona. Oštećenje mijelina pokreće aktivaciju oligodendrocitnih prekursora, koji migriraju na mjesto ozljede i diferenciraju se u zrele oligodendrocite te se pokreće nepotpuna reparacija mijelina. Međutim, u kroničnim MS lezijama taj proces zakazuje zbog upalnog okruženja, astrocitnih ožiljaka i stanične iscrpljenosti.

Među različitim podtipovima CD4+ limfocita T ističu se proupalni pomagački T limfociti (engl. *T helper cells* – Th) tipa 1 koje izlučuju interferon-gama (IFN- γ) i tumorski nekrotizirajući faktor alfa (TNF- α) te Th17 stanice koje izlučuju interleukin (IL)-17 i IL-22 te povećavaju propusnost KMB i omogućuju regrutaciju dodatnih imunoloških stanica u SŽS. Nasuprot tome zaštitnu ulogu imaju Th tipa 2 koje izlučuju protuupalne

citokine, poput IL-4, IL-10 i IL-13, i suprimiraju aktivnost Th1 i Th17 stanica. Još važniju ulogu imaju regulacijski limfociti T (Treg), fenotipa CD4+CD25+FoxP3+, koji održavaju imunološku toleranciju, a čiji broj i funkcijska sposobnost u MS-u je smanjen [10].

Limfociti B također igraju značajnu ulogu te djeluju kao APC koje, koristeći molekule MHC II, prezentiraju antigene limfocitima T. Nadalje, izlučuju proupalne (IL-6, TNF- α) ili protuupalne (IL-10) citokine. Aktivirani limfociti B proizvode antitijela protiv mijelinskih proteina što dodatno pridonosi demijelinizaciji i oštećenju aksona. U aktivnim MS lezijama pronađene su plazma-stanice i limfociti B u različitim stupnjevima diferencijacije, što potvrđuje njihovu trajnu prisutnost i aktivnost unutar SŽS-a [11].

U kasnijim fazama bolesti, unutar moždanih ovojnica formiraju se ektopični limfoidni folikuli, građeni od limfocita B i T, plazma-stanica te folikularnih dendritičkih stanica i građom su slični limfnim čvorovima, predstavljaju trajna žarišta autoimunosne aktivnosti i doprinose kroničnoj upali i oštećenju. Regulacijski limfociti B (Breg) imaju protektivnu i imunomodulacijsku ulogu, također izlučuju IL-10, IL-35 i transformirajući čimbenik rasta- beta (engl. *Transforming Growth Factor-beta* – TGF- β) i inhibiraju aktivnost Th1 i Th17. Neravnoteža između djelovanja Th1/Th17 i Th2/Treg citokinskih profila smatra se osnovnim imunološkim obilježjem MS-a [12].

Mitohondrijska disfunkcija prepoznata je kao mehanizam važan za napredovanje MS-a i neurodegeneraciju. U demijeliniziranim aksonima potreba za energijom naglo raste jer se impuls mora provoditi duž oštećene membrane, bez izolacijskog sloja mijelina, te narušavanje funkcije mitohondrija dovodi do energetske iscrpljenosti aksona, porasta oksidativnog stresa i posljedične degeneracije [13].

Koncept imunološke privilegije SŽS-a zasniva se na mehanizmima koji ograničavaju pristup stanicama imunskog sustava, kako bi se neuroni zaštitili od upalnog oštećenja, čemu doprinosi intaktna KMB, smanjena ekspresija adhezijskih molekula te odsutnost klasične limfne drenaže. Istraživanja dokazuju kako SŽS nije potpuno imunološki izoliran, već da postoji dinamična suradnja s imunskim sustavom putem odvoda likvora kroz moždane ovojnice i uz prisutnost imunoregulacijskih peptida što pridonosi održanju suptilnog nadzora antigena i održavanju tolerancije [14].

MS više se ne poima isključivo kao bolest bijele tvari jer su osim fokalnih demijelinizacijskih lezija zamijećene i difuzne promjene u bijeloj i sivoj tvari koje pridonose gubitku aksona, atrofiji mozga i progresiji invaliditeta.

Prema dvostrukom konceptu patogeneze, MS se opisuje kao bifazična bolest. Početnu, upalnu i djelomično reverzibilnu fazu obilježava demijelinizacija uz mogućnost remijelinizacije, dok progresivnu fazu karakteriziraju ireverzibilni gubitak aksona i neurodegeneracija.

1.3. Klinička slika i tijek multiple skleroze

Klinička slika MS-a vrlo je varijabilna, a simptom može biti bilo koji simptom oštećenja SŽS-a, ovisno o lokalizaciji lezije. Neki od češćih simptoma MS-a uključuju: smetnje vida, motoričke i senzorne deficite u vidu parestezija, poremećaj ravnoteže i koordinacije, umor, tremor, spastičnost, poremećaje mokrenja, seksualnu disfunkciju, kognitivne i emocionalne promjene. Tijek bolesti u svake osobe je individualan, a na osnovi kliničkih simptoma i radioloških obilježja razlikuje se nekoliko tipičnih kliničkih fenotipova MS-a.

Klinički izolirani sindrom (engl. *Clinically isolated syndrom* – CIS) je prva klinička prezentacija koja je posljedica upalnoga demijelinizacijskoga poremećaja SŽS-a. Tri su tipične kliničke prezentacije optički neuritis, inkompletni transverzni mijelitis sa simptomima gubitka motorike, osjeta i autonomne funkcije ispod razine oštećenja te simptomi od strane moždanoga debla i maloga mozga kao što su dvoslike, poremećaj ravnoteže i vrtoglavica. Osim monofokalnih prezentacija CIS se može, iako rjeđe, prezentirati i multifokalno, kad je zahvaćeno više od jednoga dijela SŽS-a.

Prije pojave jasnih kliničkih simptoma, u nekih se osoba pronađu, kao slučajan nalaz oslikavanja magnetskom rezonancom (MR), tipične demijelinizacijske lezije, no bez kliničkih očitovanja bolesti, što se naziva radiološki izoliranim sindromom (RIS).

Godinama prije postavljanja dijagnoze, pojedinci mogu doživjeti privremena razdoblja neuroinflamatorne aktivnosti koja ne dosežu ni klinički niti dijagnostički prag. Klinički vidljivu upalu SŽS-a koja se može dijagnosticirati naziva se relapsom koji prema jačini onesposobljivanja može biti blag, srednje težak i težak te simptomatski ili asimptomatski. Simptomatski relaps je novi simptom ili pogoršanje postojećeg u trajanju od minimalno 24 sata do nekoliko dana ili tjedana, uz uvjet da je od prethodne egzacerbacije prošlo najmanje mjesec dana. Nastanak novih lezija utvrđenih slikovnim metodama, uz odsustvo simptoma odlika je asimptomatskog relapsa. Remisija MS-a

je faza oporavka od relapsa te odsustvo daljnje progresije simptoma ili potpuno ublažavanje simptoma unutar 3-6 mjeseci. Pseudorelaps je odraz nepotpunog oporavka od ranije atake uz povratak simptoma koji su bili prisutni u posljednjem napadaju, najčešće potaknut vanjskim čimbenikom poput infekcije. Nepovratno oštećenje neurološke funkcije tijekom vremena smatra se progresijom. Aktivna bolest se definira pojavom novih simptomatskih ataka ili drugim dokazima utvrđenom aktivnom bolesti.

Prema kliničkom tijeku su Lubin i suradnici 1996. g definirali četiri oblika MS-a: relapsno-remitirajuća MS (RRMS), primarno progresivna MS (PPMS), sekundarno progresivna MS (SPMS) i progresivno-relapsirajuća MS (PRMS). Najčešći fenotip je RRMS kojeg odlikuju epizode akutnog pogoršanja nakon kojih slijedi oporavak, bez vidljive progresije bolesti između pojedinačnih relapsa. SPMS karakterizira kontinuirano povećanje neurološke onesposobljenosti sa ili bez relapsa i smatra se krajnjim stadijem RRMS-a. PPMS odlikuje postupno pogoršanje neuroloških simptoma od samog početka bolesti i kontinuirano pogoršanje onesposobljenosti. Najrjeđi od kliničkih oblika je PRMS, u kojemu su od početka prisutni akutni relapsi i kontinuirano pogoršanje onesposobljenosti [15]. Sve veća dostupnost MR i razvoj biomarkera rezultirali su uključivanjem aktivnosti bolesti u karakterizaciju kliničkog tijeka te je predložena nova podjela. Osnovnim podtipovima RRMS-a i progresivnog MS-a kao modifikatori su dodani klinička aktivnost bolesti i aktivne lezije na MR-u [16]. CIS se smatra dijelom spektra RRMS fenotipova, nadalje PPMS dijelom spektra progresivne bolesti, a PRMS fenotip PPMS s aktivnošću. Klinički fenotipovi nisu različite kategorije bolesti već predstavljaju različite stadije unutar kontinuuma bolesti MS-a [16].

U trenutku postavljanja dijagnoze većina bolesnika se prezentira kao RRMS, a oko 10-15% bolesnika je s PPMS-a. U spektru progresivne bolesti vodeći mehanizam je neurodegeneracija odnosno aksonalna degeneracija i atrofija mozga. Promjena dijagnoze često je retrospektivna jer je teško odrediti trenutak u kojemu relapsni oblik prelazi u sekundarno progresivni. Studijama prirodnog tijeka bolesti utvrđeno je da RRMS prelazi u SPMS nakon 10 godina kod 10%, nakon 20 godina kod 50% te nakon 30 godina kod 93% oboljelih, a medijansko vrijeme od prvog relapsa do razvoja SPMS-a iznosi približno 20 godina (raspon 1–51 godina) [17].

Suvremena istraživanja pokazala su da u mnogih bolesnika postoji tihi, kontinuirani gubitak funkcije koji napreduje neovisno o pojavi relapsa odnosno

progresija neovisna o relapsima (engl. *Progression independent of relapse activity – PIRA*) te je neurološko pogoršanje moguće i u razdobljima kliničke stabilnosti i kada nema novih relapsa ni utvrđenih novonastalih aktivnih lezija. To potvrđuje da se neurodegeneracija odvija od samog početka bolesti i smatra se da je “tiha” progresija uzrokovana postupnim gubitkom aksona i atrofijom sive tvari [18]. Studije RRMS-a i SPMS-a koje su bile dugog trajanja, pokazale su da se više od 50% progresije onesposobljenosti događa neovisno o relapsima [19], što je dodatno potvrđeno i radiološkim studijama, kojima su utvrđene promjene u korteksu i dubokoj sivoj tvari uz odsutnost nove upalne aktivnosti [20]. Prepoznavanje PIRA koncepta mijenja pristupe liječenju kojemu cilj više nije samo spriječiti relapse, već i usporiti tihu progresiju.

Čimbenici povezani s povoljnijim ishodima MS-a uključuju ženski spol, mlađu dob na početku bolesti, zahvaćenost vidnog živca ili senzorne simptome pri prvom relapsu te potpun oporavak nakon njega dok je nepovoljni tijek povezan s muškim spolom, starijom dobi na početku bolesti i ranom pojavom motoričkih simptoma ili cerebelarne disfunkcije. Nadalje je utvrđeno da se upalna aktivnost bolesti i broj relapsa s vremenom smanjuje, dok neurodegenerativna komponenta postaje dominantna. Ovi su nalazi bili ključni za razumijevanje da se ireverzibilno oštećenje aksona događa već u ranim fazama bolesti [16].

1.4. Dijagnostika i praćenje multiple skleroze

Dijagnoza MS-a se postavlja kombiniranjem kliničkih, slikovnih i laboratorijskih nalaza uz isključivanje drugih bolesti koje se mogu slično prezentirati. Postavlja se prema McDonaldovim kriterijima [21,22], koji zahtijevaju dokaz o širenju lezija u prostoru, odnosno postojanje više lezija u različitim dijelovima SŽS-a (engl. *Dissemination in space – DIS*), koje su nastale u različito vrijeme (engl. *Dissemination in time – DIT*). Glavna dijagnostička metoda je MR, uz potporne nalaze oligoklonalnih vrpca (engl. *Oligoclonal bands – OCB*) u cerebrospinalnom likvoru (CSL) i evociranim potencijalima (EP).

MR je zlatni standard u dijagnostici MS-a koji omogućuje neinvazivno te vrlo osjetljivo otkrivanje demijelinizacijskih lezija u SŽS-u [23]. Zahvaljujući visokoj prostornoj rezoluciji ove metode se već malene promjene mogu utvrditi znatno prije

pojave kliničkih simptoma, što osigurava rano dijagnosticiranje, dok serijsko oslikavanje omogućuje i praćenje bolesti. DIS se dokazuje nalazom T2-hiperintenzivnih lezija u najmanje dvije od pet tipičnih definiranih anatomskih regija SŽS-a: periventrikularno, kortikalno/jukstakortikalno, infratentorijalno, u leđnoj moždini i optičkom živcu. DIT se potvrđuje nalaskom lezija koje se pojačavaju nakon primjene kontrastnog sredstva gadolijija (Gd) i koje predstavljaju aktivne lezije, uz prisustvo lezija koje se ne pojačavaju kontrastom (Gd-) ili utvrđivanjem novih lezija na kontrolnom pregledu. Tipične lezije u MS-u su ovalne, jasno ograničene, lokalizirane uz vene i ako su svježije, aktivne lezije pojačavaju se s kontrastom što je odraz narušenosti KMB-a. MR-om se kvantificira atrofija sive i bijele tvari, važna u procjeni neurodegenerativne komponente bolesti, a MR tehnike poput FLAIR, 3D sekvenci, DTI i magnetizacijskog transfera pružaju jasniji uvid u promjene mikrostrukture te omogućuju diferencijalnu dijagnostiku [24].

Oligoklonalne vrpce su specifični imunoglobulini G (IgG) prisutni u CSL-u bolesnika s MS-om i rezultat su intratekalne sinteze protutijela unutar SŽS, čija detekcija je najvažniji laboratorijski pokazatelj intratekalne imunološke aktivnosti, odraz aktivnosti limfocita B i plazma stanica unutar SŽS, a utvrđuju se usporedbom uzoraka CSL i seruma istog bolesnika. Rezultat se smatra pozitivnim kada se u CSL-u detektiraju jedinstvene IgG trake koje nisu prisutne u serumu te imaju visoku dijagnostičku vrijednost i prisutne su u oko 90–95% bolesnika s klinički potvrđenim MS-om [25]. Bolesnici s CIS-om i pozitivnim OCB-om imaju znatno veći rizik konverzije u MS.

EP omogućuju objektivno mjerenje brzine i učinkovitosti prijenosa živčanih impulsa kroz različite senzorimotorne putove, neinvazivna su i vrlo osjetljiva metoda za otkrivanje supkliničkih oštećenja i lezija koje nisu utvrdive klinički ni radiološki, čime se može dokazati DIS, a utvrđuju bioelektrične odgovore mozga na specifičnu vanjsku stimulaciju. Vidni evocirani potencijali (VEP) metoda su ispitivanja funkcije vidnog puta od mrežnice do okcipitalnog korteksa, a oštećenje mijelina u vidnom živcu, odnosno optički neuritis, uzrokuje produženje latencije P100 vala, što je najkarakterističniji nalaz u MS-u. Somatosenzorni evocirani potencijali (SSEP) služe za procjenu vodljivosti aferentnih osjetnih putova kroz leđnu moždinu i mozak te produljene latencije ukazuje na demijelinizaciju u osjetnim putovima, često i prije pojave kliničkih simptoma.

Slušnim evociranim potencijalima moždanog debla (engl. *Brainstem Auditory Evoked Potentials* – BAEP) utvrđuje se integritet slušnih puteva u moždanom deblu [26].

Značajan biljeg aktivnog neuroaksonalnog oštećenja je nalaz lakih lanaca neurofilamenata (engl. *Neurofilament Light chain* – NfL) u serumu i likvoru. Razine NfL-a posebno su povišene za vrijeme aktivne bolesti, a smanjuju se učinkovitim liječenjem. Oni ne samo da omogućuju ranu dijagnozu i procjenu terapijskog odgovora, već i potvrđuju da je neurodegeneracija prisutna već u ranim fazama MS-a [27]. U revidiranim McDonaldovim kriterijima iz 2024. godine naglašena je njihova važnost u MS-u te su dodani kao potporni biljeg za ranu dijagnostiku MS [22].

Praćenje bolesnika temelji se na kliničkim, radiološkim i laboratorijskim nalazima. Klinički se procjenjuje učestalost relapsa, neurološki deficiti i svakodnevno funkcioniranje. U tu se svrhu koristi proširena skala statusa onesposobljenosti (engl. *Expanded Disability Status Scale* – EDSS) koju je razvio Kurtzke 1983. godine i od tada je standardni alat korišten u kliničkoj praksi, istraživanjima te procjeni učinkovitosti lijekova. EDSS ima raspon od 0 do 10 u koracima od 0,5 jedinica. Vrijednost 0 označava normalan neurološki pregled, a vrijednost 10 smrt od MS-a. Ukupni rezultat proizlazi iz nelinearnog zbroja rezultata procjene svakog pojedinačnog funkcijskog sustava [28]. Standardnim neurološkim pregledom ocjenjuje se 7 funkcionalnih sustava (plus „ostali“) i zajedno sa zapažanjima i informacijama koje se odnose na hodanje i potrebu za korištenjem pomagala za kretanje odredi se vrijednosti EDSS-a. Sedam funkcionalnih sustava su piramidalni, cerebelarni, funkcije moždanog debla, osjetilne funkcije, funkcije mokraćnog mjehura i debelog crijeva, vidni sustav, umne/kognitivne funkcije te ostali sustavi. Za ocjenu pokretljivosti uzima se u obzir duljina puta koji bolesnik može prijeći. Ukupni rezultat proizlazi iz zbroja svih rezultata svakog pojedinačnog funkcijskog sustava koji se boduje u rasponu od 0 (normalna funkcija) do 6 (najveća disfunkcija). EDSS ima dvije prijelomne točke: ispod rezultata 4, pacijent je u potpunosti pokretljiv, a iznad rezultata 5,5 su pacijenu potrebna pomagala ili invalidska kolica. Promjena EDSS rezultata za $\geq 1,0$ bod (ili $\geq 0,5$ kod viših vrijednosti) obično se smatra klinički značajnom. Nedostatak ovog bodovnog sustava je primarna usmjerenost na motoričke funkcije i simptome koji su očitovanje samo dijela onesposobljenosti i težine kliničke slike MS-a te djelomična subjektivnost, ali tome unatoč i dalje je vrijedan alat, jednostavan za korištenje u kliničkom okruženju [29].

Značenje EDSS vrijednosti:

- EDSS 0 – uredan neurološki nalaz
- EDSS 1,0 – 1,5 – minimalni neurološki znaci bez funkcijskog ograničenja
- EDSS 2,0 – 3,5 – blaga do umjerena onesposobljenost, bolesnik je potpuno pokretan
- EDSS 4,0 – 5,5 – izraženija onesposobljenost, ali hod bez pomagala moguć (≥100–500 m)
- EDSS 6,0 – potreba za jednim pomagalom (štap ili štaka) za hod ≥100 m
- EDSS 6,5 – potreba za dva pomagala
- EDSS 7,0 – 7,5 – bolesnik je vezan za invalidska kolica
- EDSS 8,0 – 8,5 – uglavnom vezan za krevet, očuvana funkcija ruku
- EDSS 9,0 – 9,5 – gotovo potpuno nepokretan, potrebna stalna njega
- EDSS 10 – smrt uslijed MS-a

Skor težine MS-a (engl. *MS Severity Score* – MSSS) je statistički pokazatelj koji kombinira EDSS i trajanje bolesti u godinama. Na osnovi velikih studija, EDSS vrijednost pacijenta se uspoređuje s EDSS vrijednostima drugih bolesnika s istim trajanjem bolesti, čime se dobiva relativna mjera težine bolesti te se koristi za procjenu agresivnosti bolesti, usporedbu pacijenata s različitim trajanjem MS-a, stratifikaciju bolesnika u kliničkim istraživanjima te dugoročnu prognozu toka bolesti. Važno je naglasiti da MSSS nije dijagnostički alat, već prognostički i istraživački pokazatelj.

MSSS se izražava na skali od 1 do 10 pri čemu je značenje vrijednosti sljedeće:

- 1 – 2 - vrlo blaga bolest, spora progresija uredan neurološki nalaz
- 3 – 4 – blaga bolest
- 5 – 6 – umjerena težina bolesti
- 7 – 8 – teška bolest, brza progresija

Visok MSSS ukazuje na brzu akumulaciju onesposobljenosti u kratkom vremenu, dok nizak MSSS sugerira spor, benigniji tok bolesti. Prednost ovog bodovnog sustava je što se u obzir uzima i trajanje bolesti pa je procjena težine bolesti realnija, a ograničenje zasnovano isključivo na EDSS-u i zanemarivanje čestih i važnih simptomi umora i kognitivnog zatajivanja [30].

Kombinacija kliničkih i radioloških pokazatelja koristi se u procjeni učinka liječenja kojim se nastoji spriječiti nove relapse, nastanak novih MR lezija i progresiju onesposobljenosti (engl. *No Evidence of Disease Activity* – NEDA). Ukoliko se unatoč liječenju utvrdi značajna aktivnost bolesti, terapiju je potrebno zamijeniti lijekom dokazano bolje učinkovitosti.

Laboratorijskim pretragama krvi se prate parametri važni za procjenu sigurnosti terapije te uključuju pretrage jetrene i bubrežne funkcije, procjenu hematopoetskog sustava i prisutnost infekcija.

1.5. Liječenje multiple skleroze

Liječenje bolesnika s MS-om zahtjeva multidisciplinarni pristup s ciljem smanjenja aktivnosti bolesti, usporavanja progresije onesposobljenosti i ublažavanja simptoma te obuhvaća liječenje relapsa, liječenje koje modificira tijek bolesti te simptomatsko liječenje.

1.5.1. Liječenje akutnog relapsa

Novu epizodu neurološkog pogoršanja koja traje najmanje 24 sata i nije povezana s infekcijom ili povišenom temperaturom liječi se kortikosteroidima (metilprednizolon) u visokim dozama najčešće 1 g/dan intravenozno tijekom 3–5 dana. U nastavku se može nastaviti s deeskalacijskom peroralnom terapijom te iznimno i od samog početka liječenja relapsa [31]. Plazmafereza se primjenjuje vrlo rijetko kod teških, refraktornih relapsa koji ne odgovaraju na liječenje kortikosteroidima.

1.5.2. Liječenje koje modificira tijek bolesti

Revolucija u liječenju MS dogodila se u posljednja tri desetljeća razvojem DMT čija se primjena, uz rano postavljanje dijagnoze, pokazala ključnom je u dugoročnom očuvanju funkcionalne sposobnosti i kvalitete života oboljelih. DMT smanjuju učestalost relapsa, MR aktivnost bolesti i usporavaju napredovanje bolesti, a

primjenjuju kod RRMS i aktivnih progresivnih oblika MS-a. Aktivnost i proširenost bolesti određuju strategiju liječenja. Kod manje aktivnih oblika MS pristup je eskalacijski te se započinje s lijekovima umjerene učinkovitosti, povoljnijeg sigurnosnog profila. Ukoliko se ne postigne NEDA, taj lijek se obustavlja i nastavlja se s nekim od visoko učinkovitih, koji se u visoko aktivnim oblicima MS-a mogu primjenjivati i od samog početka bolesti te se takav princip naziva indukcijskim, a podržan je suvremenim smjernicama za liječenje MS-a [32].

Prema mehanizmu djelovanja i učinkovitosti, DMT-ovi se mogu razvrstati u tri glavne skupine: imunomodulacijsku terapiju (IMT), oralne imunomodulatorne lijekove i visoko učinkovite biološke terapije. IMT je prva i najdulje korištena, a lijekovi iz ove skupne [33,34] interferon-beta (IFN- β) i glatiramer acetat (GA) ne potiskuju u potpunosti imunosti sustav, nego ga uravnotežuju, smanjujući patološku aktivaciju limfocita. Drugu skupinu čine oralni imunomodulatorni lijekovi druge generacije poput fingolimoda, dimetil fumarata i teriflunomida. Njihova je primjena jednostavnija te imaju i veću učinkovitost, a djeluju na migraciju limfocita, smanjuju oksidativni stres i inhibiraju proliferaciju aktiviranih imunostih stanica. Treću skupinu čine visoko učinkovite biološke terapije koje snažno suprimiraju autoimunost. Među njima su monoklonska protutijela koja selektivno uklanjaju limfocite B natalizumab, okrelizumab, ofatumumab i alemtuzumab.

1. Interferoni beta

IFN- β je prvi DMT, za liječenje RRMS u SAD odobren je 1996. godine, a u Republici Hrvatskoj u upotrebi od 1997.g, i dugi je niz godina bio lijek prve linije liječenja RRMS. IFN- β je prirodni peptid s antivirusnim i antitumorskim djelovanjem kojeg proizvode fibroblasti, NK stanice, limfociti B, limfociti T i makrofazi. Mehanizam djelovanja IFN- β je složen te on regulira ekspresiju MHC II antigena na APC, inducira proizvodnju IL-10 u limfocitima T, pomiče citokinsku ravnotežu prema protuupalom odgovoru, inhibira migraciju limfocita T, blokira produkciju metaloproteinaza i adhezijskih molekula. Nadalje povećava faktore rasta neurona i preživljavanje neurona te smanjuje populaciju Th17 limfocita i citokina IL-17 koji su uključeni u imunopatofiziologiju MS-a [33]. Učinak mu je posredovan transkripcijskim faktorima, regulacijom gena te aktivacijom JAK-STAT signalnog puta. Vezivanje IFN- β na IFN receptor tipa 1 dovodi do fosforilacije STAT1 i STAT2 i stvaranja heterodimera, koji se translocira u jezgru i modulira ekspresiju gena [34].

Odgovor stanice na IFN- β je složen i može rezultirati promjenama u izražaju više od 500 gena, a kakav će biti odgovor ovisi o broju induciranih gena i obrascu indukcije [35]. IFN- β pojačava regulaciju mehanizama posredovanih FAS-receptorom i proizvodnjom apoptotskih markera kao što su aneksin-V i kaspaza-3 koji vode k apoptozi limfocita B [36]. IFN- β nema izravno neuroprotektivno djelovanje, no djelovanjem na CD4+Th1 stanice i mijenjanjem njihovog profila smanjuje se demijelinizacija neurona kao i njihovo daljnje oštećenje [37].

Rezultati početnih ispitivanja djelovanja IFN- β u bolesnika s RRMS pokazali su smanjenje stope recidiva za 34% kod liječenja visokim dozama IFN- β 1b i za 8% s nižim dozama u usporedbi s placeboom [38]. Studijom petogodišnjeg praćenja liječenja MS-a IFN- β 1b utvrđeno je smanjenje ukupnog broja lezija do 30% i smanjenje broja novih lezija do 50%, no nije utvrđeno smanjenje progresije onesposobljenosti [39]. Tijekom desetgodišnjeg praćenja bolesnika s SPMS-om nisu utvrđeni povoljni dugoročni ishodi liječenih IFN- β 1b [40].

Za liječenje MS-a koriste se dva oblika rekombinantnog IFN- β . U bakteriji *Escherichia coli* proizvodi se IFN- β -1b koji nije glikoziliran i od prirodnog se IFN- β razlikuje u nekoliko aminokiselina zbog čega ima nižu specifičnu aktivnost, stoga su potrebne više doze, s kojima raste rizik od razvoja neutralizirajućih protutijela. Snažno se i reverzibilno veže na humani serumski albumin što mu smanjuje djelotvornost za oko 10% u usporedbi s ekvivalentnom formulacijom IFN- β -1a čiji je slijed aminokiselinska je identičan onom u prirodnom IFN- β , a proizvodi se u staničnoj liniji jajnika kineskog hrčka. Pegilirani oblik, pegIFN- β -1a ima polietilen glikol vezan s IFN- β -1a, čime se produljuje njegovova bioraspodivnost te smanjuje broj potrebnih injekcija. Svi komercijalni pripravci IFN- β su injektibilne terapije i primjenjuju se supkutano ili intramuskularno. Raspon nuspojava na IFN- β je širok, od blagih kao što su lokalni bolovi i kožne reakcije na mjestu injiciranja, vrućice, mijalgije i simptoma sličnih gripu do ozbiljnih kao što su suicidalne misli, halucinacije, kardiotoksičnost i hepatotoksičnost radi kojih pacijenti nerijetko prekidaju liječenje [34].

2. GA je mješavina sintetskih polipeptida koji strukturno oponašaju MBP. Djeluje indukcijom antigen-specifičnih regulacijskih limfocita T (Th2 i Treg), izaziva pomak imunološkog odgovora s proupalnog (Th1/Th17) na protuupalni Th2 profil, kompetitivno se vezuje na HLA molekule, čime se smanjuje prezentacija mijelinskih antigena što može pridonijeti neuroprotekciji. Aktivirani Th2 limfociti prolaze KMB i

smanjuju upalu u SŽS-u. Johnson i sur. su 1995. godine utvrdili da GA za 29% smanjuje godišnje stope relapsa i dovodi do poboljšanja kliničkih ishoda. GALA studijom je utvrđeno 34% smanjenje godišnje stope relapsa u odnosu na placebo, bolja adherencija i podnošljivost. Najčešće nuspojave su lokalne reakcije na mjestu injekcije (eritem, bol, otok), lipoatrofija kod dugotrajne primjene, svrbež, crvenilo lica, stezanje u prsima, palpitacije, anksioznost. Ozbiljne nuspojave su iznimno rijetke, nema povećanog rizika od infekcija ili maligniteta, a osobito je prikladan za mlade bolesnike, posebice žene koje planiraju trudnoću, bolesnike s komorbiditetima i siguran za dugotrajnu primjenu [41–44]

3. Dimetil fumarat je peroralni lijek koji aktivira nuklearni čimbenik povezan s drugom eritroidnim 2 čimbenikom (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* - Nrf2) signalni put, potiče ekspresiju antioksidativnih i citoprotektivnih gena, smanjuje oksidativni stres i upalni odgovor u SŽS, modulira imunološki odgovor pomicanjem s proupalnog (Th1/Th17) prema protuupalnom (Th2) profilu te smanjuje migraciju aktiviranih limfocita u SŽS-u. Učinkovitost dimetil fumarata dokazana je DEFINE studijom te je utvrđeno smanjenje godišnje stope relapsa za 53% u usporedbi s placeboom te smanjenje rizika progresije onesposobljenosti za 38% i značajno smanjenje broja novih i aktivnih T2 lezija. CONFIRM studija pokazala je smanjenje godišnje stope relapsa za 44% i značajno smanjenje MR aktivnosti u usporedbi s GA-om. Učinkovitost mu je oko 45–50% viša od IFN-β i GA. Nuspojave su crvenilo, osjećaj topline, gastrointestinalne smetnje u vidu mučnine, proljeva i bolova u truhu, limfopenija i glavobolja, a ozbiljne nuspojave poput progresivne multifokalne leukoencefalopatije (PML) rijetke su i javljaju se uglavnom u bolesnika s dugotrajnom teškom limfopenijom stoga je potrebno redovito praćenje broja limfocita i oprez kod dugotrajne limfopenije [45].

4. Teriflunomid reverzibilno inhibira mitohondrijski enzim dihidroorotat dehidrogenazu, ključan za de novo sintezu pirimidina, čime selektivno smanjuje proliferaciju aktiviranih limfocita T i B, smanjuje upalni odgovor u SŽS-u, bez izazivanja potpune imunodeplecije. Njegova je učinkovitost na smanjenje stope relapsa, progresiju onesposobljenosti, aktivnost bolesti i konverziju CIS-a u klinički definitivnu MS dokazana u više studija. Lijek je umjerene učinkovitosti (oko 30–35%), usporedive s IFN-β i GA. Najčešće blaže nuspojave su gastrointestinalne smetnje, alopecija, glavobolja i hipertenzija, a teže su hepatotoksičnost, periferna neuropatija te ozbiljne

infekcije. Zbog utvđene teratogenosti strogo je kontraindiciran u trudnoći, a ne preporučuje se niti u bolesnika s visoko aktivnim MS-om. Prikladan za bolesnike s blagom do umjerenom aktivnošću bolesti te jednostavan za peroralnu primjenu jednom dnevno [46,47].

5. S1P modulatori (Fingolimod, Siponimod, Ozanimod) su lijekovi koji svojim vezivanjem za S1P receptore na limfocitima T i B spriječavaju njihov izlazak iz limfnih čvorova čime se zadržavaju na periferiji, što posljednično smanjuje infiltraciju u SŽS-u. U usporedbi s IFN- β -1a je utvrđeno da fingolimod kod RRMS smanjuje godišnju stopu relapsa za 54–60%, značajno smanjuje nove T2 i Gd+ lezija i atrofiju mozga. Učinkovit je i SPMS Studija EXPAND je pokazala je da siponimod značajno usporava progresiju onesposobljenosti uz smanjenje aktivnosti bolesti u SPMS, uz prihvatljiv sigurnosni profil. U studiji SUNBEAM utvrđeno je da ozanimod u usporedbi s IFN- β -1a smanjuje godišnju stopu relapsa za 45–50%, značajno smanjuje MR aktivnost bolesti te ima povoljan učinak na atrofiju mozga. Od ozbiljnijih nuspojava izdvajaju se AV blok, bradikardija, porast prijemčivosti za infekcije te edem makule. S1P modulatori predstavljaju važnu peroralnu terapijsku opciju, osobito za bolesnike koji ne žele injekcijsku ili infuzijsku terapiju [48–50].

6. Kladrinin je purinski nukleozidni analog (2-klorodeoksiadenozin) koji se selektivno nakuplja u limfocitima T i B zbog visoke aktivnosti deoksicitidin-kinaze i niske aktivnosti 5'-nukleotidaze u tim stanicama. Nakon fosforilacije dolazi do akumulacije toksičnih metabolita koji indiciraju selektivnu apoptozu limfocita T i B, dugotrajnu redukciju autoimune aktivnosti, uz relativno očuvanje urođene imunosti što rezultira selektivnim imunološkim preslagivanjem, uz minimalnu kontinuiranu imunosupresiju. Učinkovitost kladrinina dokazana je CLARITY studijom te je u usporedbi s placebom utvrđeno smanjenje godišnje stope relapsa za 55–60%, značajno smanjenje broja novih T2 i kontrastom pojačanih MR lezija te smanjenje rizika progresije onesposobljenosti. Dugotrajni terapijski učinak postiže se nakon dva kratka ciklusa liječenja tijekom 2 godine, peroralnom primjenom lijeka. Česte nuspojave su limfopenija, najčešće ovisna o dozi, glavobolja, mučnina, umor, povećan rizik herpes zoster infekcije, respiratorne i urinarne infekcije, dok su ozbiljne oportunističke infekcije rijetke. Rizik za razvoj malignih bolesti nije potvrđen, a zbog teratogenosti je stroga kontracepcija potrebna tijekom i neko vrijeme nakon liječenja. Nužno je praćenje broja limfocita te procjena rizika od infekcije. Primjenjuje se kod

aktivnog RRMS-a, u bolesnika s visokom aktivnošću bolesti, posebice onih koji preferiraju kratke terapijske cikluse [51,52].

7. Natalizumab je monoklonsko protutijelo usmjereno na α 4-integrin koji se nalazi na površini leukocita. Vezanjem za α 4-integrin sprječava se interakcija leukocita s vaskularnim adhezijskim molekulama (engl. *Vascular cell adhesion molecule 1* – VCAM-1) na endotelu KMB što rezultira smanjenim prolaskom aktiviranih limfocita T i B u SŽS, čime se značajno reducira upala, demijelinizacija i nastanak novih lezija karakterističnih za MS. Ne uzrokuje sistemsku imunodepleciju, već djeluje na migraciju imunskih stanica. Učinkovitost je potvrđena u velikoj studiji AFFIRM te je u usporedbi s placebom utvrđeno smanjenje godišnje stope relapsa za 68%, smanjenje rizika progresije invaliditeta za 42%, izrazito smanjenje MR aktivnosti bolesti, novih T2 i kontrastom pojačanih lezija [53]. Česte nuspojave predstavljaju glavobolja, umor, mučnina, infekcije gornjih dišnih puteva, infuzijske reakcije. Najznačajnija, potencijalno smrtonosna nuspojava, je PML, oportunistička infekcija uzrokovana reaktivacijom John Cunningham (JC) virusa. Rizik za razvoj povećava se s nalazom protutijela na JC u serumu bolesnika, trajanjem terapije dužim od 2 godine te prethodnim liječenjem imunosupresivima. Stoga je obavezno redovito praćenje protutijela na JC virus te klinički i radiološki nadzor [54]. Ostale nuspojave su alergijske reakcije, razvoj neutralizirajućih protutijela te hepatotoksičnost. Terapija natalizumabom se primjenjuje kod visoko aktivnog RRMS-a te nakon izostanka uspjeha terapija umjerene učinkovitosti [53–55].

8. Ocrelizumab je anti-CD20 monoklonsko protutijelo koje djeluje selektivnom deplecijom limfocita B, no ne i plazma stanica, što smanjuje upalu u SŽS-u, nastanak novih lezija i usporava neurodegeneraciju. U studijama OPERA I i OPERA II ocrelizumab je uspoređen s IFN- β 1a te je utvrđeno smanjenje godišnje stope relapsa za oko 46–47%, značajno smanjenje broja novih i aktivnih MR lezija te smanjenje pogresije onesposobljenosti. U studiji ORATORIO, ocrelizumab je pokazao smanjenje rizika progresije invaliditeta za oko 24%, usporavanje pogoršanja funkcijskog statusa, smanjenje progresije atrofije mozga. Zasad je jedina terapija s dokazanom učinkovitošću u PPMS-u. Česte nuspojave ove infuzijske terapije su infekcije gornjih dišnih puteva, umor, blage do umjerene infekcije. Do sada su zabilježeni iznimno rijetki slučajevi PML-a, uglavnom u bolesnika prethodno liječenih drugim terapijama. Pri dugotrajnoj primjeni može dovesti do smanjenja razine imunoglobulina i blago

povećane učestalosti maligniteta, osobito karcinoma dojke. Prije početka terapije obavezno je testiranje na hepatitis B, a tijekom liječenja preporučuje se redovito praćenje krvne slike i imunoglobulina. Primjenjuje se kao rana visokoefikasna terapija u RRMS-u u bolesnika s agresivnim tijekom bolesti te kao standardna terapija u PPMS-u [56–58].

9. Ofatumumab je također monoklonsko protutijelo usmjereno protiv CD20 antigena na površini limfocita B. Vežanjem za CD20 dolazi do selektivne deplecije perifernih limfocita B putem citotoksičnosti posredovane komplementom i protutijelima, što rezultira smanjenjem upalne aktivnosti u SŽS-u uz relativno očuvanje limfocita T i urođene imunosti. Zbog subkutane primjene i nižih doza, uzrokuje brzu, ali reverzibilnu depleciju limfocita B, uz bržu repopulaciju u usporedbi s ocrelizumabom. Njegova učinkovitost potvrđena je u ASCLEPIOS I i II studijama, u kojima je uspoređen s teriflunomidom te je utvrđeno smanjenje godišnje stope relapsa za 50–60%, značajno smanjenje broja novih i aktivnih MR lezija te povoljan učinak na oštećenje aksona. Učinkovitost mu je usporediva s intravenskim anti-CD20 terapijama, no primjena je jednostavnija, a nema ni povećanog rizika sekundarnih autoimunih bolesti i potreba za dugotrajnim intenzivnim laboratorijskim praćenjem je manja u usporedbi s alemtuzumabom. Primjenjuje se kao rana visokoefikasna terapija kod RRMS-a, kod bolesnika s aktivnom bolešću te kod bolesnika koji preferiraju samostalnu supkutanu primjenu [59,60].

10. Alemtuzumab je monoklonsko protutijelo usmjereno protiv CD52 antigena, koji je visoko izražen na površini zrelih limfocita T i B, kao i na monocitima i dendritičkim stanicama. Vežanjem za CD52 dolazi do brze deplecije perifernih limfocita radi citotoksičnosti posredovane komplementom i protutijelima, nakon čega slijedi repopulacija imunskih stanica promijenjenog imunološkog profila, uz relativni porast regulacijskih limfocita T i smanjenje autoreaktivnih limfocita T. Učinkovitost je dokazana velikim randomiziranim kliničkim studijama CARE-MS I i CARE-MS II te je utvrđeno da u usporedbi s IFN- β -1a smanjuje godišnju stopu relapsa oko 70%, značajno smanjuje nove i aktivne lezije MR, usporava progresiju onesposobljenosti, a kod dijela bolesnika zabilježeno je poboljšanje EDSS skora. Primjenjuje se kod visoko aktivnog RRMS-a, u bolesnika s brzim pogoršanjem bolesti te kod izostanka odgovora na terapije umjerene učinkovitosti, intravenskom aplikacijom u dva kratka terapijska ciklusa, prve godine tijekom 5 dana, a druge godine tijekom 3 dana. Ozbiljnije nuspojave su razvoj

sekundarnih autoimunskih bolesti, primjerice autoimunosne bolesti štitnjače, imunosne trombocitopenijske purpure, autoimunosne nefropatije te infekcije. Zbog sigurnosnog profila, primjena zahtijeva strogu selekciju bolesnika i strukturirano dugotrajno praćenje, najmanje 48 mjeseci nakon druge doze [61–64].

1.5.3. Simptomatska i potporna terapija u multiploj sklerozi

Simptomatsko i potporno liječenje poboljšava funkcionalnu sposobnost, smanjuje simptome i unaprjeđuje kvalitetu života. Jedan od najčešćih simptoma MS-a je kronični umor pa se za ublažavanje daju amantadin i modafinil, iako ne postoje jasni dokazi o koristi [65]. Važnu ulogu ima i uravnotežena higijena sna, pravilan ritam spavanja, odmor i tjelesna aktivnost. Spastičnost je česta u uznapređovalim fazama bolesti te se liječi baklofenom i tizanidinom, a nadopunjuje fizikalnom terapijom. Bol i parestezije ublažavaju se antikonvulzivima poput gabapentina i pregabalina, a mokraćni simptomi urgencije i inkontinencije antikolinergicima. Antidepresivi iz skupine selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (SSRI) primjenjuju se u liječenju depresije, a učinak imaju i na neuropatsku bol [66].

Uz farmakološke mjere, fizikalna i radna terapija imaju značajnu ulogu u jer pomažu u održavanju pokretljivosti, snage i samostalnosti bolesnika.

1.6. Genetika multiple skleroze

1.6.1. Genetički čimbenici u multiploj sklerozi

Nasljedni doprinosi riziku za razvoj MS-a su neosporni, a genetska komponenta MS-a potvrđena je brojnim genetičkim, epidemiološkim i studijama blizanaca. Rizik za MS u općoj populaciji iznosi oko 0,1%, a kod srodnika oboljelih u prvom koljenu (djeca, braća/sestre) rizik je 2–4%. Kod dizigotnih blizanaca rizik doseže oko 5%, dok je kod jednojajčanih blizanaca oko 25–30%. Nadalje, prevalencija MS-a varira među rasnim i etničkim skupinama: najviša je u sjevernoeuropskim i skandinavskim populacijama, umjerena u južnoeuropskima, a niska u azijskim i afričkim. Ovaj geografsko-genetski

gradijent ukazuje na ulogu naslijeđa, ali i mogućih faktora okoliša (npr. vitamin D, infekcije) [3].

Najvažniji genetski čimbenik rizika za MS povezan je s genima za HLA u kromosomskoj regiji 6p21.3. Riječ je o regiji koja kodira proteine odgovorne za prezentaciju antigena limfocitima T. Specifično, alel HLA-DRB1*15:01 (ranije označen kao DR2) višestruko povećava rizik za MS te nositelji ovog alela imaju oko tri puta veći rizik oboljeti u odnosu na opću populaciju. Proteinski produkt DRB1*15:01 može vezati peptide mijelinskih proteina MBP, MOG, PLP te ih prezentirati CD4+limfocitima T, čime inicira autoimunosnu aktivaciju. Uz to, identificirani su i zaštitni aleli, poput HLA-A*02:01, koji smanjuju rizik za MS, vjerojatno zahvaljujući efikasnijem uklanjanju autoreaktivnih limfocita T tijekom sazrijevanja u timusu. Različite populacije pokazuju specifične HLA rizične varijante: primjerice, u azijskih populacijama povezanost je pronađena s HLA-DRB1*04:05 i HLA-DPB1*03:01, dok u afričkim populacijama dominiraju DRB1*15:03 varijante [67].

Iako HLA kompleks objašnjava oko 20–30% ukupnog genetskog rizika, napredak molekularne genetike, osobito kroz studije asocijacijskog probira čitavog genoma (engl. *genome-wide association studies* – GWAS), identificirao je više od 200 ne-HLA lokusa koji dodatno pridonose riziku bolesti. Značajniji među njima su gen za IL-2 receptor alfa (IL-2RA) koji kodira α -lanac receptora za IL-2, a polimorfizmi gena utječu na diferencijaciju Treg i održavanje periferne tolerancije te gen receptora α za IL-7 koji sudjeluje u preživljenju limfocita T, a njegove su varijante povezane s povećanom propusnošću KMB-a i autoimunskim odgovorom. Nadalje geni JAK-STAT signalnog puta koji je presudan za citokinsku regulaciju i diferencijaciju Th17 stanica. Gen CD58 kodira antigen povezan s funkcijom limfocita 3 i sudjeluje u signalizaciji i aktivaciji limfocita T, a zaštitni aleli pojačavaju Treg funkciju [68]. Ovi geni ne djeluju izolirano, već interakcijom unutar signalnih puteva koji reguliraju pro i protuupalne procese. Štoviše, većina identificiranih gena nalazi se i među genima povezanima s drugim autoimunskim bolestima (npr. lupus, dijabetes tipa 1, reumatoidni artritis, autoimunosna bolest štitne žlijezde), što ukazuje na zajedničku genetsku osnovu autoimunosti [69].

Epigenetika predstavlja ključnu vezu između genetske osjetljivosti i okolišnih čimbenika. Promjene u metilaciji DNA, modifikacijama histona i ekspresiji mikroRNA mogu utjecati na aktivnost imunoloških gena bez promjene genske sekvence.

Zamijećena je hipometilacija promotorskih regija gena HLA-DRB1 i IL2RA u limfocitima T oboljelih od MS-a, što rezultira pojačanim izražajem ovih gena i posljedičnom hiperaktivacijom stanica imunskog sustava [70]. MikroRNA-128 i mikroRNA-340 dodatno potiču Th17 proliferaciju i snižavaju Treg populaciju, čime se povećava sklonost autoimunosti [71].

EBV, pušenje i manjak vitamina D poznati su okolišni modulatori koji mogu promijeniti epigenetske uzorke imunoloških gena. Ove gen-okoliš interakcije objašnjavaju zašto genetska predispozicija sama po sebi nije dovoljna za nastanak bolesti, već djeluje u sinergiji s vanjskim čimbenicima [69].

Analize nasljednosti na temelju GWAS podataka pokazuju da genetska komponenta objašnjava oko 40% ukupne varijabilnosti u riziku obolijevanja od MS-a. Trenutno dostupni poligenski skorovi rizika omogućuju kvantificiranje genetskog rizika pojedinca kombiniranjem učinaka stotina identificiranih varijanti. Takvim modelima se uspješno može predvidjeti sklonost razvoju bolesti u istraživačkim kohortama te bi u budućnosti mogli imati kliničku primjenu u ranoj identifikaciji osoba s visokim rizikom, posebice ako se kombiniraju s biljezima iz perifernih imunskih stanica ili MR nalazima [72].

Najveći broj poznatih gena prvenstveno je povezan s podložnošću za nastanak MS-a, no novija istraživanja usmjerena su i na genetiku progresije i varijacije odgovora na terapiju. Varijante u genima TNFRSF1A i NFKB1 povezane su s bržim prelaskom RRMS-a u SPMS oblik. Također, genetske razlike u metabolizmima interferona i drugih IMT mogu utjecati na terapijski odgovor.

Sekvenciranjem cijelog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing* – WGS) i cijelog egzoma (engl. *Whole Exome Sequencing* – WES) prepoznate su rijetke varijante u mitohondrijskim i oligodendrocitnim genima koje pridonose neurodegenerativnim aspektima bolesti. Time se potvrđuje da MS ima i neurobiološku, a ne samo imunološku genetsku komponentu. Integracija genomske, epigenomske, transkriptomске i proteomske analize (tzv. *multi-omic pristup*) danas je ključan alat u identificiranju molekularnih podtipova MS-a, s velikim potencijalom u daljnjem razvoju personalizirane medicine [73].

1.6.2. *CTLA4* gen

Jedan od gena koji reguliraju imunološku funkciju i potencijalno bi mogli utjecati na djelovanje IMT je gen za protein 4 vezan uz citotoksični limfocit T (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* – *CTLA4*) smješten u kromosomskoj regiji 2q33 uz druge gene važne u regulaciji odgovora limfocita T. CTLA-4 protein je transmembranski receptor limfocita T, član transmembranskih imunoreceptora iz imunoglobulinske superfamilije, važna imunoregulacijska molekula koja se uglavnom izražava na površini limfocita T, ključna u sprječavanju njihove aktivacije i održavanju periferne tolerancije [12]. Djelovanje CD28 antigena u naivnim limfocitima T preko CD80/CD86 liganda na APC izaziva aktivaciju posredovanu njihovim receptorima. CTLA-4 je negativan regulator aktivacije limfocita T zbog većeg afiniteta prema CD80/CD86 ligandu u odnosu na CD28 .

Nekoliko se varijanti *CTLA4* gena, uključujući polimorfizme jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism* – SNP), povezuje s autoimunskim bolestima (8,9). Polimorfizam +49A/G (rs231775) predstavlja supstituciju adenina s gvaninom u prvom egzonu *CTLA4* gena te posljedičnu zamjenu aminokiseline alanin s treoninom na 17. mjestu u peptidu, što utječe na inhibicijsku ulogu CTLA-4 i aktivnost limfocita T. Alel G povezan je s nižom ekspresijom, a alel A s višom ekspresijom CTLA-4 na površini limfocita T [38]. Funkcijska uloga ovog polimorfizma u autoimunskim bolestima proizlazi iz njegova utjecaja na nižu razinu mRNA koja kodira topivu izoformu CTLA-4 (engl. *soluble CTLA-4* – sCTLA-4) [74]. Polimorfizam *CTLA4* CT60A/G (rs3087243) označava zamjenu adenina s gvaninom u 3' regiji gena koja se ne prevodi (engl. *untranslated region* – UTR) u polipeptidni lanac. Funkcionalna ispitivanja ukazuju da je G alel na poziciji CT60 povezan s 50% nižom razinom mRNA za sCTLA-4 izoformu i s nižom razinom Treg [75]. Istraživanje provedeno na životinjskom modelu MS-a pokazalo je povezanost ekspresije CTLA-4 s upalnim procesom [68]. Meta-analiza i studije provedene u različitim populacijama bolesnika dale su proturječne rezultate povezanosti polimorfizama *CTLA4* gena s podložnosti i razvojem MS [76].

1.6.3. CCR5 gen

Do danas je poznato oko 50 kemokina, sekretornih proteina koje proizvode leukociti i tkivne stanice, povezanih s imunskim sustavom, a čija funkcija je usmjeravanje leukocita k mjestima upale njihovim povećanim gradijentom. Kemokinski receptori smješteni su u membrani i pripadaju u skupinu receptora vezanih s G-proteinom. Nakon vezanja kemokina i njegovog receptora dolazi do vezanja s G-proteinom te aktivacije signalnih putova i upalnih gena.

Gen za C-C kemokinski receptor 5 (*CCR5*) kodira CCR5 protein koji se izražava na staničnoj membrani i služi kao stanični receptor za upalni protein makrofaga (engl. *macrophage inflammatory protein* – MIP) 1α , MIP- 1β i RANTES kemokine. CCR5 kemokinski receptor veže se s G proteinom i izražen je na limfocitima T (CD4+ i CD8+), monocitima, makrofazima posebno tijekom upale, dendritičkim stanicama i mikroglijii u neuroinflamaciji. Funkcija receptora ostvaruje se preko veze s G-proteinom i služi kao koreceptor za ulazak nekih virusa, poput virusa humane imunodeficiijencije (HIV) tipa 1, u stanice. Receptor CCR5 ima ulogu u upalnim odgovorima na infekcije, ali se također povezuje s autoimunskim bolestima, primjerice celijakijom, dijabetesom tipa 1 i autoimunskom bolesti štitnjače [77]. Autoimunosni upalni mehanizam značajan je u razvoju MS-a, a važnu ulogu imaju CC-kemokini i njihovi receptori koji posreduju pri regrutaciji leukocita u tkiva, a opažena je i ekspresija CCR5 na limfocitima u perivaskularnim infiltratima upalnih lezija SŽS-a [78].

Sam *CCR5* gen sastoji se od četiri egzona i dva introna te je smješten u kromosomskoj regiji 3p21. Delecija *CCR5-Δ32* (rs333) označava gubitak od 32 nukleotida, uključujući kodone 175-185 i dovodi do pomaka okvira čitanja te do prekida sinteze polipeptidnog lanca na kodonu 206. Promijenjeni proteinski receptor dužine je 215 aminokiselina, nedostaju mu 3 transmembranske domene te se ne savija pravilno čime gubi funkcionalnost, a potom se mijenja i izraženost na površini stanice.

Kako se CCR5 uglavnom eksprimira na površini monocita i različitih podtipova limfocita kao što su NK, CD4+ i CD8+ limfocita T to doprinosi njihovom ulasku u SŽS, aktivaciji limfocita T i indukciji oslobađanja citokina. Uloga CCR5 u MS-u naglašena je otkrićem povišene razine ovog receptora u CD8+ limfocitima MS bolesnika te na eksperimentalnom životinjskom modelu što implicira njegovu ulogu na podložnosti i progresiju MS-a [79].

1.6.4. TNFRSF10A gen

Određeni citokini iz obitelji liganda TNF induciraju apoptozu vezanjem na njihove odgovarajuće receptore koji sadrže domenu smrti. Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10A* – *TNFRSF10A*) smješten je na kromosomu 8p21.3 i kodira receptor 1 TNF-srodnog liganda koji inducira apoptozu (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1* – TRAILR1) te je uključen u autoimunosne bolesti posredovane limfocitima T, kao što je MS [80,81]. TRAILR1, poznat još i kao DR4 (engl. *death receptor* – DR) je membranski receptor na koji se veže ligand koji inducira apoptozu povezanu s TNF, posreduje u vanjskom putu apoptoze i imunološkoj regulaciji. Apoptoza posredovana članovima TNF-superfamilije faktora rasta neurona igra ključnu ulogu u interakciji živčanog i imunološkog sustava. U slučaju neodgovarajućeg formiranja signalnog kompleksa koji inducira smrt (engl. *Death-Inducing Signalling Complex* – DISC) ili blokade kaspaze-8 signalizacija se može usmjeriti prema aktivaciji NF- κ B, MAPK signalnim i proupalnim putevima.

Svi TRAIL receptori izraženi su na oligodendrocitima, neuronima i astrocitima [82], a TRAILR1 povezuje se s MS-om. Tijekom terapije IFN- β , pojačana ekspresija TRAIL-a može izazvati apoptozu u granulocitima ili monocitima, inhibirati aktivaciju autoreaktivnih limfocita T i promicati proizvodnju Treg.

Polimorfizam *TNFRSF10A* rs20576 je česta varijanta krivog smisla u kojoj dolazi do transverzije adenina u citozin u egzonu 5, uzrokuje zamjenu aminokiseline pGlu228Ala uz mjesto sidrenja za membranu te može utjecati na vezanje TRAIL-a i signalizaciju apoptoze. SNP rs20576 nalazi u izvanstaničnoj, cisteinom bogatoj domeni receptora, a zbog blizine membrani i promjene u prijenosu signala kroz transmembransku regiju prema citosolnoj domeni smrti mogu rezultirati izostankom formiranja DISC signalnog kompleksa koji inducira apoptozu [82]. Istraživanja ovog polimorfizma u raznim bolestima pokazala su povezanost rs20576-C alela s nekim vrstama tumora [83].

Prethodna su istraživanja utvrdila da TRAIL/TRAIL receptorski sustav sudjeluje u različitim koracima aktivacije imunskih stanica (migraciji, proliferaciji, diferencijaciji) te može biti povezan s različitim autoimunskim poremećajima uključujući MS [31,33,34]. TRAIL ima imunosupresivnu, imunoregulacijsku i imunoefektorsku funkciju

te je uključen u patogenezu MS-a, iako njegova točna uloga nije u potpunosti razjašnjena [84]. Osim toga, pokazalo se da TRAIL inducira IFN- β u limfocitima T, NK stanicama i monocitima [85], a njegova je razina mRNA bila predložena kao marker odgovora za liječenje IFN- β [86].

1.6.4. *CCR5*, *CTLA4* i *TNFRSF10A* geni u etiopatogenezi MS-a i odgovoru na imunomodulacijsku terapiju

Usprkos značajnom razvoju novih lijekova još uvijek ne postoji učinkovita terapija primjerena svim MS bolesnicima, a IFN- β u 30–50% bolesnika ne daje odgovarajući terapijski odgovor. Farmakogenetička istraživanja pokazala su da je odgovor na IMT složen poligeniski mehanizam koji je još uvijek nedovoljno istražen. Studijama gena kandidata i GWAS studijama [87,88] identificirane su pouzdane genetičke varijante ključne za terapijski odgovor MS bolesnika. Većina tih studija analizirala je povezanost pojedinačnih alela/genotipova s kliničkim odgovorom na terapiju, no može se očekivati da su genske interakcije iznimno značajne u terapijskom odgovoru kao što su ključne i u samoj predispoziciji za bolest. Nadalje, dosadašnje studije su pokazale da postoje razlike ne samo u incidenciji, dobi nastupa i progresiji bolesti između muškaraca i žena, već i da postoji različit, ali još nedostatno istražen odgovor na IMT s obzirom na spol. GWAS studije ukazale su na brojne lokuse i gene koji reguliraju imunološku funkciju, a mogli bi pridonijeti razvoju bolesti te potencijalno utjecati na djelovanje IMT-a [89].

Produkti *CCR5* i *CTLA4* gena ključni su regulatori imunološkog odgovora, pa iako djeluju na različite načine i u različitim fazama imunološkog odgovora, igraju važnu ulogu u autoimunim bolestima poput MS-a. Dokazi upućuju na to da su kemokini i kemokinski receptori uključeni u regulaciju upale induciranjem infiltracije i migracije limfocita T u SŽS, što se smatra jednim od ključnih procesa u patogenezi MS-a [90]. Nekoliko je studija pokazalo da je ekspresija *CCR5* značajno povećana u aktivnim demijelinizirajućim lezijama i u cerebrospinalnoj tekućini pacijenata s MS-om tijekom relapsa [91,92]. Bolesnici koji su homozigoti za *CCR5*- Δ 32 alel ili su heterozigotni nositelji alela nemaju ekspresiju *CCR5* proteina ili je ona smanjena na površini stanica, što dovodi do smanjene migracije leukocita na mjesta lezija i smanjene upale u SŽS-u. Do sada je provedeno nekoliko asocijacijskih istraživanja *CCR5*- Δ 32 polimorfizma u MS bolesnika, pri čemu su dobiveni kontradiktorni rezultati [93–95]. Rijetke

provedene farmakogenetičke studije povezuju ovu mutaciju s povoljnim odgovorom na IFN- β terapiju [23]. Dvije uključuju i *CTLA4* gen te ukazuju na povezanost polimorfizma +49 A/G s terapijom IFN- β [96,97], dok polimorfizam CT60 A/G nije bio obuhvaćen sličnim istraživanjima. Istraživanje polimorfizma *CTLA4* CT60 provedeno je u svega 4 studije [98–101] vezane uz podložnost i/ili tijekom MS-a, pri čemu je samo studija u flamanskoj populaciji pokazala povezanost ovog polimorfizma unutar *CTLA4* +49 A/G*G-CT60*G haplotipa s podložnosti za MS [101].

Iako meta-analize objavljenih studija u MS-u nisu pronašle povezanost između polimorfizama *CCR5*- Δ 32 i *CTLA4* +49 A/G i podložnosti za MS u europskim populacijama [76,97], njihov utjecaj na kliničku ekspresiju ili odgovor na liječenje ne može se isključiti, posebno ako se uzme u obzir njihova kombinacija i međudjelovanje. Na primjer, neke studije su pokazale da je mutacija *CCR5*- Δ 32 povezana sa kasnijim nastupom početka bolesti [102], odgođenom kliničkom progresijom MS-a [94,95] i ranijom smrtnošću [103], dok polimorfizam *CTLA4* +49 A/G utječe na tijek ili napredovanje bolesti u nekim populacijama [99,104–106]. Svega je nekoliko studija istraživalo povezanost između učinkovitosti liječenja IFN- β i polimorfizama u genima *CCR5* i *CTLA4*. Prisutnost alela *CCR5*- Δ 32 bila je povezana s optimalnim odgovorom na liječenje IFN- β kod egipatskih pacijenata [107], ali nije imala utjecaja na rizik od recidiva kod danskih pacijenata [96]. Kod ruskih pacijenata, polimorfne varijante više gena imunološkog odgovora, poput onih koje kodiraju *CCR5*, *IFNAR1*, *TGFB1*, *DRB1* i *CTLA-4*, istražene su u utjecaju na učinkovitost liječenja IFN- β . Prisutnost alela *CCR5*- Δ 32 samostalno ili u kombinaciji sa specifičnim alelima drugih gena (kao što su *CCR5*- Δ 32 + *IFNAR1* G + *IFNB1* T/T ili *CCR5*- Δ 32 + *IFNAR1* G + *IFNG* T) bila je povezana s boljom efikasnošću liječenja IFN- β . Iako nije uočena značajna povezanost između pojedinačnog alela/genotipa *CTLA4* +49 A/G i odgovora na terapiju, uočena je zanimljiva interakcija. Tako je kombinacija genotipa *CCR5* wt/wt s alelom *CTLA4* +49G povećala značajnost povezanosti s izostankom odgovora na liječenje IFN- β ($p = 0,002$) za 12,9 puta u usporedbi s pojedinačnim nepovoljnim genotipom *CCR5* wt/wt [97].

Genetičke analize obuhvatile su različite gene i genske varijante TRAIL/TRAIL receptorskog sustava obzirom da su TRAIL receptori i njihovi ligandi povezani s imunološkim odgovorom i autoimunim poremećajima pa i MS-om. Istraživanje genske ekspresije ukazalo na ulogu TRAIL sustava u mehanizmu djelovanja IFN- β u MS-u [85], a dosad je samo u španjolskih bolesnika s RRMS-om provedena studija

TNFRSF10A gena u odgovoru na IMT na reprezentativnom broju uzoraka [86,108]. Polimorfizam rs20576 (CC genotip) identificiran je kao mogući prediktor pozitivnog odgovora na terapiju IFN- β s obzirom da se ovaj genotip pokazao povezanim s većom vjerojatnošću održavanja stabilnog EDSS-a tijekom dvije godine liječenja IFN- β ($p = 0,025$) [108]. S druge strane, studija iz 2020 godine provedena na malom broju, ukupno 73, iranskih MS bolesnika nije utvrdila razliku u frekvenciji genotipova i alela između skupina MS bolesnika niti povezanost *TNFRSF10A* rs20576 s odgovorom na terapiju IFN- β [75].

Dostupne DMT za MS djeluju na različite komponente imunološkog sustava s ciljem kontrole upale i usporavanja progresije bolesti. IMT prve linije, IFN- β i GA, djeluju modulacijom staničnog odgovora limfocita T i smanjenjem upalnih citokina. Iako su dostupni novi visokoučinkoviti lijekovi, IFN- β nalazi svoje mjesto u liječenju CIS-a, manje aktivnih oblika MS posebice kod žena koje planiraju trudnoću te kao deeskalacijska terapija održavanja nakon primjene monoklonskih protutijela [32].

Stoga je i dalje od interesa ispitati genetičke varijante koje mogu utjecati na odgovor na terapiju IFN- β kako bi se identificirali biljezi efikasne terapije u MS-u. Naša ranija istraživanja polimorfizama *CCR5- Δ 32* i *CTLA4 +49* nisu pokazala utjecaj u podložnosti za MS ili na njezine kliničke manifestacije [109,110], a potencijalni utjecaj ovih polimorfizama na učinkovitost IMT do sada nismo istraživali.

Literaturni podaci o utjecaju *CCR5*, *CTLA4* i *TNFRSF10A* polimorfizama u odgovoru na terapiju IFN- β ostaju rijetki, često nekonzistentni te nisu ispitivani u kombinacijama obuhvaćenim ovim istraživanjem. Također, dosadašnji rezultati nisu stratificirani s obzirom na spol, a terapijski odgovor u MS-u različit je između muškaraca i žena. Navedeno ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjem povezanosti odabranih polimorfizama s odgovorom na terapiju koja modificira tijek bolesti.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Farmakogenetička istraživanja pokazala su da je odgovor na IMT složen poligeniski mehanizam. GWAS studije identificirale su preko 200 MS rizičnih lokusa, a više od pola locirano je u genima koji reguliraju imunološku funkciju, no nisu utvrđene pouzdane genske varijante ključne za terapijski odgovor.

Stoga je hipoteza istraživanja da pojedini geni imunološkog odgovora, uz gene čiji produkti sudjeluju u metabolizmu lijekova, mogu utjecati na način djelovanja IFN- β .

Budući da je MS složena poligeniska bolest te da je IFN- β plejotropan agens, opći je cilj istraživanja utvrditi aditivni i epistatski učinak odabranih polimorfizama *CCR5*, *CTLA4* i *TNFRSF10A* gena autoimunskog odgovora radi identificiranja bolesnika s genetičkom pozadinom kod kojih je terapija IFN- β djelotvorna. Povrh toga, zbog različitog terapijskog odgovora između muškaraca i žena s MS-om, analizirat će se klinički odgovor ovisno o spolu bolesnika.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. provesti molekularno-genetičku analizu varijanti gena *CCR5* (rs333), *CTLA4* (rs231775, rs3087243) i *TNFRSF10A* (rs20576) koje potencijalno utječu na različit klinički odgovor u MS bolesnika liječenih IFN- β
2. odrediti distribuciju genotipova i alela polimorfizama *CCR5* (rs333), *CTLA4* (rs231775, rs3087243) i *TNFRSF10A* (rs20576) u MS bolesnika
3. usporediti učestalost genotipova i alela polimorfizama *CCR5* (rs333), *CTLA4* (rs231775, rs3087243) i *TNFRSF10A* (rs20576), pojedinačno i u kombinacijama, između bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β i onih bez odgovora na terapiju
4. utvrditi povezanost genotipova i alela polimorfizama *CCR5* (rs333), *CTLA4* (rs231775, rs3087243) i *TNFRSF10A* (rs20576), pojedinačno i u kombinacijama, s odgovorom na terapiju IFN- β ovisno o spolu
5. procijeniti utjecaj polimorfizama *CCR5* (rs333), *CTLA4* (rs231775, rs3087243) i *TNFRSF10A* (rs20576) u odgovoru na liječenje IFN- β s obzirom na tijek bolesti uzevši u obzir dob nastupa bolesti te stopu relapsa i EDSS prije početka terapije.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Vrsta istraživanja, ispitanici i prikupljanje materijala

Provedeno istraživanje je retrospektivno i uključuje osobe oboljele od MS-a liječene IFN- β kako bi se utvrdio potencijalni učinak određenih genskih varijanti na terapijski odgovor. Svi bolesnici prikupljeni su u okviru prethodnih znanstveno-istraživačkih projekata „Genetička analiza multiple skleroze“ (br. 062-1962766-0470), prihvaćenog 2007. godine i financiranog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, potom projekta „Genetska analiza multiple skleroze“ (Projekt 2014-2018. UNIRI: 13.06.1.1.10) kao i tijekom bilateralnih projekata hrvatsko-slovenske suradnje koji su se višekratno odvijali od 2006-2013. godine pod naslovima „Genetski čimbenici u multiploj sklerozi“ i „Farmakogenetika imunomodulacijske terapije u multiploj sklerozi i utjecaj genskih polimorfizama pojedinih metaboličkih puteva“.

Stoga su u istraživanju korišteni uzorci genomske DNA bolesnika iz genske baze MS registra Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinskog fakulteta u Rijeci i Kliničkog instituta za genomsku medicinu, UMC u Ljubljani. DNA je izolirana iz stanica limfocita periferne krvi prema standardnom protokolu proizvođača (Qiagen FlexiGene® DNA Kit (250), Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka i QIAamp® DNA Mini Kit (50), Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) te je pohranjena na -20°C u Tris-EDTA puferu na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci i/ili i Kliničkom institutu za genomsku medicinu, UMC u Ljubljani.

Svi bolesnici s klinički sigurnom MS prema McDonaldovim kriterijima klinički su obrađeni sukladno EDMUS (European Database for Multiple Sclerosis) protokolu. Stupnjevi invalidnosti izraženi su EDSS-om. Trajanje bolesti određeno je kao razdoblje (u godinama) između početnog nastupa bolesti do zadnjeg kliničkog pregleda, a indeks progresije (PI) kao odnos EDSS-a i trajanja bolesti, izračunat ukoliko bolest traje barem 5 godina. U trenutku uvođenja terapije IFN- β svi su bolesnici imali RRMS tijekom bolesti. Isključni kriterij istraživanja bio je primarno-progresivan (PP) tijekom bolesti s obzirom da terapija IFN- β nema učinka u ovih MS bolesnika. Epidemiološki i klinički podaci dobiveni su iz strukturiranih upitnika, koji su nakon razgovora s bolesnicima popunjeni prilikom prikupljanja uzoraka krvi za izolaciju DNA ili naknadno prilikom kliničkog praćenja bolesnika.

Klinički kriteriji za odgovor na IFN- β terapiju primijenjeni su nakon dvije godine liječenja. Bolesnici s RRMS podijeljeni su u dvije skupine: bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β (engl. *Responders* – Rs), kod kojih nije bilo recidiva i napredovanja bolesti prema EDSS-u i bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β (engl. *non-responders* – NRs), koji su imali jedan ili više relapsa i /ili povećanje EDSS-a od najmanje 1 bod nakon 6 mjeseci tijekom razdoblja praćenja.

U istraživanje je prvotno uključeno 304 MS bolesnika (234 žena i 70 muškaraca) na terapiji s IFN- β , od čega je Rs skupinu činilo 173 bolesnika (133 žena i 40 muškarca) s pozitivnim odgovorom na terapiju, dok su drugu NRs skupinu činila 122 bolesnika (97 žena i 25 muškarca) bez odgovora na terapiju. Prema kriterijima za Rs i NRs za devet bolesnika nismo imali odgovarajuće podatke prema kojima bismo ih sa sigurnošću uvrstili u jednu od navedenih skupina te je molekularno-genetička analiza provedena za ukupno 295 osoba oboljelih od MS-a čije su kliničke i demografske karakteristike prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Kliničke i demografske karakteristike MS bolesnika (N=295)

	Ukupno	Rs¹	NRs²
Žene/muškarci	3,5:1	3,3:1	3,8:1
Dob^a	39,2 \pm 8,9 (20 – 65)	39,1 \pm 8,6 (20 – 63)	39,3 \pm 9,3 (23 – 65)
Dob nastupa bolesti^a	28,1 \pm 7,8 (16 – 54)	28,9 \pm 7,6 (16 – 54)	27,2 \pm 8,2 (16 – 48)
Trajanje bolesti^a	10,4 \pm 6,9 (2 – 36)	9,6 \pm 6,4 (2 –33)	11,6 \pm 7,5 (2 – 36)
EDSS prije IFN-β^b	2,8 \pm 1,5 (0,5 – 7,5)	2,8 \pm 1,6 (0,5 – 7)	2,9 \pm 1,4 (1 – 7,5)
PI^b	0,36 \pm 0,26 (0,06 – 1,25)	0,32 \pm 0,22 (0,06 – 1,2)	0,38 \pm 0,25 (0,08–1,25)
MSSS^c	3,79 \pm 2,37 (0,16 – 9,83)	3,31 \pm 2,29 (0,17- 9,46)	4,48 \pm 2,31 (0,16 – 9,83)

¹ bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β
^asrednja vrijednost (godine) \pm SD

²bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β
^{b,c}srednja vrijednost \pm SD

3.2. Metode

3.2.1. Molekularno-genetička analiza

Cjelokupna genska analiza uzoraka MS bolesnika provedena je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku uključujući pripremu uzoraka, lančanu reakciju polimerazom (engl. *Poymerase chain reaction* –

PCR) i PCR - polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *Restriction fragment length polymorphism* – RFLP) te dijelom na Zavodu za anatomiju gdje je proveden lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*). DNA je izolirana iz stanica limfocita periferne krvi prema standardnom protokolu proizvođača (Qiagen FlexiGene® DNA Kit (250), Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka i QIAamp® DNA Mini Kit (50), Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) te je pohranjena na -20°C u Tris-EDTA puferu na Zavodu za medicinsku biologiju i genetiku, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci i Kliničkom institutu za genomsku medicinu, UMC u Ljubljani.

Koncentraciju i čistoću izolirane genomske DNA provjerili smo mjerenjem spektrofotometrom (Thermo Scientific BioMate 3, Thermo Electron Scientific Instrument Corporation, Madison, SAD) kako bi kvalitetom zadovoljila provođenje PCR-ova te radi izračuna količine uzorka potrebnog za Real-time PCR. Čistoća izolirane DNA bila je omjer apsorbancije A260/A280 u rasponu od 1,7 do 1,9 (za 98% uzoraka), dok se koncentracija kretala između 150 i 350 µg/ml.

3.2.1.1. Analiza polimorfizma $\Delta 32$ CCR5 gena

Prisutnost polimorfizma $\Delta 32$ CCR5 gena (rs333) utvrđena je PCR metodom. Umnožavanje ciljnog fragmenta DNA molekule odvijalo se u volumenu od 15 µl u termociklerima (Mastercycle personal, Eppendorf, Hamburg, Germany). Uzorci su analizirani u serijama od po 20 – 40 uzoraka uz negativnu kontrolu (bez DNA uzorka), pozitivnu kontrolu (uzorak DNA heterozigota) i DNA marker (50bp).

Uvjeti i početnice za PCR dati su u tablicama: slijed početnih oligonukleotida za analizu $\Delta 32$ CCR5 i temperatura spajanja (Ts) početnih oligonukleotida (tablica 2), sadržaj reakcijske smjese (tablica 3) te program PCR-a (tablica 4):

Tablica 2. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja (T_s) za analizu *CCR5-Δ32* polimorfizma

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida (5' - 3')	T_s (°C)
<i>CCR5-F</i>	5' CAA AAA GAA GGT CTT CAT TAC ACC 3'	59,0
<i>CCR5-R</i>	5' CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG 3'	59,0

Tablica 3. PCR reakcijska smjesa za *CCR5-Δ32* polimorfizam u konačnom volumenu od 15 μ l

	Volumen (μ l) za 1 uzorak	Konačna koncentracija
10x PCR pufer	1,50	1x PCR pufer
25 mM $MgCl_2$	0,90	1 mM
10 mM dNTP	0,30	0,05 mM
10x primer <i>CCR5-F</i>	0,75	0,2 μ M
10x primer <i>CCR5-R</i>	0,75	0,2 μ M
bidestilirana voda	10,15	
<i>Taq</i> polimeraza	0,15	1,5 U
DNA	0,50	

Tablica 4. Program PCR – temperaturni ciklusi, *CCR5-Δ32* polimorfizam

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
1.1	94 °C	1 min	5 x
1.2	55 °C	1 min	
1.3	72 °C	1 min	
2.1	94 °C	30 s	35 x
2.2	60 °C	30 s	
2.3	72 °C	45 s	

Amplificirani PCR produkti analizirani su gel-elektroforezom u trajanju od 45 min pri 85V na 3% agaroznom gelu u koji je prethodno dodano 0,1 mg/ml etidijevog bromida (2,5 μ l etidijevog bromida u 50 ml otopine gela). Po 10 ml PCR produkta i 1 ml brom-fenol modrila (engl. *bromophenol blue* - BPB) nanošeno je u jažice na gelu. PCR

produkti vizualizirani su pomoću transiluminatora Uvidoc HD6 (Uvitec, Cambridge, UK), pod UV lampom. Veličina PCR produkta utvrđena je primjenom DNA standarda (50 bp DNA ladder).

U prisustvu polimorfizma $\Delta 32$ *CCR5* gena dolazi do delecije 32 bp u *CCR5* genu za kemokinski receptor. Ovisno o migraciji PCR produkata na gelu razlikuju se homozigoti divljeg tipa, heterozigoti i homozigoti za ovu polimorfnu varijantu s tri moguća genotipa: wt/wt, wt/ $\Delta 32$ i $\Delta 32/\Delta 32$. U tablici 5. prikazana je očekivana veličina PCR produkata za sva tri genotipa.

Tablica 5. Veličina PCR produkata pri utvrđivanju *CCR5- $\Delta 32$* genotipova

Genotip	PCR produkt (bp)
wt/wt*	137
wt/ $\Delta 32$	105, 137
$\Delta 32/\Delta 32$	105

*Wt – divlji tip (engl – *wild type*)

3.2.1.2. Analiza polimorfizama *CTLA4* gena

Za utvrđivanje genskih polimorfizama *CTLA4* +49A/G (rs231775) i CT60A/G (rs3087243) korištena je metoda PCR- RFLP, koja nakon PCR reakcije uključuje i restrikciju s odgovarajućim enzimima (BstE II enzim za +49A/G polimorfizam i HpyCH4 IV enzim za CT60A/G polimorfizam). Uvjeti PCR-RFLP reakcije navedeni su u tablicama: slijed početnih oligonukleotida za analizu $\Delta 32$ *CCR5* i temperatura spajanja (T_s) početnih oligonukleotida (tablica 6), sadržaj reakcijske smjese (tablica 7) te program PCR-a (tablica 8). Umnažanje ciljnih fragmenata DNA molekule odvijalo se u volumenu od 10 μ l u termociklerima (Mastercycle personal, Eppendorf, Hamburg, Germany). Produkti PCR reakcije, kao i restrikcijski fragmenti nakon restrikcije, odvojeni su tehnikom agarozne gel-elektroforeze. Uzorci su analizirani u serijama od po 20 – 40 uzoraka uz negativnu kontrolu (bez DNA uzorka), pozitivnu kontrolu (uzorak DNA heterozigota) i DNA marker (50bp).

Tablica 6. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja (Ts) za analizu +49A/G i CT60 polimorfizama *CTLA4* gena

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida (5' - 3')	Ts (°C)
<i>CTLA4</i> +49 – F	5'AAGGCTCAGCTGAACCTGGT3'	54,0
<i>CTLA4</i> +49 – R	5'CTGCTGAAACAAATGAAACCC3'	54,0
<i>CTLA4</i> CT60 – F	5'GAGGTGAAGAACCTGTGTGGT3'	56,0
<i>CTLA4</i> CT60 – R	5'ATAATGCTTCATGAGTCAGCT3'	56,0

Tablica 7. PCR reakcijska smjesa za polimorfizme +49A/G i CT60 *CTLA4* gena u konačnom volumenu od 10 µl

	<i>CTLA4</i> +49A/G Količina (µl) za 1 uzorak	<i>CTLA4</i> CT60 Količina (µl) za 1 uzorak
10 x PCR pufer	1,0	1,0
50 mM MgCl	0,3	0,3
10 mM dNTP	0,2	0,2
10 x primer <i>CTLA4</i> +49-F	0,5	-
10 x primer <i>CTLA4</i> +49-R	0,5	-
10 x primer <i>CTLA4</i> CT60-F	-	0,33
10 x primer <i>CTLA4</i> CT60-R	-	0,33
bidestilirana voda	7,2	7,04
<i>Taq</i> polimeraza	0,1	0,1
DNA	0,7	0,7

Tablica 8. PCR – temperaturni ciklusi, *CTLA4* +49A/G i CT60 polimorfizmi

Korak	<i>CTLA4</i> +49A/G			<i>CTLA4</i> CT60		
	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
A.	94°C	3 min	1 x	94°C	5 min.	1 x
B.1.	94°C	40 s	32 x	94°C	30 sec.	30 x
B.2.	58°C	40 s		56°C	30 sec.	
B.3.	72°C	40 s		72°C	30 sec.	
C.	72°C	3 min	1 x	72°C	5 min	1 x

PCR produkti se provjeravaju elektroforezom u trajanju od 20 min pri 85V na 1,0% agaroznom gelu otopljenom u 0,5xTAE puferu. U gel se dodaje 0,1 mg/ml etidijevog bromida (2,5 µl etidijevog u 50 ml otopine gela). Elektroforeza traje 25 minuta pri 80V. Vizualizacija se vrši se transiluminatorom Uvidoc HD6 (Uvitec, Cambridge, UK) pod UV-lampom.

Nakon umnažanja i provjere ciljnog DNA fragmenta napravljena je restrikcija preko noći (16-18 h) na 37 °C u vodenoj kupelji prema uvjetima navedenim u tablici 9.

Tablica 9. Restrikcijska smjesa za analizu +49A/G i CT60 polimorfizama *CTLA4* gena

	<i>CTLA4</i> +49A/G Količina za 1 uzorak	<i>CTLA4</i> CT60 Količina za 1 uzorak
PCR produkt	5 µl	5 µl
10 x pufer	1 µl SB 10X	1 µl NE CutSmart 10X
enzim	0,2 µl <i>BstE II</i>	0,2 µl <i>HpyCH4IV</i>
bidestilirana voda	3,8 µl	3,8 µl

Restrikcijski fragmenti (5 µl produkta + 1 µl boje BPB) razdvojeni su elektroforezom (60 min pri 85 V) na 3% agaroznom gelu uz dodatak 2,5 µl etidium bromida (10mg/ml). Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu razlikovali su se homozigoti A/A, heterozigoti A/G i homozigoti G/G genotipa (tablice 10 i 11).

Tablica 10. Veličina PCR produkta i veličina restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi +49A/G polimorfizma *CTLA4* gena

Genotip	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragment (bp)		
<i>CTLA4</i> +49 A/A	152	152		
<i>CTLA4</i> +49 A/G	152	152	132	20
<i>CTLA4</i> +49 G/G	152		132	20

Tablica 11. Veličina PCR produkta i veličina restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi CT60 polimorfizma *CTLA4* gena

Genotip	PCR produkt (bp)	Restrikcijski fragment (bp)		
<i>CTLA4</i> CT60 A/A	178	178		
<i>CTLA4</i> CT60 A/G	178	178	107	71
<i>CTLA4</i> CT60 G/G	178		107	71

3.2.1.3. Analiza polimorfizma *TNFRSF10A* gena

Za analizu polimorfizma rs20576 *TNFRSF10A* gena korišten je Real-time PCR s TaqMan predizajnim esejem za genotipizaciju SNP-a: C__12102849_10 (Tablica 12) na uređaju StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, SAD) te softver za analizu diskriminacije alela dostupan uz uređaj.

Tablica 12. Opis TaqMan Assay C__12102849_10 za rs20576 polimorfizam *TNFRSF10A* gena

TaqMan Assay ID	Gen (SNP)	Pozicija	Aleli [VIC/FAM]	DNA sekvenca konteksta
C__12102849_10	<i>TNFRSF10A</i> (rs20576)	Chr.8:23200707 (GRCh38)	G/T	TGTACCTGATTCTTTGTGG ACACACI G/T CGATGTCACT CCAGGGCGTACAATC

Prije postupka Real-time PCR-a određena je koncentracija uzoraka izolirane DNA. Koncentracija je određivana spektrofotometrom (Thermo Scientific BioMate 3, Thermo Electron Scientific Instrument Corporation, Madison, SAD) nakon čega je za svaki uzorak DNA pripremljeno razrjeđenje konačne koncentracije 10 µg u 10 mL pomoću formule $c_1V_1=c_2V_2$. Reakcijska smjesa i uvjeti Real-time PCR-a navedeni su u tablicama 13 i 14.

Tablica 13. Reakcijska smjesa za Real-time PCR (konačni volumen 9 µL)

Sadržaj reakcijske smjese	Volumen (µL)
2x KAPA HRM FAST <i>Master Mix</i>	4,250
TagMan SNP <i>Genotyping Assays</i> , rs20576	0,255
Bidestilirana voda	3,995
DNA	0,500

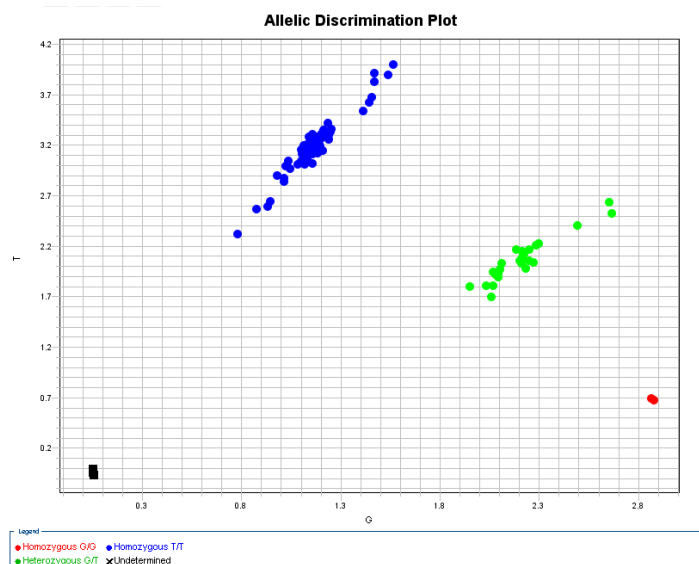
Pripremljena reakcijska smjesa u kojoj se nalazi *Master Mix*, SNP *Genotyping Assays* i bidestilirana voda rastočena je u volumene od po 8,5 µL u koje su dodani pojedinačni uzorci DNA (0,5 µL) nakon čega slijedi vorteksiranje (1000 okretaja u minuti). Reakcijska smjesa raspoređena je na ploču s 96 jažica, uzorci su rađeni u

duplikatu, kao i negativna kontrola. Slijedi Real-time PCR reakcija prema uvjetima navedenim u tablici 9.

Tablica 14. Real-time PCR temperaturni ciklusi

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme (mm:ss)	Broj ciklusa
Enzimaska aktivacija	95	03:00	1
Denaturacija	95	00:03	40
Hibridizacija/elongacija	60	00:40	

Real-time PCR reakcije interpretirana je pomoću StepOnePlus™ softvera, varijanta 2.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, SAD) gdje su Rn vrijednosti dobivene temeljem fluorescentnih signala svake jažice što određuje alele za svaki pojedini uzorak. Na Slici 1 prikazan je primjer rezultata alelne diskriminacije, gdje su vrijednosti za Alel 1 (VIC boja) uspoređene s vrijednostima za Alel 2 (FAM boja). Svaka jažica na ploči s 96 mjesta za uzorake prikazana je kao pojedinačna točka na slici s pripadajućim vrijednostima fluorescencije za obje boje (VIC i FAM).



Slika 1. Alelna diskriminacija postupkom Real-time PCR s vrijednosti Alela 1 (VIC boja) i Alela 2 (FAM boja)

3.3. Etički aspekti istraživanja

Ovo retrospektivno istraživanje provedeno je u okviru projekta „Farmakogenetika multiple skleroze: odgovor na imunomodulacijsku terapiju“ (uniri-biomed-18-137) financiranog od strane Sveučilišta u Rijeci. Uzorci genomske DNA za istraživanje prikupljeni su retrospektivno iz genske baze MS registra Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinskog fakulteta u Rijeci i Kliničkog instituta za genomsku medicinu, UMC u Ljubljani. Korišteni su isključivo DNA uzorci MS bolesnika liječenih IFN- β prikupljeni u sklopu prethodnih znanstveno-istraživačkih projekata genetskih istraživanja MS koji se nalaze pohranjeni u navedenim genskim DNA bazama.

Studija je provedena u skladu s etičkim smjernicama koje su osigurale pravilno provođenje istraživanja i sigurnost ispitanika. Istraživanjem je tako osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa, autonomnosti, pravednosti, dobročinstva i neškodljivosti, u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Medicinski podaci i humani materijal prikupljeni su u skladu s etičkim i bioetičkim principima, pri čemu je osigurana privatnost ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka korištenjem šifriranih uzoraka iz navedenih baza. Svi su ispitanici bili upoznati sa svrhom i metodologijom samog istraživanja, dobili su informacijski obrazac i tek nakon detaljnog objašnjenja i odgovora na eventualna pitanja potpisali su informativni pristanak za sudjelovanje u istraživanju gena kandidata uključenih u etiopatogenezu i odgovor na terapiju MS-a. Istraživanje genetičkih čimbenika u MS-u dobilo je etičko odobrenje u vrijeme projekata tijekom kojih su prikupljeni MS bolesnici, a ovo istraživanje odgovora na imunomodulacijsku terapiju IFN- β odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Rijeci (2170-24-04-3/1-22-4).

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je u računalnim programima Statistica za Windows, verzija 14.1.0.8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD) i MedCalc za Windows, verzija 14.12.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Za analizu kliničkih pokazatelja korištena je deskriptivna statistika (srednje vrijednosti, standardne devijacije), a usporedba normalno raspoređenih varijabli između skupina testirana je t-

testom/analizom varijance. U daljnoj statističkoj analizi korišteni su Fisherov egzaktni test i chi-kvadrat (χ^2) test za usporedbu učestalosti genotipova/alela kao i kombinacija polimorfizama svih gena između skupina te za provjeru odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Za analizu genetičke povezanosti korišteni su omjeri izgleda (engl. *odds ratio* – OR) i pripadajući 95%-tni intervali pouzdanosti (engl. *confidence intervals* – CI). Hardy–Weinbergova ravnoteža je procijenjena pomoću Simple Hardy-Weinberg Calculator-Court Lab (Washington State University of Veterinary Medicine, Pullman, WA, USA). Genetički modeli definirani su na sljedeći način: kodominantni (MM vs. Mm vs. mm), dominantni (MM vs. Mm + mm), recesivni (mm vs. Mm + MM) i overdominantni (MM + mm vs. Mm), gdje M predstavlja *major* alel, a m predstavlja *minor* alel. Kako bi se procijenio neovisni, ali i aditivni/epistatski učinak polimorfizama analiziranih gena na terapijski odgovor, provedena je multipla regresijska analiza koja je uključila sljedeće varijable: polimorfizme, dob nastupa bolesti, stope relapsa i vrijednosti EDSS-a prije početka primjene terapije IFN- β . Parcijalni koeficijenti korelacije izračunati su radi testiranja korelacija između pojedinih alela/genotipova i vrste terapijskog odgovora, pri čemu su kontrolirani dob nastupa bolesti, stope relapsa i vrijednosti EDSS-a prije liječenja IFN- β . Statistička značajnost postavljena je na razinu 0,05.

4. REZULTATI

4.1. Kliničke karakteristike bolesnika i odgovor na terapiju IFN-β

Od 295 bolesnika s MS-om uključenih u molekularno-genetičku analizu ove studije, 173 (58,6%) bolesnika klasificirano je s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β, a 122 (41,4%) bolesnika su bez odgovora na terapiju IFN-β. Kliničke karakteristike bolesnika sažete su u tablici 15. Uočen je trend prema kasnijoj pojavi bolesti i nižoj stopi relapsa kod bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β nego kod onih bez odgovora na terapiju (p = 0,083 odnosno p = 0,051). Srednja vrijednost EDSS-a na početku nije se značajno razlikovala između skupina s pozitivnim odgovorom na terapiju i onih bez odgovora na terapiju IFN-β (p = 0,623), ali su osobe bez odgovora na terapiju imale težu MS u krajnjoj točki ispitivanja (EDSS = 3,9 ± 1,6) nego osobe s pozitivnim odgovorom na terapiju (EDSS = 2,5 ± 1,6; p = 0,0001) (slika 4).

Tablica 15. Kliničke karakteristike svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Klinički podaci	MS bolesnici ukupno (N=295)		
	Rs ^a (N=173)	NRs ^b (N=122)	p
Dob nastupa bolesti ^c	28,9±7,6	27,2±8,2	0,083
Broj relapse u prethodne dvije godine ^d	1,7±1,1 (1-7)	2,0±1,2 (1-6)	0,051
EDSS prije početka terapije ^d	2,8±1,6 (0,5-7)	2,9±1,5 (1-7,5)	0,623
EDSS nakon ≥ 2 godina od početka terapije ^d	2,5±1,6 (1-6,5)	3,9±1,7 (1-7,5)	0,0001

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^csrednja vrijednost (godine) ± SD; ^dsrednja vrijednost ± SD

Kada su oboljeli od MS-a stratificirani prema spolu, trendovi uočeni u ukupnom uzorku (prema kasnijoj pojavi bolesti i nižoj stopi relapsa kod bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β nego kod onih bez odgovora na terapiju) (p = 0,098 i p = 0,074) te teži MS u krajnjoj točki ispitivanja (EDSS = 4,0 vs. 2,7; p = 0,0001) bili su prvenstveno vidljivi kod bolesnica (slika 2), ali nije primijećena značajna razlika u

kliničkim karakteristikama između muških bolesnika koji su pozitivno odgovorili i onih koji nisu odgovorili na terapiju IFN-β (tablica 16).

Tablica 16. Kliničke karakteristike osoba oboljelih od MS-a (N=295) prema spolu i odgovor na terapiju IFN-β

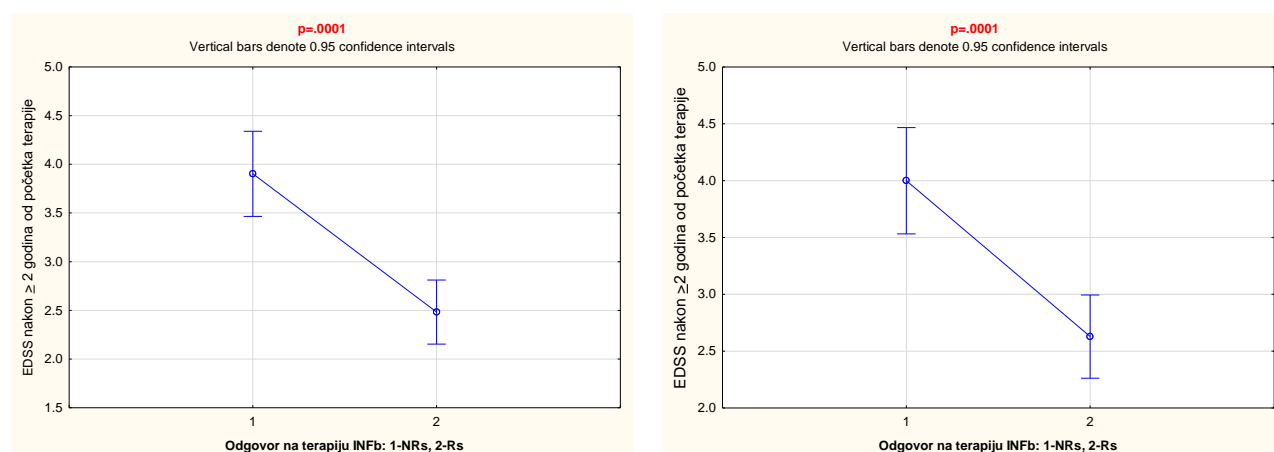
Klinički podaci	MS muškarci (N=65)			MS žene (N=230)		
	Rs ^a (N=40)	NRs ^b (N=25)	p	Rs ^a (N=133)	NRs ^b (N=97)	p
Dob nastupa bolesti ^c	29,2±6,9	28,4±7,6	0,662	28,8±7,8	26,9±8,3	0,098
Broj relapse u protekle dvije godine ^d	1,6±1,0 (1-5)	1,8±1,1 (1-4)	0,559	1,8±1,2 (1-7)	2,1±1,2 (1-6)	0,074
EDSS prije početka terapije ^d	2,7±1,6 (1-6,5)	2,1±2,2 (1-7,5)	0,355	2,8±1,6 (0,5-7)	3,0±1,3 (1-5,5)	0,349
EDSS nakon ≥2 god. od početka terapije ^d	2,0±1,0 (1-4)	3,1±2,8 (1-7,5)	0,156	2,7±1,7 (0,5-6,5)	4,0±1,5 (1-7)	0,0001

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^csrednja vrijednost (godine) ± SD; ^dsrednja vrijednost ± SD

Značajno niže vrijednosti EDSS-a (p=0,0001) u svih MS bolesnika i MS bolesnica s pozitivnim odgovorom na terapiju naspram onih bez odgovora na terapiju IFN-β prikazuje slika 2.



Slika 2. EDSS nakon ≥2 godina od početka terapije prema odgovoru na liječenje IFN-β u: a) svih MS bolesnika (za Rs - 2,5±1,6, za NRs - 3,9±1,7); b) žena oboljelih od MS (za Rs - 2,7±1,7, za NRs - 4,0±1,5)

4.2. Utjecaj CCR5 gena u odgovoru na terapiju IFN-β

Očekivanu prevalenciju homozigota i heterozigota za polimorfizam CCR5-Δ32 (rs333) izračunali smo pomoću Hardy-Weinbergove jednadžbe: $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ (p - frekvencija *major* alela; q - frekvencija *minor* alela). Nismo utvrdili odstupanje molekularno-genetičkom analizom utvrđene distribucije genotipova od izračunate distribucije genotipova (p=0,843 za Rs i p=0,568 za NRs) što potvrđuje da su ispitivane skupine bolesnika u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.

Tablica 17 prikazuje distribuciju učestalosti CCR5-Δ32 genotipova i alela, a usporedbom učestalosti CCR5-Δ32 genotipova i alela između skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike (p>0,05).

Tablica 17. Učestalost genotipova i alela Δ32 polimorfizma (rs333) CCR5 gena u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Genotip / alel	MS bolesnici ukupno (N=295)			
	Rs ^a (N=173) (%)	NRs ^b (N=122) (%)	p	OR (95% CI) ^c
CCR5^d-Δ32				
wtwt*	150 (86,7)	110 (90,2)	0,517	0,71 (0,34 – 1,49)
wtΔ32	22 (12,7)	12 (9,8)		1,34 (0,63 -2,81)
Δ32Δ32	1 (0,6)	0 (0,0)		-
Wt				
Wt	93,1	95,1	0,313	0,69 (0,34 - 1,42)
Δ32	6,9	4,9		1,44 (0,71 – 2,94)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

Tablica 18 prikazuje analizu povezanosti genetičkih modela (kodominantni - wtwt vs. wtΔ32 vs. Δ32 Δ32, dominantni - wtΔ32 + Δ32Δ32 vs. wtwt, recesivni - Δ32Δ32 vs. wtΔ32 + wtwt i overdominantni - wtΔ32 vs. wtwt + Δ32Δ32) s odgovorom na terapiju IFN-β u MS bolesnika pri čemu nisu utvrđene statistički značajne razlike (p>0,05).

Tablica 18. Povezanost genetičkih modela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u svih MS bolesnika (N=295)

	MS bolesnici ukupno (N=295)			
	Rs ^a (N=173) (%)	NRs ^b (N=122) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model CCR5^d-$\Delta 32$				
Kodominantni				
wtwt* vs. wt$\Delta 32$	150 (86,7) : 22 (12,7)	110 (90,2) : 12 (9,8)	0,436	0,74 (0,35 – 1,56)
wtwt vs. $\Delta 32\Delta 32$	150 (86,7) : 1 (0,6)	110 (90,2) : 0 (0,0)	-	-
wt$\Delta 32$ vs. $\Delta 32\Delta 32$	22 (12,7) : 1 (0,6)	12 (9,8) : 0 (0,0)	-	-
Dominantni				
wt$\Delta 32$ + $\Delta 32\Delta 32$ vs. Wtw	23 (13,3) : 150 (86,7)	12 (9,8) : 110 (90,2)	0,367	1,41 (0,67 – 2,95)
Recesivni				
$\Delta 32\Delta 32$ vs. wt$\Delta 32$ + wtwt	1 (0,6) : 172 (99,4)	0 (0,0) : 122 (100,0)	-	-
Overdominantni				
wt$\Delta 32$ vs. wtwt + $\Delta 32\Delta 32$	22 (12,7) : 151 (87,3)	12 (9,8) : 110 (90,2)	0,447	1,35 (0,63 – 2,81)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

Nakon podjele MS bolesnika prema spolu nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između Rs i NRs bolesnika u frekvencijama alela i genotipova kod muškaraca, N=65 (tablica 19) i žena, N=230 (tablica 21), niti u učestalosti genetičkih modela (tablice 20 i 22).

Tablica 19. Učestalost genotipova i alela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Genotip / alel	MS muškarci (N=65)			
	Rs ^a (N=40) (%)	NRs ^b (N=25) (%)	p	OR (95% CI) ^c
CCR5^d-$\Delta 32$				
wtwt*	35 (87,5)	23 (92,0)	0,488	0,61 (0,11 – 3,41)
wt$\Delta 32$	5 (12,5)	2 (8,0)		1,64 (0,29 -9,19)
$\Delta 32\Delta 32$	0 (0,0)	0 (0,0)		-
wt	93,8	96,0	0,451	0,63 (0,12 - 3,35)
$\Delta 32$	6,2	4,0		1,60 (0,30 – 8,58)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

Tablica 20. Povezanost genetičkih modela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65)

	MS muškarci (N=65)			
	Rs ^a (N=40) (%)	NRs ^b (N=25) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model CCR5^d-$\Delta 32$				
Kodominantni				
wtwt* vs. wt$\Delta 32$	35 (87,5) : 5 (12,5)	23 (92,0) : 2 (8,0)	0,572	0,61 (0,11 – 3,40)
wtwt vs. $\Delta 32\Delta 32$	35 (87,5) : 0 (0,0)	23 (92,0) : 0 (0,0)	-	-
wt$\Delta 32$ vs. $\Delta 32\Delta 32$	5 (12,5) : 0 (0,0)	2 (8,0) : 0 (0,0)	-	-
Dominantni				
wt$\Delta 32$ + $\Delta 32\Delta 32$ vs. wtwt	5 (12,5) : 35 (87,5)	2 (8,0) : 23 (92,0)	0,572	1,64 (0,29 – 9,19)
Recesivni				
$\Delta 32\Delta 32$ vs. wt$\Delta 32$ + wtwt	0 (0,0) : 40 (100,0)	0 (0,0) : 25 (100,0)	-	-
Overdominantni				

wtΔ32 vs. wtwt + Δ32Δ32	5 (12,5) : 35 (87,5)	2 (8,0) : 23 (92,0)	0,572	1,64 (0,29 – 9,19)
--	----------------------	---------------------	-------	--------------------

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

Tablica 21. Učestalost genotipova i alela Δ 32 polimorfizma (rs333) CCR5 gena u žena oboljelih od MS-a (N=230) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Genotip / alel	MS žene (N=230)			
	Rs ^a (N=133) (%)	NRs ^b (N=97) (%)	p	OR (95% CI) ^c
CCR5^d-Δ32				
wtwt*	115 (86,5)	87 (89,7)	0,580	0,73 (0,32 – 1,67)
wt Δ 32	17 (12,8)	10 (10,3)		1,28 (0,56 -2,92)
Δ 32 Δ 32	1 (0,7)	0		-
wt	92,9	94,8	0,392	0,71 (0,32 - 1,56)
Δ 32	7,1	5,2		1,42 (0,64 – 3,12)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

Tablica 22. Povezanost genetičkih modela Δ 32 polimorfizma (rs333) CCR5 gena s odgovorom na liječenje IFN- β u žena oboljelih od MS-a (N=230)

Genetički model CCR5 ^d - Δ 32	MS žene (N=230)			
	Rs ^a (N=133) (%)	NRs ^b (N=97) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Kodominantni				
wtwt* vs. wt Δ 32	115 (86,5) : 17 (12,8)	87 (89,7) : 10 (10,3)	0,552	0,78 (0,34 – 1,78)
wtwt vs. Δ 32 Δ 32	115 (86,5) : 1 (0,7)	87 (89,7) : 0 (0,0)	-	-
wt Δ 32 vs. Δ 32 Δ 32	17 (12,8) : 1 (0,7)	10 (10,3) : 0 (0,0)	-	-
Dominantni				
wt Δ 32 + Δ 32 Δ 32 vs. wtwt	18 (13,5) : 115 (86,5)	10 (10,3) : 87 (89,7)	0,461	1,36 (0,60 – 3,10)

Recesivni				
Δ32Δ32 vs. wtΔ32 + wtwt	1 (0,7) : 132 (99,2)	0 (0,0) : 97 (100,0)	-	-
Overdominantni				
wtΔ32 vs. wtwt + Δ32Δ32	17 (12,8) : 116 (87,2)	10 (10,3) : 87 (89,7)	0,566	1,28 (0,56 – 2,92)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

Provedena multipla regresijska analiza nije pokazala značajnu povezanost ($p > 0,05$) između odgovora na terapiju IFN-β i pojedinačnog *CCR5-Δ32* genotipa kod MS bolesnika, uzevši pri tome grupe MS bolesnika koji su pozitivno odgovorili i one koji nisu odgovorili na terapiju IFN-β kao zavisnu varijablu, dok su nezavisne varijable (prediktori) bile: dob početka bolesti, stopa relapsa i EDSS prije početka liječenja. Osim toga niti nakon stratifikacije prema spolu dob početka bolesti, stopa relapsa i EDSS prije liječenja nisu bili povezani s odgovorom na liječenje u kombinaciji s *CCR5-Δ32* varijantom, niti kod muškaraca niti kod žena.

4.3. Utjecaj *CTLA4* gena u odgovoru na terapiju IFN-β

Oba ispitivana polimorfizma *CTLA4* gena, +49 A/G (rs231775) i CT60 A/G (rs3087243), u naših skupina MS bolesnika nalaze se u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (za Rs $p=0,138$ i $p=0,265$; za NRs $p=0,783$ i $p=0,557$).

4.3.1. *CTLA4* +49 A/G polimorfizam (rs231775)

Učestalost *CTLA4* +49 A/G genotipova, alela (tablica 23) i genetičkih modela (tablica 24) u MS bolesnika koji su pozitivno odgovorili i onih koji nisu odgovorili na terapiju IFN-β nije se statistički značajno razlikovala ($p > 0,05$).

Tablica 23. Učestalost genotipova i alela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Genotip / alel	MS bolesnici ukupno (N=295)			
	Rs ^a (N=173) (%)	NRs ^b (N=122) (%)	p	OR (95% CI) ^c
CTLA4^d +49 A/G				
AA	72 (41,6)	40 (32,8)	0,273	1,46 (0,90 – 2,37)
AG	72 (41,6)	61 (50,0)		0,71 (0,45 – 1,14)
GG	29 (16,8)	21 (17,2)		0,97 (0,52 – 1,79)
A	62,2	57,8	0,256	1,21 (0,87 – 1,70)
G	37,8	42,2		0,82 (0,59 – 1,15)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Tablica 24. Povezanost genetičkih modela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN-β u svih MS bolesnika (N=295)

	Ukupno (N=295)			
	Rs ^a (N=173) (%)	NRs ^b (N=122) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model CTLA4^d +49 A/G				
Kodominantni				
AA vs. AG	72 (41,6) : 72 (41,6)	40 (32,8) : 61 (50,0)	0,109	1,52 (0,91 – 2,55)
AA vs. GG	72 (41,6) : 29 (16,8)	40 (32,8) : 21 (17,2)	0,446	1,30 (0,66 – 2,58)
AG vs. GG	72 (41,6) : 29 (16,8)	61 (50,0) : 21 (17,2)	0,639	0,85 (0,44 – 1,65)
Dominantni				
AG + GG vs. AA	101 (58,4) : 72 (41,6)	82 (67,2) : 40 (32,8)	0,123	0,68 (0,42 – 1,11)
Recesivni				
GG vs. AG + AA	29 (16,8) : 144 (83,2)	21 (17,2) : 101 (82,8)	0,920	0,97 (0,52 – 1,79)
Overdominantni				
AG vs. AA + GG	72 (41,6) : 101 (58,4)	61 (50,0) : 61 (50,0)	0,154	0,71 (0,45 – 1,14)

- ^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β
^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β
^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti
^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Nakon podjele MS bolesnika prema spolu, nisu utvrđene statističke značajnosti ($p > 0,05$) u distribuciji genotipova i frekvenciji alela *CTLA4* +49 A/G (tablica 25) niti u učestalosti genetičkih modela (tablica 26) između muškaraca koji su pozitivno odgovorili i onih koji nisu odgovorili na terapiju IFN- β . Međutim, statistički značajno veća prevalencija *CTLA4* +49 AA genotipa prisutna je u žena s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β (42,1%) u odnosu na žene koje nisu adekvatno odgovorile na terapiju IFN- β (28,9%, $p = 0,039$; OR = 1,79; 95%CI = 1,02–3,13) (tablica 27). Također, statističku značajnost u skupini MS žena (tablica 28) pokazuju i *CTLA4* +49 A/G genetički modeli: kodominantni AA vs. AG ($p = 0,042$; OR = 1,85; 95%CI = 1,02–3,36) i dominantni model AG + GG vs. AA ($p = 0,039$; OR = 0,56; 95%CI = 0,3 –0,98).

Tablica 25. Učestalost genotipova i alela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Genotip / alel	MS muškarci (N=65)			
	Rs ^a (N=40) (%)	NRs ^b (N=25) (%)	p	OR (95% CI) ^c
<i>CTLA4</i>^d +49 A/G				
AA	16 (40,0)	12 (48,0)	0,655	0,72 (0,26 – 1,98)
AG	18 (45,0)	11 (44,0)		1,04 (0,38 - 2,85)
GG	6 (15,0)	2 (8,0)		2,03 (0,38 -10,95)
A				
A	62,5	68,0	0,382	0,71 (0,34 - 1,52)
G	37,5	32,0		1,40 (0,66 – 2,98)

- ^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β
^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β
^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti
^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Tablica 26. Povezanost genetičkih modela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN-β u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65)

	MS muškarci (N=65)			
	Rs ^a (N=40) (%)	NRs ^b (N=25) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model <i>CTLA4</i>^d +49 A/G				
Kodominantni				
AA vs. AG	16 (40,0) : 18 (45,0)	12 (48,0) : 11 (44,0)	0,705	0,82 (0,28 – 2,35)
AA vs. GG	16 (40,0) : 6 (15,0)	12 (48,0) : 2 (8,0)	0,368	0,44 (0,08 – 2,60)
AG vs. GG	18 (45,0) : 6 (15,0)	11 (44,0) : 2 (8,0)	0,502	0,55 (0,09 – 3,19)
Dominantni				
AG + GG vs. AA	24 (60,0) : 16 (40,0)	13 (52,0) : 12 (48,0)	0,526	1,38 (0,51 – 3,79)
Recesivni				
GG vs. AG + AA	6 (15,0) : 34 (85,0)	2 (8,0) : 23 (92,0)	0,415	2,03 (0,38–10,95)
Overdominantni				
AG vs. AA + GG	18 (45,0) : 22 (55,0)	11 (44,0) : 14 (56,0)	0,937	1,04 (0,38 – 2,85)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Tablica 27. Učestalost genotipova i alela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena u žena oboljelih od MS-a (N=230) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Genotip / alel	MS žene (N=230)			
	Rs ^a (N=133) (%)	NRs ^b (N=97) (%)	p	OR (95% CI) ^c
<i>CTLA4</i>^d +49 A/G				
AA	56 (42,1)	28 (28,9)	0,114	1,79 (1,02 – 3,13)*
AG	54 (40,6)	50 (51,5)		0,64 (0,38 – 1,09)
GG	23 (17,3)	19 (19,6)		0,86 (0,44 – 1,68)
A	62,2	54,9	0,094	1,38 (0,95 - 2,01)
G	37,8	45,1		0,73 (0,50 – 1,06)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

*statistička značajnost između Rs i NRs za *CTLA4* +49 AA genotip, p=0,039

Tablica 28. Povezanost genetičkih modela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN-β u žena oboljelih od MS-a (N=230)

	MS žene (N=230)			
	Rs ^a (N=133) (%)	NRs ^b (N=97) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model <i>CTLA4</i>^d +49 A/G				
Kodominantni				
AA vs. AG	56 (42,1) : 54 (40,6)	28 (28,9) : 50 (51,5)	0,042	1,85 (1,02 – 3,36)
AA vs. GG	56 (42,1) : 23 (17,3)	28 (28,9) : 19 (19,6)	0,194	1,65 (0,77 – 3,53)
AG vs. GG	54 (40,6) : 23 (17,3)	50 (51,5) : 19 (19,6)	0,756	0,89 (0,43 – 1,83)
Dominantni				
AG + GG vs. AA	77 (57,9) : 56 (42,1)	69 (71,1) : 28 (28,9)	0,039	0,56 (0,32 – 0,98)
Recesivni				
GG vs. AG + AA	23 (17,3) : 110 (82,7)	19 (19,6) : 78 (80,4)	0,657	0,86 (0,44–1,68)
Overdominantni				
AG vs. AA + GG	54 (40,6) : 79 (59,4)	50 (51,5) : 47 (48,5)	0,100	0,64 (0,38 – 1,09)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Iako u ukupnom uzorku MS bolesnika multipla regresijska analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost ($p > 0,05$) *CTLA4* +49 A/G polimorfizma s odgovorom na terapiju, nakon stratifikacije prema spolu utvrđeno je da prisutnost genotipa *CTLA4* +49 AA značajno predviđa pozitivan odgovor na terapiju IFN-β kod MS bolesnica ($\beta = 0,211$; promjena R^2 : 0,045; $p = 0,011$), doprinoseći 4,5% varijabilnosti odgovora. Značajan utjecaj genotipa AA na odgovor na terapiju IFN-β u ovoj skupini MS bolesnica potvrđen je analizom parcijalnog koeficijenta korelacije ($r = 0,231$; $p = 0,006$).

4.3.2. *CTLA4* CT60 A/G polimorfizam (rs3087243)

Usporedbom učestalosti *CTLA4* CT60 A/G genotipova, alela (tablica 29) i genetičkih modela (tablica 30) između skupina bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β i onih koji nisu adekvatno odgovorili na terapiju nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u svih MS bolesnika kao niti nakon stratifikacije bolesnika prema spolu (tablice 31, 32, 33 i 34).

Tablica 29. Učestalost genotipova i alela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Genotip / alel	MS bolesnici ukupno (N=295)			
	Rs ^a (N=173) (%)	NRs ^b (N=122) (%)	p	OR (95% CI) ^c
<i>CTLA4</i>^d CT60 A/G				
AA	37 (21,4)	21 (17,2)	0,496	1,31 (0,72 – 2,37)
AG	78 (45,1)	63 (51,7)		0,77 (0,48 – 1,22)
GG	58 (33,5)	38 (31,1)		1,11 (0,68 – 1,83)
A	43,9	43,0	0,829	1,03 (0,75 – 1,44)
G	56,1	57,0		0,96 (0,69 – 1,34)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Tablica 30. Povezanost genetičkih modela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN-β u svih MS bolesnika (N=295)

	Ukupno (N=295)			
	Rs ^a (N=173) (%)	NRs ^b (N=122) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model <i>CTLA4</i>^d CT60 A/G*				
Kodominantni				
AA vs. AG	37 (21,4) : 78 (45,1)	21 (17,2) : 63 (51,7)	0,272	1,42 (0,76 – 2,67)
AA vs. GG	37 (21,4) : 58 (33,5)	21 (17,2) : 38 (31,1)	0,676	1,15 (0,59 – 2,26)

AG vs. GG	78 (45,1) : 58 (33,5)	63 (51,7) : 38 (31,1)	0,436	0,81 (0,48 – 1,37)
Dominantni				
AG + AA vs. GG	115 (66,5) : 58 (33,5)	84 (68,9) : 38 (31,1)	0,668	0,90 (0,55 – 1,47)
Recesivni				
AA vs. AG + GG	37 (21,4) : 136 (78,6)	21 (17,2) : 101 (82,8)	0,375	1,30 (0,72 – 2,37)
Overdominantni				
AG vs. AA + GG	78 (45,1) : 95 (54,9)	63 (51,7) : 59 (48,3)	0,268	0,77 (0,48 – 1,22)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCTLA4 - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

*Genetički model pretpostavlja A alel kao *minor* alel

Tablica 31. Učestalost genotipova i alela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Genotip / alel	MS muškarci (N=65)			
	Rs ^a (N=40) (%)	NRs ^b (N=25) (%)	p	OR (95% CI) ^c
CTLA4^d CT60 A/G				
AA	13 (32,5)	4 (16,0)	0,153	2,53 (0,72 – 8,89)
AG	16 (40,0)	16 (64,0)		0,38 (0,13 – 1,05)
GG	11 (27,5)	5 (20,0)		2,03 (0,38–10,95)
A	52,5	48,0	0,618	1,20 (0,59 – 2,43)
G	47,5	52,0		0,84 (0,41 – 1,70)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCTLA4 - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Tablica 32. Povezanost genetičkih modela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN-β u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65)

	MS muškarci (N=65)			
	Rs ^a (N=40) (%)	NRs ^b (N=25) (%)	p	OR (95% CI) ^c

Genetički model <i>CTLA4</i>^d CT60 A/G*				
Kodominantni				
AA vs. AG	13 (32,5) : 16 (40,0)	4 (16,0) : 16 (64,0)	0,080	3,25 (0,87 - 12,14)
AA vs. GG	13 (32,5) : 11 (27,5)	4 (16,0) : 5 (20,0)	0,620	1,48 (0,32 – 6,90)
AG vs. GG	16 (40,0) : 11 (27,5)	16 (64,0) : 5 (20,0)	0,222	0,45 (0,13 – 1,61)
Dominantni				
AG + AA vs. GG	29 (72,5) : 11 (27,5)	20 (52,0) : 5 (20,0)	0,496	0,66 (0,20 – 2,19)
Recesivni				
AA vs. AG + GG	13 (32,5) : 27 (67,5)	4 (16,0) : 21 (84,0)	0,418	2,53 (0,72 – 8,89)
Overdominantni				
AG vs. AA + GG	16 (40,0) : 24 (60,0)	16 (64,0) : 9 (36,0)	0,063	0,38 (0,13 – 1,05)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

*Genetički model pretpostavlja A alel kao *minor* alel

Tablica 33. Učestalost genotipova i alela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena u žena oboljelih od MS-a (N=230) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Genotip / alel	MS žene (N=230)			
	Rs ^a (N=133) (%)	NRs ^b (N=97) (%)	p	OR (95% CI) ^c
<i>CTLA4</i>^d CT60 A/G				
AA	24 (18,1)	17 (17,5)	0,114	1,04 (0,52 – 2,06)
AG	62 (46,6)	47 (48,5)		0,93 (0,55 – 1,57)
GG	47 (35,3)	33 (34,0)		1,06 (0,61 – 1,84)
A	41,4	41,8	0,156	1,32 (0,90 – 1,95)
G	58,6	48,2		0,76 (0,51 – 1,11)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Tablica 34. Povezanost genetičkih modela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN-β u žena oboljelih od MS-a (N=230)

	MS žene (N=230)			
	Rs ^a (N=133) (%)	NRs ^b (N=97) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model <i>CTLA4</i>^d CT60 A/G*				
Kodominantni				
AA vs. AG	24 (18,1) : 62 (46,6)	17 (17,5) : 47 (48,5)	0,855	1,07 (0,52 – 2,22)
AA vs. GG	24 (18,1) : 47 (35,3)	17 (17,5) : 33 (34,0)	0,982	0,99 (0,46 – 2,13)
AG vs. GG	62 (46,6) : 47 (35,3)	47 (48,5) : 33 (34,0)	0,797	0,93 (0,52 – 1,66)
Dominantni				
AG + AA vs. GG	86 (64,7) : 47 (35,3)	64 (66,0) : 33 (34,0)	0,836	0,94 (0,54 – 1,64)
Recesivni				
AA vs. AG + GG	24 (18,1) : 109 (82,0)	17 (17,5) : 80 (82,5)	0,919	1,04 (0,52 – 2,06)
Overdominantni				
AG vs. AA + GG	62 (46,6) : 71 (53,4)	47 (48,5) : 50 (51,5)	0,783	0,93 (0,55 – 1,57)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

*Genetički model pretpostavlja A alel kao *minor* alel

Multipla regresijska analiza nije pokazala značajnu povezanost ($p > 0,05$) između odgovora na terapiju IFN-β i pojedinačnog *CTLA4* CT60 A/G genotipa kod MS bolesnika. Osim toga, dob početka bolesti, stopa relapsa i EDSS prije početka terapije nisu bili povezani ($p > 0,05$) s odgovorom na liječenje IFN-β u kombinaciji s ovom genskom varijantom, niti kod muškaraca niti kod žena.

4.3.3. Međudjelovanje +49 i CT60 polimorfizama *CTLA4* gena

Kako bi ispitali međudjelovanje *CTLA4* +49 (rs231775) i CT60 (rs3087243) polimorfizama u odgovoru na terapiju IFN- β usporedili smo kombinacije genotipova između skupine s pozitivnim odgovorom na terapiju i onih bez odgovora na terapiju IFN- β (tablica 35). Kombinacija heterozigotnih *CTLA4* +49 i CT60 genotipova AG/AG statistički je značajno rjeđa (26,0%) u skupini MS bolesnika bez adekvatnog odgovora na terapiju nego u Rs skupini (38,5%) MS bolesnika ($p = 0,023$; OR = 0,56; 95%CI = 0,34 -0,92). Zbog vrlo niske učestalosti pojedinih genotipova za njih OR nije izračunat, a iz istog razloga niske učestalosti kombinacije genotipa *CTLA4* +49/CT60 AG/AA interpretacija OR-a je ograničena.

Tablica 35. Distribucija kombinacija *CTLA4* 49+ i CT60 genotipova u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN- β

	MS bolesnici ukupno (N=295)			
	Rs ^a (N=173) (%)	NRs ^b (N=122) (%)	p	OR (95% CI)
Kombinacija genotipova <i>CTLA4</i> +49/CT60				
AA / AA	32 (18,5)	20 (16,4)	0,625	1,17 (0,63 – 2,15)
AA / AG	32 (18,5)	15 (12,4)	0,148	1,63 (0,84 – 3,16)
AA / GG	8 (4,6)	5 (4,1)	0,829	1,13 (0,36 – 3,56)
AG / AA	4 (2,3)	1 (0,9)	0,349	2,86 (0,32 – 25,94)
AG / AG	45 (26,0)	47 (38,5)	0,023	0,56 (0,34 -0,92)
AG / GG	23 (13,3)	13 (8,4)	0,496	1,13 (0,62 – 2,65)
GG / AA	1 (0,6)	0 (0,0)	-	-
GG / AG	1 (0,6)	1 (0,9)	-	-
GG / GG	27 (15,6)	20 (16,4)	0,856	0,94 (0,50 – 1,77)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Nakon podjele MS bolesnika prema spolu, nisu utvrđene statističke značajnosti ($p > 0,05$) u distribuciji kombinacije genotipova *CTLA4* +49 (rs231775) i CT60 (rs3087243) između muškaraca koji su pozitivno odgovorili i onih koji nisu odgovorili

na terapiju IFN- β (tablica 36). Međutim, statistički značajno veća prevalencija kombinacije genotipa *CTLA4* +49/CT60 AA/AG prisutna je u žena s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β (21,1%) u odnosu na žene koje nisu adekvatno odgovorile na terapiju IFN- β (8,3%, $p = 0,011$; OR = 2,97; 95%CI = 1,29–6,84), dok je statistički značajno manja prevalencija kombinacije heterozigotnih genotipova *CTLA4* +49/CT60 AG/AG u žena s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β (24,8%) u odnosu na žene koje nisu adekvatno odgovorile na terapiju IFN- β (39,2%, $p = 0,021$; OR = 0,51; 95%CI = 0,29–0,90) (tablica 37).

Tablica 36. Distribucija kombinacija *CTLA4* 49+ i CT60 genotipova u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65) prema odgovoru na liječenje IFN- β

	MS muškarci (N=65)			
	Rs ^a (N=40) (%)	NRs ^b (N=25) (%)	p	OR (95% CI)
Kombinacija genotipova <i>CTLA4</i> +49/CT60				
AA / AA	12 (30,0)	4 (16,0)	0,209	2,25 (0,63 – 7,97)
AA / AG	4 (10,0)	7 (28,0)	0,070	0,29 (0,74 – 1,11)
AA / GG	0 (0,0)	1 (4,0)	-	-
AG / AG	12 (30,0)	9 (36,0)	0,615	0,76 (0,26 -2,20)
AG / GG	5 (12,5)	2 (8,0)	0,572	1,64 (0,29 – 9,20)
GG / GG	6 (15,0)	2 (8,0)	0,411	2,03 (0,38 – 10,95)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Tablica 37. Distribucija kombinacija *CTLA4* 49+ i CT60 genotipova u žena oboljelih od MS-a (N=230) prema odgovoru na liječenje IFN- β

	MS žene (N=230)			
	Rs ^a (N=133) (%)	NRs ^b (N=97) (%)	p	OR (95% CI)
Kombinacija genotipova <i>CTLA4</i> +49/CT60				
AA / AA	20 (15,0)	16 (16,5)	0,764	0,90 (0,44 – 1,83)
AA / AG	28 (21,1)	8 (8,3)	0,011	2,97 (1,29 – 6,84)
AA / GG	8 (6,0)	4 (4,1)	0,526	1,49 (0,44 – 5,09)

AG / AG	33 (24,8)	38 (39,2)	0,021	0,51 (0,29 - 0,90)
AG / GG	18 (13,5)	11 (11,3)	0,621	1,22 (0,55 – 2,72)
GG / GG	21 (15,8)	18 (18,6)	0,581	0,83 (0,41 – 1,64)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Multipla regresijska analiza pokazala je statistički značajnu povezanost ($p=0,006$) kombinacije genotipova *CTLA4* +49/*CT60* AA/AG s odgovorom na terapiju, pri čemu ova kombinacija značajno predviđa pozitivan odgovor na terapiju IFN- β kod svih MS bolesnika ($\beta = 0,199$; promjena R^2 : 0,039; $p = 0,006$), doprinoseći 3,9% varijabilnosti odgovora. Značajan utjecaj kombinacije genotipova *CTLA4* +49/*CT60* u odgovoru na terapiju IFN- β u MS bolesnika potvrđen je analizom parcijalnog koeficijenta korelacije ($r = 0,200$; $p = 0,006$). Povezanost je utvrđena i u skupini MS bolesnica s obzirom na odgovor na terapiju IFN- β : kombinacija genotipova značajno predviđa pozitivan odgovor na terapiju IFN- β kod MS žena ($\beta = 0,228$; promjena R^2 : 0,052; $p = 0,005$), doprinoseći 5,2% varijabilnosti odgovora. Povrh toga, utvrđena je statistički značajna povezanost ($p=0,005$) ove kombinacije *CTLA4* +49/*CT60* AA/AG genotipa i kasnije dobi nastupa bolesti s pozitivnim odgovorom na terapiju prisutna u svih MS bolesnika ($\beta = 0,202$; promjena R^2 : 0,060; $p = 0,005$), doprinoseći s 6,0% varijabilnosti odgovora.

Nadalje, kombinacija heterozigotnih genotipova *CTLA4* +49/*CT60* AG/AG značajno predviđa negativan odgovor na terapiju IFN- β kod svih MS bolesnika ($\beta = 0,209$; promjena R^2 : 0,043; $p = 0,004$), doprinoseći 4,3% varijabilnosti odgovora, što je i potvrđeno analizom parcijalnog koeficijenta korelacije ($r = 0,208$; $p = 0,004$). Statistički značajna povezanost ($p = 0,004$) ove kombinacije *CTLA4* +49/*CT60* AG/AG genotipa s negativnim odgovorom na terapiju prisutna je i u MS bolesnica ($\beta = 0,212$; promjena R^2 : 0,047; $p = 0,007$) gdje doprinosi 4,7% varijabilnosti odgovora.

4.4. Utjecaj *TNFRSF10A* gena u odgovoru na terapiju IFN- β

Molekularno–genetička analiza *TNFRSF10A* rs20576 varijante uspješno je provedena na ukupno 285 uzoraka MS bolesnika dok analiza za 10 uzoraka nije bila uspješna uslijed neodgovarajuće kvalitete DNA za Real-time PCR reakciju, moguće

zbog degradacije DNA koja je prilikom pohrane uzoraka zadovoljavala preporučene kriterije kvalitete. Po provedenoj analizi, *TNFRSF10A* rs20576 varijanta gena u obje skupine MS bolesnika, Rs (N=165) i NRs (N=120), nalazi se u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ($p=0,352$ i $p=0,819$).

Usporedbom učestalosti *TNFRSF10A* rs20576 genotipova, alela (tablica 38) i genetičkih modela (tablica 39) između skupina bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β i onih koji nisu adekvatno odgovorili na terapiju nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p>0,05$) u svih MS bolesnika.

Tablica 38. Učestalost genotipova i alela *TNFRSF10A* gena (rs20576) u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Genotip / alel	MS bolesnici ukupno (N=285)			
	Rs ^a (N=165) (%)	NRs ^b (N=120) (%)	p	OR (95% CI) ^c
<i>TNFRSF10A</i>^d, rs20576				
AA	107 (64,9)	74 (61,6)	0,663	1,15 (0,70 – 1,87)
AC	54 (32,7)	41 (34,2)		0,71 (0,45 – 1,14)
CC	4 (2,4)	5 (4,2)		0,97 (0,52 – 1,79)
A	81,2	78,8	0,470	1,17 (0,77 – 1,77)
C	18,8	21,2		0,86 (0,57 – 1,30)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

Tablica 39. Povezanost genetičkih modela varijante rs20576 *TNFRSF10A* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u svih MS bolesnika (N=285)

	Ukupno (N=285)			
	Rs ^a (N=165) (%)	NRs ^b (N=120) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model <i>TNFRSF10A</i>^d, rs20576				
Kodominantni				
AA vs. AC	107 (64,9) : 54 (32,7)	74 (61,6) : 41 (34,2)	0,716	1,10 (0,66 – 1,81)
AA vs. CC	107 (64,9) : 4 (2,4)	74 (61,6) : 5 (4,2)	0,389	1,81 (0,47 – 6,96)

AC vs. CC	54 (32,7) : 4 (2,4)	41 (34,2) : 5 (4,2)	0,478	1,65 (0,42 – 6,52)
Dominantni				
AC + CC vs. AA	58 (35,1) : 107 (64,9)	46 (38,4) : 74 (61,6)	0,582	0,87 (0,54 – 1,42)
Recesivni				
CC vs. AC + AA	4 (2,4) : 161 (97,6)	5 (4,2) : 115 (95,8)	0,412	0,57 (0,15 – 2,17)
Overdominantni				
AC vs. AA + CC	54 (32,7) : 111 (67,3)	41 (34,2) : 79 (65,8)	0,799	0,94 (0,57 – 1,54)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

Nakon podjele MS bolesnika prema spolu, utvrđene su statistički značajne razlike u distribuciji genotipova (tablica 40) i učestalosti genetičkih modela (tablica 41) za varijantu rs20576 *TNFRSF10A* između muškaraca koji su pozitivno odgovorili i onih koji nisu odgovorili na terapiju IFN-β. Genotip *TNFRSF10A* (rs20576) AA manje je zastupljen u skupini MS muških bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju (48,7%) nego u onih bez adekvatnog odgovora na terapiju IFN-β (75,0%; p = 0,044; OR = 0,32; 95%CI = 0,10-0,97). Nasuprot tome, genotip *TNFRSF10A* (rs20576) AC češći je u skupini MS muških bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju (46,2%) nego u onih bez adekvatnog odgovora na terapiju IFN-β (16,7%; p = 0,022; OR = 4,29; 95%CI = 1,24-14,88).

Tablica 40. Učestalost genotipova i alela *TNFRSF10A* gena (rs20576) gena u muškaraca oboljelih od MS-a (N=63) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Genotip / alel	MS muškarci (N=63)			
	Rs ^a (N=39) (%)	NRs ^b (N=24) (%)	p	OR (95% CI) ^c
<i>TNFRSF10A</i>, rs20576				
AA	19 (48,7)	18 (75,0)	0,058	0,32 (0,10 - 0,97)*
AC	18 (46,2)	4 (16,7)		4,29 (1,24-14,88)#
CC	2 (5,1)	2 (8,3)		0,60 (0,08 – 4,53)
A	71,8	83,3	0,144	0,51 (0,21 - 1,26)

C	28,2	16,7		1,96 (0,79 – 4,86)
----------	------	------	--	--------------------

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

*statistička značajnost između Rs i NRs za *TNFRSF10A* AA genotip, p=0,044

#statistička značajnost između Rs i NRs za *TNFRSF10A* AC genotip, p=0,022

Statističku značajnost u skupini MS muškaraca (tablica 41) pokazuju rs20576 *TNFRSF10A* A/C genetički modeli: kodominantni AA vs. AC (p = 0,024; OR = 0,24; 95%CI = 0,07–0,83) i overdominantni model AC + CC vs. AA (p = 0,022; OR = 4,29; 95%CI = 1,24 –14,88). Zbog vrlo niske učestalosti rs20576 *TNFRSF10A* CC genotipa u obje skupine MS bolesnika, a koji se pribraja u overdominantnom modelu, interpretacija OR-a je u ovom slučaju ograničena.

Tablica 41. Povezanost genetičkih modela varijante rs20576 *TNFRSF10A* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u muškaraca oboljelih od MS-a (N=63)

	MS muškarci (N=63)			
	Rs ^a (N=39) (%)	NRs ^b (N=24) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model <i>TNFRSF10A</i>, rs20576				
Kodominantni				
AA vs. AC	19 (48,7) : 18 (46,2)	18 (75,0) : 4 (16,7)	0,024	0,24 (0,07 – 0,83)
AA vs. CC	19 (48,7) : 2 (5,1)	18 (75,0) : 2 (8,3)	0,959	1,06 (0,13 – 8,31)
AC vs. CC	18 (46,2) : 2 (5,1)	4 (16,7) : 2 (8,3)	0,188	4,50 (0,48 -42,25)
Dominantni				
AC + CC vs. AA	20 (51,3) : 19 (48,7)	6 (25,0) : 18 (75,0)	0,069	2,84 (0,92 – 8,77)
Recesivni				
CC vs. AC + AA	2 (5,1) : 37 (94,9)	2 (8,3) : 22 (91,7)	0,616	0,60 (0,08–4,53)
Overdominantni				
AC vs. AA + CC	18 (46,2) : 21 (53,8)	4 (16,7) : 20 (83,3)	0,022	4,29 (1,24 -14,88)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

Nakon podjele MS bolesnika prema spolu, nisu utvrđene statističke značajnosti ($p > 0,05$) u distribuciji genotipova i frekvenciji alela *TNFRSF10A* (rs20576) (tablica 42) niti u učestalosti genetičkih modela (tablica 43) između MS bolesnica koje su pozitivno odgovorile i onih koje nisu odgovorile na terapiju IFN- β .

Tablica 42. Učestalost genotipova i alela *TNFRSF10A* gena (rs20576) gena u žena oboljelih od MS-a (N=222) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Genotip / alel	MS žene (N=222)			
	Rs ^a (N=126) (%)	NRs ^b (N=96) (%)	p	OR (95% CI) ^c
<i>TNFRSF10A</i>^d, rs20576				
AA	88 (69,8)	56 (58,3)	0,189	1,65 (0,95 – 2,89)
AC	36 (28,6)	37 (38,6)		0,64 (0,36 - 1,12)
CC	2 (1,6)	3 (3,1)		0,50 (0,08 – 3,05)
A	84,1	77,6	0,082	1,53 (0,95 – 2,47)
C	15,9	22,4		0,65 (0,41 – 1,06)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

Tablica 43. Povezanost genetičkih modela varijante rs20576 *TNFRSF10A* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u žena oboljelih od MS-a (N=222)

	MS žene (N=222)			
	Rs ^a (N=126) (%)	NRs ^b (N=96) (%)	p	OR (95% CI) ^c
Genetički model <i>TNFRSF10A</i>, rs20576				
Kodominantni				
AA vs. AC	88 (69,8) : 36 (28,6)	56 (58,3) : 37 (38,6)	0,098	1,62 (0,92 – 2,85)
AA vs. CC	88 (69,8) : 2 (1,6)	56 (58,3) : 3 (3,1)	0,356	1,06 (0,38 -14,55)
AC vs. CC	36 (28,6) : 2 (1,6)	37 (38,6) : 3 (3,1)	0,688	1,46 (0,23 - 9,25)
Dominantni				
AC + CC vs. AA	38 (30,2) : 88 (69,8)	40 (41,7) : 56 (58,3)	0,076	0,61 (0,35 – 1,05)

Recesivni				
CC vs. AC + AA	2 (1,6) : 124 (98,4)	3 (3,1) : 93 (96,9)	0,453	0,50 (0,08 – 3,05)
Overdominantni				
AC vs. AA + CC	36 (28,6) : 90 (71,4)	37 (38,5) : 59 (61,5)	0,118	0,64 (0,36 -1,12)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

Multipla regresijska analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost ($p > 0,05$) *TNFRSF10A* rs20576 polimorfizma s odgovorom na terapiju IFN- β u ukupnom uzorku MS bolesnika, niti nakon stratifikacije s obzirom na spol.

4.5. Međudjelovanje *CCR5*, *CTLA4* i *TNFRSF10A* gena u odgovoru na terapiju IFN- β

Nakon što smo istražili pojedinačni utjecaj *CCR5*, *CTLA4* i *TNFRSF10A* gena u odgovoru na terapiju IFN- β kod MS bolesnika, ispitali smo njihovu međusobnu povezanost s odgovorom na terapiju IFN- β usporedbom kombinacija svih genotipova između bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju i bolesnika bez odgovora na terapiju IFN- β .

Tablica 44 prikazuje kombinacije genotipova za varijante *CCR5*- Δ 32, *CTLA4* +49 A/G i *CTLA4* CT60 A/G u svih MS bolesnika s obzirom na odgovor na liječenje IFN- β . U tablici nisu date sljedeće kombinacije genotipova *CCR5*- Δ 32, *CTLA4* +49 A/G i CT60 A/G: wt Δ 32/-/AA, wt Δ 32/AA/AA, wt Δ 32/AA/GG, wt Δ 32/AG/AA, wtwt/GG/AA, wt Δ 32/GG/AA, wt Δ 32/GG/AG, wt Δ 32/AG+GG/AA koje se javljaju u niti jednoj ili samo u jednoj skupini MS bolesnika što može rezultirati velikim OR-om, ali i vrlo širokim CI-om što ograničava interpretaciju. Također, s oprezom treba interpretirati i OR-ove za druge rijetko zastupljene kombinacije genotipova. Značajna statistička razlika utvrđena je za sljedeće kombinacije *CCR5*- Δ 32, *CTLA4* +49 A/G i CT60 A/G genotipova: wtwt/AG/AG ($p = 0,016$; OR = 0,53; 95%CI = 0,32–0,89) i wtwt/AG+GG/AG ($p = 0,015$; OR = 0,53; 95%CI = 0,32–0,88).

Tablica 44. Učestalost kombinacije genotipova za *CCR5-Δ32* varijantu (rs333) i *CTLA4* +49 A/G (rs231775) te CT60 A/G (rs3087243) varijante u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN-β

<i>CCR5</i> ^d Δ32	<i>CTLA4</i> ^e +49 A/G	<i>CTLA4</i> CT60 A/G	MS bolesnici ukupno (N=295)			
Genotip			<i>Rs</i> ^a (N=173) (%)	<i>NRs</i> ^b (N=122) (%)	p	OR (95% CI) ^c
wtw*	AA	-	63 (36,4)	39 (32,0)	0,429	1,22 (0,75 – 1,99)
wt Δ32	AA	-	9 (5,2)	1 (0,8)	0,074	6,64 (0,83 – 53,1)
wtw	AG	-	62 (35,8)	57 (46,7)	0,061	0,63 (0,40 – 1,02)
wt Δ32	AG	-	9 (5,2)	4 (3,3)	0,432	1,62 (0,49 – 5,38)
wtw	GG	-	25 (14,5)	14 (11,5)	0,459	1,30 (0,65 – 2,62)
wt Δ32	GG	-	4 (2,3)	7 (5,7)	0,139	0,39 (0,11 – 1,36)
wtw	AG+GG	-	87 (50,3)	71 (58,2)	0,180	0,73 (0,46 – 1,16)
wt Δ32	AG+GG	-	14 (8,1)	11 (9,0)	0,780	0,89 (0,39 – 2,03)
wtw	-	AA	32 (18,5)	21 (17,2)	0,777	1,10 (0,60 – 2,00)
wtw	-	AG	68 (39,3)	59 (48,4)	0,123	0,69 (0,43 – 1,10)
wt Δ32	-	AG	9 (5,2)	4 (3,3)	0,432	1,62 (0,49 – 5,38)
wtw	-	GG	50 (28,9)	30 (24,6)	0,412	1,25 (0,74 – 2,11)
wt Δ32	-	GG	8 (4,6)	8 (6,6)	0,473	0,69 (0,25 – 1,89)
wtw	AA	AA	28 (16,2)	20 (16,4)	0,962	0,98 (0,53 – 1,84)
wtw	AA	AG	27 (15,6)	14 (11,5)	0,314	1,43 (0,71 – 2,85)
wt Δ32	AA	AG	5 (2,9)	1 (0,8)	0,245	3,60 (0,42 – 31,22)
wtw	AA	GG	8 (4,6)	5 (4,1)	0,829	1,13 (0,36 – 3,56)
wtw	AG	AA	3 (1,7)	1 (0,8)	0,513	2,14 (0,22 – 20,78)
wtw	AG	AG	40 (23,1)	44 (36,1)	0,016	0,53 (0,32 – 0,89)
wt Δ32	AG	AG	4 (2,3)	3 (2,5)	0,935	0,94 (0,20 – 4,27)
wtw	AG	GG	19 (11,0)	12 (9,8)	0,752	1,13 (0,53 – 2,43)
wt Δ32	AG	GG	4 (2,3)	1 (0,8)	0,349	2,86 (0,32 – 25,94)
wtw	GG	AG	1 (0,6)	1 (0,8)	-	-
wtw	GG	GG	23 (13,3)	13	0,496	1,29 (0,62 – 2,65)
wt Δ32	GG	GG	4 (2,3)	7 (10,7)	0,139	0,39 (0,11 – 1,36)

wttw	AG+GG	AA	4 (2,3)	1 (0,8)	0,349	2,86 (0,32 – 25,94)
wttw	AG+GG	AG	41 (23,6)	45 (36,9)	0,015	0,53 (0,32 – 0,88)
wt Δ32	AG+GG	AG	4 (2,3)	3 (2,5)	0,935	0,94 (0,21 – 4,27)
wttw	AG+GG	GG	42 (24,3)	25 (20,5)	0,445	1,24 (0,71 – 2,18)
wt Δ32	AG+GG	GG	8 (4,6)	8 (6,6)	0,473	0,69 (0,25 – 1,89)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCTLA-4-gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

^eCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

Za genske varijante *CCR5-Δ32*, *CTLA4 +49 A/G* i *CT60 A/G* kombinacije genotipova wttw/AG/AG i wttw/AG+GG/AG koje su pokazale statističku značajnost ($p=0,015$ i $p=0,016$) između svih MS bolesnika s pozitivnim i bez odgovora na liječenje IFN-β statistička značajnost je potvrđena nakon stratifikacije prema spolu samo u MS bolesnica:

- kombinacija genotipova wttw/AG/AG rjeđa je u MS žena s pozitivnim odgovorom na terapiju (21,8%) nego u onih bez odgovora na terapiju (37,1%; $p = 0,010$; OR=0,48; 95%CI = 0,28 – 0,84)
- kombinacija genotipova wttw/AG+GG/AG rjeđa je u MS žena s pozitivnim odgovorom na terapiju (22,6%) nego u onih bez odgovora na terapiju (38,1%; $p = 0,010$; OR=0,48; 95%CI = 0,28 – 0,84)

Nadalje, multipla regresijska analiza pokazala je da kombinirana prisutnost genotipa *CCR5 wttw/CTLA4 +49 AA* značajno predviđa pozitivan odgovor na liječenje kod MS bolesnica ($\beta = 0,188$; promjena R^2 : 0,035; $p = 0,025$; parcijalni koeficijenti $r = 0,204$, $p = 0,016$). Nasuprot tome, nije uočena značajna povezanost između odgovora na terapiju IFN-β i genotipa *CCR5-Δ32* ili *CTLA4 +49 A/G* kod muških MS bolesnika. Osim toga, dob nastupa bolesti, stopa relapsa prije liječenja i vrijednost EDSS-a prije početka terapije nisu bili povezani ($p>0,05$) s odgovorom na liječenje, ni pojedinačno ni u kombinaciji s analiziranim polimorfizmima, niti kod muškaraca niti kod žena.

Tablica 45 prikazuje kombinacije genotipova za varijante *CCR5-Δ32* i *TNFRSF10A rs20576* u svih MS bolesnika s obzirom na odgovor na liječenje IFN-β. Usporedbom učestalosti kombinacija genotipova *CCR5-Δ32* i *TNFRSF10A rs20576*

između skupina MS bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju i MS bolesnika bez odgovora na terapiju IFN- β nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p>0,05$).

Tablica 45. Učestalost kombinacije genotipova za varijante *CCR5*- Δ 32 (rs333) i *TNFRSF10A* rs20576 u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN- β

<i>CCR5</i> ^d - Δ 32	<i>TNFRSF10A</i> ^e rs20576	MS bolesnici ukupno (N=285)			
		Rs ^a (N=165) (%)	NRs ^b (N=120) (%)	p	OR (95% CI) ^c
wtw	AA	93 (56,4)	66 (55,0)	0,703	1,10 (0,68 – 1,75)
w Δ 32	AA	13 (78,8)	8 (6,7)	0,699	1,20 (0,48 – 2,99)
wtw	AC	48 (29,1)	37 (30,8)	0,751	0,92 (0,55 – 1,54)
w Δ 32	AC	6 (3,6)	4 (3,3)	0,891	1,10 (0,30 – 3,96)
wtw	CC	4 (24,2)	5 (4,2)	0,412	0,57 (0,15 – 2,17)
w Δ 32	CC	0 (0,0)	0 (0,0)	-	-
wtw	AC+CC	52 (31,5)	42 (35,0)	0,537	0,85 (0,51 – 1,41)
w Δ 32	AC+CC	6 (3,6)	4 (3,3)	0,891	1,10 (0,30 – 3,96)
wtw	AA+AC	141 (8,5)	103 (85,8)	0,928	0,97 (0,50 – 1,90)
w Δ 32	AA+AC	19 (11,5)	12 (10,0)	0,685	1,17 (0,55 – 2,51)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CCR5* - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

^e*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

Također nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p>0,05$) u distribuciji kombinacija genotipova *CCR5*- Δ 32 i *TNFRSF10A* rs20576 između skupina MS bolesnika (Rs i NRs) nakon stratifikacije prema spolu (tablice 46 i 47). Ipak, u muških MS bolesnika postoji izražen trend na granici statističke značajnosti ($p = 0,051$) manje učestalosti kombinacije *CCR5* wtw i *TNFRSF10A* AA (14% vs. 66,7%) i veće učestalosti *CCR5* wtw i *TNFRSF10A* AC (41% vs. 16,7%) u skupini s pozitivnim odgovorom na terapiju u odnosu na skupinu bez adekvatnog odgovora na terapiju IFN- β (tablica 46).

Tablica 46. Učestalost kombinacije genotipova za varijante *CCR5*- Δ 32 (rs333) i *TNFRSF10A* rs20576 u muškaraca oboljelih od MS-a (N=63) prema odgovoru na liječenje IFN- β

<i>CCR5</i> ^d - Δ 32	<i>TNFRSF10A</i> ^e rs20576	MS muškarci (N=63)			
		Rs ^a (N=39) (%)	NRs ^b (N=24) (%)	p	OR ^c (95% CI)
wttw	AA	16 (41,0)	16 (66,7)	0,051	0,35 (0,12 – 1,01)
wt Δ 32	AA	3 (7,7)	2 (8,3)	0,927	0,92 (0,14 – 5,93)
wttw	AC	16 (41,0)	4 (16,7)	0,051	3,48 (1,00 – 12,13)
wt Δ 32	AC	2 (5,1)	0 (0,0)	-	-
wttw	CC	2 (5,1)	2 (8,3)	0,616	0,59 (0,08 – 4,53)
wttw	AC+CC	18 (46,2)	6 (25,0)	0,100	2,57 (0,84 – 7,87)
wttw	AA+AC	32 (82,1)	20 (83,3)	0,897	0,91 (0,24 – 3,53)
wt Δ 32	AA+AC	5 (12,8)	2 (8,3)	0,585	1,62 (0,29 – 9,08)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*CCR5* - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

^e*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

Tablica 47. Učestalost kombinacije genotipova za varijante *CCR5*- Δ 32 (rs333) i *TNFRSF10A* rs20576 u žena oboljelih od MS-a (N=222) prema odgovoru na liječenje IFN- β

<i>CCR5</i> ^d - Δ 32	<i>TNFRSF10A</i> ^e rs20576	MS žene (N=222)			
		Rs ^a (N=126) (%)	NRs ^b (N=96) (%)	p	OR ^c (95% CI)
wttw	AA	77 (61,1)	50 (52,1)	0,179	1,45 (0,85 – 2,47)
wt Δ 32	AA	10 (7,9)	6 (6,3)	0,631	1,29 (0,45 – 3,69)
wttw	AC	32 (25,4)	33 (34,4)	0,147	0,65 (0,36 – 1,16)
wt Δ 32	AC	4 (3,2)	4 (4,2)	0,695	0,75 (0,18 – 3,10)
wttw	CC	2 (1,6)	3 (3,1)	0,453	0,50 (0,08 – 3,05)
wttw	AC+CC	34 (27,0)	36 (37,5)	0,096	0,62 (0,35 – 1,09)
wttw	AA+AC	109 (86,5)	83 (86,5)	0,992	1,01 (0,46 – 2,18)
wt Δ 32	AA+AC	14 (11,1)	10 (10,4)	0,869	1,08 (0,46 – 2,54)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

^eTNFRSF10A - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

Multipla regresijska analiza nije pokazala značajnu povezanost ($p > 0,05$) između odgovora na terapiju IFN- β za kombinacije genotipova CCR5- Δ 32 i TNFRSF10A rs20576 kod MS bolesnika. Osim toga, dob nastupa bolesti, stopa relapsa prije liječenja i vrijednost EDSS-a prije početka terapije nisu bili povezani ($p > 0,05$) s odgovorom na liječenje, ni pojedinačno ni u kombinaciji s CCR5- Δ 32/TNFRSF10A rs20576 varijantama, niti kod muškaraca niti kod žena.

Tablica 48. prikazuje kombinacije genotipova za TNFRSF10A rs20576, CTLA4 +49 A/G (rs231775) i CT60 A/G (rs3087243) varijante u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN- β . U tablici nisu date sljedeće kombinacije genotipova TNFRSF10A rs20576, CTLA4 +49 A/G i CT60 A/G: CC/AA/-, CC/GG/-, CC/-/AA, CC/AA/AA, CC/AA/AG, CC/AA/GG, AA/AG/AA, CC/AG/AA, AA/GG/AA, AC/GG/AA, CC/GG/AA, AA/GG/AG, AC/GG/AG, CC/GG/AG, CC/GG/GG stoga što se pojedini genotip ne javlja ni u jednoj ili samo u jednoj skupini MS bolesnika što može rezultirati velikim OR-om, ali i vrlo širokim CI što ograničava interpretaciju. Također, s oprezom treba interpretirati i OR-ove za druge rijetko zastupljene kombinacije genotipova. Usporedbom učestalosti kombinacija genotipova TNFRSF10A rs20576, CTLA4 +49 A/G i CT60 A/G varijanti između skupina MS bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju i MS bolesnika bez odgovora na terapiju IFN- β nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

Tablica 48. Učestalost kombinacije genotipova za *TNFRSF10A* rs20576 varijantu i *CTLA4* +49 A/G (rs231775) te CT60 A/G (rs3087243) varijante u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN-β

<i>TNFRSF10A</i> rs20576 ^d	<i>CTLA4</i> ^e +49 A/G	<i>CTLA4</i> CT60 A/G	MS bolesnici ukupno (N=285)			
Genotip			Rs ^a (N=165) (%)	NRs ^b (N=120) (%)	p	OR (95% CI) ^c
AA	AA	-	44 (26,7)	26 (21,7)	0,334	1,31 (0,76 – 2,29)
AC	AA	-	23 (13,9)	11 (9,2)	0,223	1,61 (0,75 – 3,43)
AA	AG	-	46 (27,9)	35 (29,2)	0,239	0,94 (0,56 – 1,58)
AC	AG	-	22 (13,3)	22 (18,3)	0,250	0,69 (0,36 – 1,31)
CC	AG	-	4 (2,4)	2 (1,7)	0,662	1,47 (0,26 – 8,14)
AA	GG	-	17 (10,3)	13 (10,8)	0,886	0,95 (0,44 – 2,03)
AC	GG	-	9 (5,5)	8 (6,7)	0,670	0,81 (0,30 – 2,16)
AA	-	AA	24 (14,5)	11 (9,2)	0,175	1,69 (0,79 – 3,59)
AC	-	AA	10 (6,1)	8 (6,7)	0,836	0,90 (0,35 – 2,36)
AA	-	AG	49 (29,7)	41 (34,2)	0,423	0,81 (0,49 – 1,35)
AC	-	AG	25 (15,2)	18 (15,0)	0,971	1,01 (0,52 – 1,95)
CC	-	AG	3 (1,8)	2 (1,7)	0,923	1,09 (0,18 – 6,64)
AA	-	GG	34 (20,6)	22 (18,3)	0,634	1,16 (0,64 – 2,10)
AC	-	GG	19 (11,5)	15 (12,5)	0,800	0,91 (0,44 – 1,88)
CC	-	GG	1 (0,6)	1 (0,8)	-	-
AA	AA	AA	20 (12,1)	11 (9,2)	0,430	1,37 (0,63 – 2,97)
AC	AA	AA	9 (5,5)	7 (5,8)	0,891	0,93 (0,37 – 2,58)
AA	AA	AG	21 (12,7)	12 (10,0)	0,478	1,31 (0,62 – 2,78)
AC	AA	AG	10 (6,1)	2 (1,7)	0,088	3,81 (0,82 – 17,70)
AA	AA	GG	3 (1,8)	3 (2,5)	0,693	0,72 (0,14 – 3,64)
AC	AA	GG	4 (2,4)	2 (1,7)	0,662	1,47 (0,26 – 8,14)
AC	AG	AA	1 (0,6)	1 (0,8)	-	-
AA	AG	AG	28 (17,0)	28 (23,3)	0,183	0,67 (0,37 – 1,21)
AC	AG	AG	14 (8,5)	16 (13,3)	0,193	0,60 (0,28 – 1,29)
CC	AG	AG	3 (1,8)	1 (0,8)	0,496	2,20 (0,23 – 21,50)

AA	AG	GG	15 (9,1)	7 (5,8)	0,313	1,61 (0,64 – 4,09)
AC	AG	GG	7 (4,2)	5 (4,2)	0,975	1,02 (0,32 – 3,30)
CC	AG	GG	1 (0,6)	1 (0,8)	-	-
AA	GG	GG	16 (9,7)	12 (10,0)	0,932	0,97 (0,44 – 2,13)
AC	GG	GG	8 (4,8)	8 (6,7)	0,512	0,71 (0,26 – 1,96)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^d*TNFRSF10A* - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

^e*CTLA4* - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

Multipla regresijska analiza pokazala je statistički značajnu povezanost ($p=0,046$) kombinacije genotipova *CTLA4 +49/TNFRSF10A AA/AA* i kasnije dobi nastupa bolesti s odgovorom na terapiju, pri čemu ova kombinacija značajno predviđa pozitivan odgovor na terapiju IFN- β kod svih MS bolesnika ($\beta = 0,147$; promjena R^2 : 0,044; $p = 0,046$), doprinoseći 4,4% varijabilnosti odgovora. U skupini MS bolesnica povezanost s odgovorom na terapiju IFN- β je utvrđena za samu kombinaciju genotipova *CTLA4 +49/TNFRSF10A AA/AA* koja značajno predviđa pozitivan odgovor na terapiju IFN- β kod MS žena ($\beta = 0,200$; promjena R^2 : 0,040; $p = 0,015$), doprinoseći 4,0% varijabilnosti odgovora.

Tablica 49 prikazuje odabrane kombinacije genotipova za sve četiri polimorfne varijante svih triju *TNFRSF10A*, *CTLA4* i *CCR5* gena u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN- β . Usporedbom učestalosti kombinacija genotipova za sve varijante *CCR5- Δ 32*, *TNFRSF10A rs20576*, *CTLA4 +49 A/G* (rs231775) i *CT60 A/G* (rs3087243) između skupina MS bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju i MS bolesnika bez odgovora na terapiju IFN- β nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p>0,05$).

Tablica 49. Distribucija odabranih kombinacija genotipova za *CCR5- Δ 32*, *TNFRSF10A rs20576*, *CTLA4 +49 A/G* (rs231775) i *CT60 A/G* (rs3087243) varijante u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Genotip	CCR5 Δ 32 ^d	TNFRSF10 A ^e rs20576	CTLA4 ^f +49 A/G	CTLA4 CT60 A/G	MS bolesnici ukupno (N=285)			
					Rs ^a (N=165) (%)	NRs ^b (N=120) (%)	p	OR (95% CI) ^c
wtwt*	AA	AA	-	-	38 (23,0)	25 (20,8)	0,660	1,14 (0,64 – 2,01)

wtw	AC	AA	-	22 (13,3)	11 (9,2)	0,283	1,52 (0,71 – 3,28)
wtw	AA	AG	-	39 (23,6)	32 (26,7)	0,560	0,85 (0,50 – 1,46)
wtw	AC	AG	-	19 (11,5)	21 (17,5)	0,154	0,61 (0,31 – 1,20)
wtw	AA	GG	-	16 (9,7)	9 (7,5)	0,519	1,32 (0,56 – 3,11)
wtw	AC	GG	-	7 (4,2)	5 (4,2)	0,975	1,02 (0,32 – 3,30)
wtw	AA	-	AA	21 (12,7)	11 (9,2)	0,349	1,45 (0,67 – 3,12)
wtw	AC	-	AA	9 (5,5)	8 (6,7)	0,670	0,81 (0,30 – 2,16)
wtw	AA	-	AG	42 (25,5)	38 (31,7)	0,250	0,74 (0,44 – 1,24)
wtw	AC	-	AG	23 (13,9)	17 (14,2)	0,957	0,98 (0,50 – 1,93)
wtw	AA	-	GG	30 (18,2)	17 (14,2)	0,368	1,35 (0,70 – 2,57)
wtw	AC	-	GG	16 (9,7)	12 (10,0)	0,932	0,97 (0,44 – 2,13)
wtw	AA	AA	AA	17 (10,3)	11 (9,2)	0,750	1,04 (0,51 – 2,53)
wtw	AC	AA	AA	9 (5,5)	7 (5,8)	0,891	0,93 (0,34 – 2,58)
wtw	AA	AA	AG	18 (10,9)	11 (9,2)	0,631	1,21 (0,55 – 2,67)
wtw	AC	AA	AG	9 (5,5)	2 (1,7)	0,122	3,40 (0,72 – 16,05)
wtw	AA	AG	AG	24 (14,5)	26 (21,7)	0,121	0,62 (0,33 – 1,14)
wtw	AC	AG	AG	13 (7,9)	15 (12,5)	0,199	0,60 (0,27 – 1,31)
wtw	AA	AG	GG	12 (7,3)	6 (5,0)	0,439	1,49 (0,54 – 4,09)
wtw	AC	AG	GG	6 (3,6)	5 (4,2)	0,819	0,87 (0,26 – 2,91)
wtw	AA	GG	GG	15 (9,1)	8 (6,7)	0,460	1,40 (0,57 – 3,42)
wtw	AC	GG	GG	6 (3,6)	5 (4,2)	0,819	0,87 (0,26 – 2,91)
wt Δ32	AA	AA	-	6 (3,6)	1 (0,8)	0,167	4,50 (0,53 – 37,80)
wt Δ32	AA	AG	-	6 (3,6)	3 (2,5)	0,590	1,47 (0,36 – 6,01)
wt Δ32	AA	-	AG	6 (3,6)	3 (2,5)	0,590	1,47 (0,36 – 6,01)
wt Δ32	AA	AG	AG	3 (1,8)	2 (1,7)	0,923	1,09 (0,18 – 6,64)
wt Δ32	AA	GG	GG	1 (0,6)	4 (3,3)	0,123	0,17 (0,02 – 1,60)

^aRs - bolesnici s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β

^bNRs - bolesnici bez odgovora na terapiju IFN-β

^cOR – omjer rizika; CI – interval pouzdanosti

^dCCR5 - gen za C-C kemokinski receptor 5; *wt- *engl, wild type*, divlji tip

^eTNFRSF10A - Gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora

^fCTLA4 - gen za protein 4 vezan uz citotoksični Limfocit T

5. RASPRAVA

Terapija IFN- β predstavlja siguran, učinkovit i najdulje korišten imunomodulacijski terapijski pristup u liječenju MS-a unutar eskalacijskog modela liječenja, osobito RR oblika bolesti. Njegova učinkovitost potvrđena je brojnim randomiziranim kliničkim ispitivanjima i dugotrajnim kliničkim praćenjima, pri čemu je pokazano da IFN- β značajno smanjuje godišnju stopu relapsa, usporava akumulaciju neurološkog deficita te djelomično odgađa progresiju bolesti. Unatoč dokazanoj učinkovitosti, klinička iskustva i rezultati brojnih studija ukazuju na značajnu varijabilnost terapijskog odgovora među pacijentima, što implicira složenu interakciju između terapijskog učinka IFN- β i individualne genetske predispozicije. Takva heterogenost terapijskog ishoda ne može se objasniti isključivo kliničkim karakteristikama bolesti, poput dobi pri nastupu, početne stope relapsa ili inicijalnog stupnja onesposobljenja, već upućuje na složeno međudjelovanje imunoloških mehanizama, okolišnih čimbenika i genetske predispozicije. U našem istraživanju, pri analizi kliničkih karakteristika bolesnika oboljelih od MS-a u odnosu na odgovor na terapiju IFN- β (tablica 15), uočen je trend kasnije pojave bolesti i niže stope relapsa kod bolesnika s pozitivnim terapijskim odgovorom u usporedbi s onima bez odgovora na terapiju, ali bez statističke značajnosti. Srednja vrijednost EDSS-a na početku praćenja nije se značajno razlikovala između tih dviju skupina, međutim bolesnici bez odgovora na terapiju IFN- β su imali teži stupanj bolesti u krajnjoj točki ispitivanja u odnosu na bolesnike s pozitivnim odgovorom ($p=0,0001$) što je i bio jedan od kriterija navedenoj podjeli skupina MS bolesnika. Stoga i naši nalazi dodatno potvrđuju da početne kliničke karakteristike same po sebi nisu dovoljne za pouzdano predviđanje terapijskog ishoda. Sve je jasnije da terapijski učinak IFN- β proizlazi iz njegove sposobnosti istodobne modulacije više imunoloških puteva, uključujući regulaciju citokinskog profila uz smanjenje proupalnih citokina, inhibiciju migracije leukocita kroz KBM, poticanje Treg te modulaciju apoptotskih mehanizama autoreaktivnih imunskih stanica. U tom kontekstu, identifikacija specifičnih genetskih varijanti, kao i njihovih međusobnih interakcija, predstavlja ključan preduvjet za dublje razumijevanje mehanizama koji određuju heterogeni terapijski odgovor na IFN- β .

U skladu s rastućim spoznajama da je terapijski odgovor na imunomodulacijsku terapiju u MS-u rezultat složenih gensko-okolišnih interakcija, a ne samo djelovanja

pojedinačne genske varijante, naše istraživanje uključuje i međusobnu povezanost polimorfizama gena *CCR5-Δ32*, *CTLA-4 +49 A/G*, *CTLA-4 CT60 A/G* i *TNFRSF10A* s kliničkim odgovorom na liječenje IFN-β kod hrvatskih i slovenskih bolesnika. Odabir navedenih genskih varijanti temelji se na njihovoj poznatoj ulozi u ključnim imunološkim procesima relevantnima za patogenezu MS-a i mehanizam djelovanja IFN-β. Posebna vrijednost ovakvog pristupa leži u mogućnosti simultane procjene više komplementarnih imunoloških puteva. Polimorfizam *CCR5-Δ32* povezan je s promjenama u kemokinskoj signalizaciji i migraciji leukocita prema upalnim lezijama u SŽS-u, dok se varijante u *CTLA-4* genu odražavaju razlikom u regulaciji limfocitne aktivacije i funkciji Treg stanica. Istodobno, polimorfizmi u *TNFRSF10A* genu zahvaćaju apoptotske i proupalne signalne puteve, koji mogu modulirati eliminaciju autoreaktivnih imunskih stanica i time utjecati na učinkovitost imunomodulacijske terapije.

Važno je naglasiti da je ovo istraživanje dodatno usmjereno na analizu spolno specifičnih razlika u terapijskom odgovoru. Spol predstavlja jedan od najsnažnijih bioloških modifikatora imunološkog odgovora u MS-u, pri čemu žene ne samo da obolijevaju češće, već i češće razvijaju RR oblik bolesti, dok muškarci pokazuju sklonost težim i progresivnijim kliničkim fenotipovima. Hormonski, genetski i epigenetski čimbenici doprinose spolnom dimorfizmu imunoloških odgovora, što može imati izravne implikacije na učinkovitost IFN-β terapije i farmakogenetske asocijacije [111]. Spolni hormoni, osobito estrogen i progesteron, ključni su za modulaciju T-staničnih odgovora u MS-u. Estrogen pokazuje različite učinke ovisno o koncentraciji: niže razine mogu poticati proupalni Th1 i Th17 odgovor, dok više koncentracije inhibiraju Th1/Th17 diferencijaciju i istodobno potiču Treg, pomičući imunološku ravnotežu prema protuupalnom profilu. Progesteron dodatno jača imunološku toleranciju snižavanjem produkcije proupalnih citokina karakterističnih za Th1 i Th17 podskupine i poticanjem regulacijskih mehanizama. U tom kontekstu, žene s MS-om često pokazuju izraženiju aktivaciju Th1 i Th17 stanica uz povećanu produkciju IFN-γ i IL-17 i veću učestalost relapsa, ali istodobno i snažniju aktivaciju regulacijskih puteva, što omogućuje bolju kontrolu upale i sporiju progresiju bolesti [111,112]. Stoga je u ovom radu farmakogenetska analiza provedena uz stratifikaciju prema spolu, čime se nastojalo izbjeći maskiranje potencijalno značajnih spolno specifičnih genetskih učinaka u ukupnom uzorku. Takav pristup omogućuje finiju interpretaciju rezultata i

pridonosi razvoju personaliziranog terapijskog pristupa u MS-u, koji uzima u obzir ne samo kliničke karakteristike bolesti, već i individualni genetski i biološki kontekst bolesnika.

CCR5 ima ključnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora posredovanjem migracije leukocita prema mjestima upale, uključujući lezije u SŽS-u karakteristične za MS. CCR5 je visoko izražen na aktiviranim CD4+ i CD8+ limfocitima T, monocitima i makrofagima, a njegova interakcija s ligandima CCL3, CCL4 i CCL5 omogućuje usmjerenje efektorskih imunskih stanica kroz KMB u upalna žarišta. U patogenezi MS-a, ovaj proces predstavlja jedan od ključnih koraka u inicijaciji i održavanju neuroinflamacije, što CCR5 čini relevantnim kandidatom za farmakogenetička istraživanja terapijskog odgovora [113]. Polimorfizam *CCR5-Δ32* (rs333), karakteriziran delecijom od 32 bazna para, dovodi do promjene u strukturi receptora i posljedično smanjene ekspresije funkcionalnog CCR5 na površini imunskih stanica. Iako homozigoti za $\Delta 32$ varijantu gube funkcionalni receptor, heterozigotni nositelji pokazuju djelomično očuvanu, ali smanjenu CCR5 signalizaciju. U kontekstu MS-a, takva djelomična redukcija može rezultirati smanjenom migracijom autoreaktivnih limfocita T u SŽS, čime se potencijalno ublažava intenzitet upalne infiltracije i posljedično oštećenje mijelina i aksona. Dosadašnja istraživanja o ulozi *CCR5-Δ32* polimorfizma u MS-u dala su neujednačene rezultate. Dok su neke studije sugerirale da prisutnost $\Delta 32$ alela može biti povezana s blažim tijekom bolesti ili povoljnijim terapijskim odgovorom, druge nisu potvrdile značajnu povezanost ni s rizikom razvoja bolesti ni s kliničkim ishodima [114,115]. Ovakva heterogenost rezultata vjerojatno je odraz razlika u veličini uzoraka, etničkom sastavu populacija, kriterijima definiranja terapijskog odgovora, ali i interakcije *CCR5* polimorfizma s drugim genetičkim i okolišnim čimbenicima. Alel *CCR5-Δ32* pokazuje izrazitu geografsku varijabilnost, s najvećom učestalošću u populacijama sa sjevero-zapada Europe, što dodatno može pridonijeti razlikama u rezultatima farmakogenetičkih istraživanja među populacijama [113]. Rezultati našeg istraživanja nisu pokazali značajan pojedinačni utjecaj *CCR5-Δ32* polimorfizma na odgovor na terapiju IFN- β u ukupnom uzorku bolesnika (tablice 17 i 18). Distribucija alela i genotipova *CCR5-Δ32* nije se značajno razlikovala ($p > 0,05$) između MS bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β i onih bez odgovora na terapiju u našem uzorku, uz podatak da je frekvencija ovog alela od 7,1% u našoj populaciji relativno niska [116]. Iako je funkcionalni učinak delecije na razini proteinske

strukture dobro dokumentiran, njezin utjecaj na transkriptomski profil imunskih stanica u MS-u i tijekom IFN- β terapije još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Ovi nalazi u skladu su s dijelom literature koja naglašava ograničenu prediktivnu vrijednost pojedinačnih kemokinskih polimorfizama u složenim autoimunim bolestima poput MS-a [114].

Međutim, važno je istaknuti da odsutnost samostalnog učinka ne isključuje biološku relevantnost *CCR5- Δ 32* varijante. Naši rezultati o učestalosti kombinacija genotipova sugeriraju da ovaj polimorfizam djeluje prvenstveno kao modifikator terapijskog odgovora, čiji se učinak očituje tek u kombinaciji s drugim funkcijski povezanim genetskim varijantama (tablica 44), što je naglašeno rezultatima multiple regresijske analize koja povezuje kombinaciju genotipova *CCR5- Δ 32 wtwt/CTLA4 +49 AA* s predikcijom pozitivnog odgovora na terapiju IFN- β ($\beta = 0,188$; promjena $R^2: 0,035$; $p = 0,025$). Takav nalaz dodatno podupire koncept poligenske regulacije odgovora na IFN- β , pri čemu sinergijski učinci više imunoloških puteva nadilaze utjecaj pojedinačnih gena. Usporedba naših rezultata s prethodnim istraživanjima, osobito s podacima dobivenim u istraživanju Kulakove i sur., koje je obuhvatilo varijantu *CCR5- Δ 32* i *CTLA4 +49* dodatno ukazuje na važnost populacijskih razlika u farmakogenetičkim analizama [97]. Iako su veličina uzorka i kriteriji za definiranje odgovora na terapiju bili usporedivi, u ruskoj kohorti zabilježen je veći udio bolesnika bez odgovora na IFN- β terapiju (65% u odnosu na 41% u našem uzorku), kao i viša učestalost *CCR5- Δ 32* alela [97], kao potvrda geografskoj varijaciji. Međutim u navedenom radu nije provedena analiza polimorfizma *CTLA4 CT60*, kao ni *TNFRS10A*, dok su u našem istraživanju ove varijante bile uključene, što pruža dodatni uvid u potencijalnu ulogu kombinacija imunoregulacijskih gena u odgovoru na terapiju IFN- β . Stoga je neophodna integracija genotipskih, transkriptomskih i kliničkih podataka u budućim istraživanjima, kako bi se što preciznije definirala uloga *CCR5* signalizacije u modulaciji terapijskog odgovora.

CTLA-4 protein predstavlja jedan od ključnih negativnih regulatora adaptivnog imunološkog odgovora i ima središnju ulogu u održavanju imunološke tolerancije. Ekspresija *CTLA-4* prvenstveno je povezana s aktiviranim CD4⁺ i CD8⁺ limfocitima T te Treg, pri čemu *CTLA-4* kompetitivno inhibira kostimulacijski signal CD28 vezanjem za ligande B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86) na antigen-prezentirajućim stanicama [115]. Time se smanjuje proliferacija limfocita T, produkcija citokina i nastavak imunološke

kaskade, što je od presudne važnosti u sprječavanju pretjerane ili autoreaktivne imunološke aktivnosti.

Klinička važnost *CTLA4* u regulaciji autoimunosti potvrđena je nalazima da heterozigotne mutacije u ovom genu dovode do teških poremećaja imunološke homeostaze, rezultirajući ranijim nastupom autoimunskih bolesti, hipogamaglobulinemijom, rekurentnim infekcijama i povećanjem rizika za razvoj malignih bolesti [115]. Ovi podaci ukazuju da i relativno suptilne promjene u funkciji ili ekspresiji *CTLA4*, poput onih uzrokovanih pojedinačnim nukleotidnim polimorfizmima, mogu imati mjerljiv učinak na imunološku ravnotežu te potencijalno modulirati tijek autoimunih bolesti poput MS-a, kao i odgovor na imunomodulacijsku terapiju. Studije koje su uspoređivale zdrave ispitanike s neliječenim bolesnicima s RRMS i SPMS oblikom bolesti pokazale su povećan udio CD4+ limfocita T koji izražavaju CTLA-4 na svojoj površini, pri čemu je ta razlika bila izraženija u bolesnika s RRMS oblikom bolesti [117]. Ovakav nalaz sugerira da povećana ekspresija CTLA-4 može predstavljati kompenzacijski mehanizam u uvjetima kronične imunološke aktivacije, karakteristične za MS. Međutim, funkcionalna analiza ovih stanica otkriva važan paradoks: CD4+ limfociti T izolirani iz SPMS bolesnika, a u manjoj mjeri i iz RRMS bolesnika, nakon stimulacije anti-CD3 i rekombinantnim IL-2, nisu u stanju ekspimirati normalne razine površinskog CTLA-4 [117]. Takav nalaz upućuje na funkcionalni deficit CTLA-4 signalizacije unatoč povećanom udjelu CTLA-4+ stanica, što može doprinijeti nekontroliranoj aktivnosti limfocita T i progresiji bolesti.

Dodatno, eksperimentalni modeli temeljeni na stimulaciji limfocita T reaktivnih na MBP pokazali su da inhibicija CTLA-4 dovodi do snažnog proliferativnog odgovora i povećane proizvodnje proupalnih citokina u zdravih kontrola, dok je ovaj efekt značajno oslabljen u bolesnika s MS-om [118]. Ovi rezultati ukazuju da je CTLA-4 signalni put u MS-u funkcijski kompromitiran, što može ograničiti sposobnost imunološkog sustava da adekvatno regulira autoreaktivne limfocite T, a takav poremećaj ima izravan utjecaj na učinkovitost terapija koje se zasnivaju na modulaciji aktivnosti limfocita T, uključujući IFN- β .

Posebno zanimljivi podaci dolaze iz analize memorijskih CD8+ limfocita T izoliranih iz CSL-a. Kod bolesnika s PPMS i RRMS utvđena je odsutnost ekspresije CTLA-4 na ovim stanicama, osobito kod mlađih bolesnika s PPMS-om, dok zdrave kontrole pokazuju očekivani pad izražaja s povećanjem dobi [119]. Navedeno upućuje

na pojavu prerane imunosenescencije CD8+ limfocita T u MS-u, što može pridonijeti bržoj progresiji bolesti i slabijem odgovoru na IMT.

Eksperimentalni modeli dodatno potvrđuju funkcionalnu važnost CTLA-4 puta. Inhibicija njegovih liganada, B7-1 i B7-2, dovodi do divergentnih imunoloških ishoda zbog njihove interakcije s CD28. Primjena anti-B7-1 protutijela potiče Th2 diferencijaciju i ublažava tijek EAE-a, dok anti-B7-2 protutijela favoriziraju Th1 odgovor i pogoršavaju kliničke i histološke pokazatelje bolesti [120]. Istraživanja naglašavaju da ravnoteža unutar CD28/CTLA-4 osi ima presudnu ulogu u usmjeravanju adaptivnog imunološkog odgovora.

U kontekstu terapije IFN- β , više studija pokazalo je da ovaj lijek izravno utječe na CTLA-4 signalni put. Hallal-Longo i sur. opisali su porast intracelularnih razina CTLA-4 u mononuklearnim stanicama periferne krvi, što je koreliralo sa smanjenom proliferacijom i povećanom apoptozom limfocita T [121]. Nadalje, Sellebjerg i sur. utvrdili su da IFN- β povećava udio CD4+ limfocita T s visoko izraženim CD25 (CD25^{high}) koji istovremeno eksprimiraju i CTLA-4, dodatno podupirući tezu da IFN- β potiče regulacijske mehanizme imunološkog odgovora [122]. Espejo i sur. uočili su da tijekom prva tri mjeseca terapije IFN- β ne dolazi do značajnih promjena u proliferativnom odgovoru limfocita T putem CD28/CTLA-4 puta, no nakon tog razdoblja povećana produkcija IL-10 dovodi do inhibicije CD80:CD28/CTLA-4 signalizacije i smanjene sinteze IL-2 [123]. Postupna reorganizacija regulacijskih imunoloških mreža ukazuje da terapijski odgovor na IFN- β dolazi s vremenom.

U našem istraživanju analiza polimorfizama *CTLA4* +49 A/G i CT60 A/G nije pokazala značajan pojedinačni učinak u odgovoru na terapiju IFN- β u ukupnom uzorku MS bolesnika. Međutim, nakon stratifikacije prema spolu, *CTLA4* +49 AA genotip pokazao se značajnim prediktorom pozitivnog terapijskog odgovora kod žena, samostalno (Tablica 27; $p=0,006$; OR=1,79) u kodominantnom AA vs. AG i dominantnom genetičkom modelu (Tablica 28; $p=0,042$; OR=1,85 i $p = 0,039$; OR=0,56) te u kombinaciji s *CCR5* wt/wt genotipom u predviđanju pozitivnog terapijskog odgovora kod MS bolesnica ($p = 0,016$; $r = 0,204$). Ovaj nalaz ima snažno biološko uporište, budući da je A alel povezan s višom površinskom ekspresijom CTLA-4 na limfocitima T, što može rezultirati učinkovitijom supresijom autoreaktivnih imunoloških odgovora.

Osim toga, kombinacija *CTLA4* +49 AA s CT60 AG genotipom pokazala je u MS bolesnica (tablica 37) dodatni doprinos u odgovoru na terapiju IFN- β ($p=0,011$; $OR=2,97$), što upućuje na to da regulacijski učinak *CTLA4* ovisi o međudjelovanju više funkcionalnih varijanti unutar istog gena. Ovi rezultati jasno podupiru koncept da CTLA-4 ne djeluje izolirano, već kao dio šire regulacijske mreže koja uključuje kemokinsku signalizaciju, citokinski odgovor i apoptotske puteve.

Naši nalazi također naglašavaju važnost spolnog dimorfizma imunološkog odgovora u MS-u. Poznato je da estrogeni i drugi spolni hormoni mogu modulirati ekspresiju CTLA-4 i funkciju Treg stanica, što može djelomično objasniti zašto je povoljan učinak *CTLA4* +49 AA genotipa uočen prvenstveno kod žena. Ovi rezultati dodatno potvrđuju potrebu za spolno stratificiranim farmakogenetskim analizama, budući da objedinjavanje podataka može prikriti klinički relevantne genetske učinke.

TNFRSF10A gen koji kodira receptor smrti TRAILR1 (DR4) ključan je u ekstrinzičnom putu apoptoze. Vezanjem liganda TRAIL dolazi do oligomerizacije receptora, regrutacije FADD i prokaspaze-8 te formiranja DISC kompleksa, čime se inducira kaskada apoptoze i eliminacija autoreaktivnih limfocita T. Polimorfizam rs20576 (Glu228Ala) u *TNFRSF10A* genu može smanjiti formiranje DISC kompleksa, preusmjeriti signalizaciju prema NF- κ B i MAPK putevima te pojačati proinflamatorne mehanizme [124]. Takva promjena može doprinijeti perzistenciji upalne infiltracije u SŽS i povećanoj produkciji citokina uključenih u neuroinflamaciju, što je značajno za patofiziologiju MS-a [125]. Zbog niske učestalosti homozigotnog *TNFRSF10A* rs20576 CC genotipa (2,4% u onih koji pozitivno reagiraju na terapiju i 4,2% u onih koji imaju negativan odgovor), analiza distribucije genotipova ovog polimorfizma bila je ograničena, osobito u okviru genetičkih modela koji uključuju CC genotip. Dodatno ograničenje predstavlja relativno mali broj muških bolesnika ($N = 63$), koji su nakon stratifikacije prema odgovoru na terapiju IFN- β podijeljeni u dvije podskupine, što zahtijeva oprez u interpretaciji dobivenih rezultata.

Unatoč navedenim ograničenjima, analiza stratificirana prema spolu pokazala je statistički značajnu povezanost varijante rs20576 *TNFRSF10A* s odgovorom na terapiju IFN- β u muškaraca, ali ne i u žena. U skupini muških MS bolesnika, AA genotip bio je značajno rjeđe zastupljen među bolesnicima s pozitivnim odgovorom na terapiju, što upućuje na njegov potencijalno nepovoljan učinak ($p=0,044$; $OR = 0,32$). Nasuprot tome, heterozigotni AC genotip bio je značajno češći u onih MS bolesnika s povoljnim

odgovorom na liječenje, odnosno povezan s višestruko povećanom vjerojatnošću povoljnog terapijskog odgovora ($p=0,022$; $OR = 4,29$). Ovi nalazi potvrđeni su i analizom genetičkih modela, pri čemu su kodominantni (AA vs. AC) i overdominantni (AC vs. AA + CC) modeli pokazali statističku značajnost ($p=0,024$ i $p=0,022$), što sugerira mogući heterozigotni učinak (*overdominance*) rs20576 varijante u muškaraca. Međutim, s obzirom na vrlo nisku učestalost *TNFRSF10A* CC genotipa, posebice u overdominantnom modelu, interpretacija dobivenih omjera rizika ostaje ograničena. S druge strane, kod žena je genotip *TNFRSF10A* AA češći u MS bolesnica s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β , ali iako razlika nije bila statistički značajna ($OR=1,65$ i $OR=1,15$; $p>0,05$), navedeno može ukazivati i na spolno specifičnu modulaciju TRAIL/TRAILR signalizacije. Ovaj nalaz podržavao bi ranija istraživanja koja sugeriraju da spolni hormoni, poput androgena i estrogena, mogu utjecati na ekspresiju receptora smrti, osjetljivost stanica na apoptozu i ravnotežu između apoptotskih i proinflamatornih signalnih puteva [44,126]. Interakcija *TNFRSF10A* rs20576 s terapijskim učinkom IFN- β može se objasniti dodatnim pojačanjem izraženosti TRAIL-a na stanicama imunskog sustava i pojačavanjem osjetljivost autoreaktivnih limfocita njime posredovanu apoptozu, što doprinosi smanjenju patološke imunološke aktivnosti [41,125]. Funkcijski očuvan *TNFRSF10A* receptor, kakav se pretpostavlja kod CC genotipa, omogućuje učinkovitiju realizaciju ovog terapijskog mehanizma, dok prisutnost A alela može ograničiti apoptotski odgovor i smanjiti učinkovitost IFN- β .

Budući da je kombinirana analiza *TNFRSF10A* i *CTLA4* +49 AA/AA genotipa pokazala doprinos povoljnijem terapijskom odgovoru u vidu stabilizacije EDSS-a i smanjenja stope relapsa, navedeni učinak pripisujemo i *CTLA4* +49 AA genotipu koji se već pokazao značajnim i u kombinaciji s *CCR5- Δ 32* wtwt genotipom. Interakcija *TNFRSF10A* i *CTLA4* +49 AA/AA genotipova u MS bolesnica značajno predviđa pozitivan odgovor na terapiju ($p=0,015$) doprinoseći ipak svega 4% varijabilnosti tog odgovora. U ukupnom uzorku MS bolesnika ova kombinacija *TNFRSF10A* i *CTLA4* +49 AA/AA genotipa tek zajedno s kasnijom dobi nastupa bolesti predviđa pozitivan odgovor na terapiju IFN- β ($p=0,046$) predviđajući 4,4% varijabilnosti terapijskog odgovora. Ovi rezultati također potvrđuju poligenisku prirodu odgovora na IFN- β pa istodobna prisutnost varijanti koje potiču regulacijsku kontrolu limfocita T (*CTLA4*) i učinkovitu apoptotsku eliminaciju autoreaktivnih stanica (*TNFRSF10A*), stvara za terapijski uspjeh povoljnije imunološko okruženje.

Analiza kombinacija genotipova pokazala je da, iako *CCR5-Δ32* varijanta sama po sebi nije imala značajan učinak, u kombinaciji s određenim *CTLA4* genotipovima djeluje kao genetski modifikator odgovora na terapiju IFN-β. U ukupnom uzorku MS bolesnika statistički značajno su se razlikovale kombinacije *CCR5-Δ32/CTLA4 +49/CTLA4 CT60* wtwt/AG/AG i wtwt/AG+GG/AG, koje su bile rjeđe među bolesnicima s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN-β (tablica 44), što upućuje na njihov potencijalno nepovoljan učinak. Ove kombinacije uključuju heterozigotnost *CTLA4 +49 A/G* (rs231775) u prisutnosti AG alela CT60 (rs3087243), što može odražavati suboptimalnu inhibicijsku signalizaciju CTLA-4 i posljedično slabiju regulaciju aktivacije limfocita T i funkcije Treg. Nakon stratifikacije prema spolu, navedene povezanosti ostale su statistički značajne isključivo u MS bolesnica (p=0,010), dok u muškaraca nisu potvrđene. U žena su kombinacije wtwt/AG/AG i wtwt/AG+GG/AG bile značajno rjeđe u onih MS bolesnica koje su pozitivno odgovorile na terapiju IFN-β, nego u onih koje nisu imale pozitivan odgovor, što dodatno potvrđuje spolno specifičnu osjetljivost CTLA-4-posredovanih imunoregulacijskih mehanizama u modulaciji terapijskog odgovora [25,31,38]. Poznato je da *CTLA4 +49 A/G* polimorfizam utječe na ekspresiju i funkcionalnu stabilnost CTLA-4 molekule, dok CT60 varijanta modulira omjer membranske i solubilne forme CTLA-4, pri čemu heterozigotne kombinacije mogu rezultirati funkcijski nepovoljnim imunološkim fenotipom. Navedeni nalazi u skladu su s rezultatima multiple regresijske analize, prema kojoj kombinirana prisutnost genotipa *CCR5 wtwt* i *CTLA4 +49 AA* predviđa pozitivan odgovor na IFN-β kod žena, uz mali (3,5%) ali statistički značajan (p=0,016) doprinos objašnjenju varijabilnosti terapijskog ishoda. Biološki gledano, *CTLA4 +49 AA* genotip povezuje se s učinkovitijom inhibicijom T-stanične aktivacije i očuvanom funkcijom Treg stanica, dok odsutnost *CCR5-Δ32* varijante može dodatno omogućiti kontroliraniju migraciju imunskih stanica u SŽS. Suprotno tome, heterozigotne *CTLA4* kombinacije, osobito u interakciji s CT60 AG genotipom, mogu dovesti do slabije imunoregulacije i nepovoljnijeg terapijskog ishoda.

Važno je naglasiti da su mnoge kombinacije genotipova rijetko zastupljene, što ograničava interpretaciju pojedinih omjera rizika, osobito onih s vrlo širokim intervalima pouzdanosti. Međutim, konzistentnost rezultata u ukupnom uzorku MS bolesnika i u skupini MS žena, kao i njihova podudarnost s rezultatima regresijskih analiza, podupiru zaključak da odgovor na IFN-β u MS-u nije određen pojedinačnim genetskim

varijantama, već njihovim međudjelovanjem, uz izraženu spolnu specifičnost i spolno specifičnu modulaciju CTLA-4 signalizacije.

Na kraju, klinički parametri poput dobi pri nastupu bolesti, stope relapsa prije liječenja i početnog EDSS-a nisu pokazali neovisnu prediktivnu vrijednost za odgovor na IFN- β , ni pojedinačno ni u kombinaciji s analiziranim genetskim varijantama. Međutim, dvogodišnje praćenje pokazalo je veći EDSS kod pacijenata koji nemaju pozitivan odgovor na terapiju, posebno u ženskoj populaciji, što potvrđuje kliničku relevantnost primijenjenih kriterija, ali i dodatno naglašava važnost imunogenetskih čimbenika u modulaciji terapijskog odgovora [127]. Treg, Th9 i Th17 podskupine CD4+ limfocita T imaju ključnu ulogu u patogenezi autoimunih bolesti, uključujući MS i reumatoidni artritis. Biljezi i regulacijski putevi, poput IL-6 i IFN- γ , dodatno naglašavaju spolno specifične razlike u imunološkom odgovoru na IFN- β , što sve podržava potrebu integracije genetskih i kliničkih čimbenika u procjeni terapijskog odgovora [128–130].

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da personalizirani pristup, koji integrira farmakogenetičku stratifikaciju i spolno specifične imunološke razlike, može poboljšati prognozu i odgovor na DMT u MS bolesnika. Unatoč ograničenju studije radi relativno malog broja sudionika, osobito muškaraca, te dvogodišnjeg razdoblja praćenja, ovi naši rezultati upućuju na to da određeni genotipovi mogu poslužiti kao pouzdani pokazatelji učinkovitosti liječenja, čime se naglašava potencijalna uloga genetskog testiranja u stratifikaciji pacijenata za personaliziranu terapiju. Takva stratifikacija mogla bi pomoći u identificiranju pojedinaca kod kojih bi terapija IFN- β bila djelotvorna. Rezultati genetskog testiranja u kombinaciji s kliničkim karakteristikama mogli bi se koristiti u donošenju utemeljenijih odluka pri liječenju bolesnika s MS-om. Primjerice, predost IFN- β kod bolesnika s genotipom *CTLA4* +49 AA u odnosu na druge lijekove iz iste skupine učinkovitosti. Razumijevanje genetskih utjecaja također bi moglo usmjeravati razvoj kombiniranih terapijskih pristupa, usmjerenih na više patofizioloških puteva uključenih u MS, čime bi se potencijalno povećala učinkovitost liječenja i smanjile nuspojave.

Naši rezultati dodatno naglašavaju važnost analiza specifičnih za spol, kao i potrebu za provođenjem većih studija u drugim populacijama bolesnika kako bi se rezultati potvrdili u različitim etničkim skupinama i zemljopisnim regijama. Nadalje, snaga ovog istraživanja leži u sustavnoj analizi genetičkih, kliničkih i spolnih čimbenika, što doprinosi razumijevanju složene poligenske i imunološke regulacije odgovora na

IFN- β u MS-u. Ovakav pristup potencijalno može poboljšati ishode liječenja, prilagođavanjem terapije individualnim genetskim profilima, čime se u konačnici poboljšava skrb za bolesnike s MS-om, s mogućnošću primjene i u drugim složenim bolestima.

6. ZAKLJUČCI

1. U MS bolesnika nisu utvrđene značajne razlike ($p > 0,05$) u kliničkim karakteristikama prije početka terapije IFN- β između bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju i onih bez odgovora na terapiju, a razlika nije bila prisutna niti nakon stratifikacije po spolu.
2. Nakon 2 godine od početka terapije IFN- β je utvrđen značajno veći ($p < 0,0001$) EDSS u bolesnika bez odgovora na terapiju u odnosu na bolesnike s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β , što je potvrđeno i u ženskih MS bolesnica ($p < 0,0001$), ali ne i u muških MS bolesnika.
3. U ukupnom uzorku MS bolesnika nije utvrđen pojedinačni utjecaj polimorfizama +49 A/G i CT60 A/G u *CTLA4* genu (rs231775 i rs3087243), Δ 32 u *CCR5* genu (rs333) ni rs20576 *TNFRSF10A* gena u odgovoru na liječenje IFN- β , jer se distribucije alela i genotipova nisu značajno razlikovale ($p > 0,05$) između bolesnika s pozitivnim odgovorom na terapiju i onih bez odgovora na terapiju IFN- β .
4. Nakon podjele MS bolesnika prema spolu utvrđena je značajno veća (42,1%) učestalost *CTLA4* +49 AA genotipa u MS bolesnica s pozitivnim odgovorom na terapiju IFN- β nego u MS bolesnica bez odgovora na terapiju (28,9%, $p = 0,039$), a sukladno tome i kodominantni genetički model AA vs. AG pokazao je statističku značajnost ($p = 0,042$).
5. U manjoj skupini muških MS bolesnika *TNFRSF10A* rs20576 AA genotip se pokazao povezan s povoljnim ($p = 0,044$), a AC ($p = 0,022$) s nepovoljnim odgovorom na terapiju IFN- β što nije potvrđeno u većoj skupini MS bolesnica ni u ukupnom uzorku MS bolesnika, niti je razvidno iz frekvencije *TNFRSF10A* rs20576 alela ($p > 0,05$).
6. Genotip *CTLA4* +49 AA u MS bolesnica pokazao je značajnost u kombinaciji s genotipom CT60 AG ($p = 0,011$) i u kombinaciji s *CCR5* wt/wt genotipom ($p = 0,025$) između žena s pozitivnim i bez odgovora na terapiju IFN- β , ali ukupna analiza ne ukazuje na direktno međudjelovanje svih triju *CTLA4*, *CCR5* i *TNFRSF10A* gena ($p > 0,05$).

7. Genotip *CTLA4* +49 AA pojedinačno značajno predviđa pozitivan odgovor na terapiju IFN- β u žena ($p = 0,011$) i pridonosi 4,5% varijabilnosti odgovora, a na isti način djeluje i u kombinaciji s CT60 AG ($p=0,006$), u kombinaciji s *CCR5* wt/wt ($p=0,016$) i u kombinaciji s *TNFRSF10A* AA ($p=0,046$).

8. Kombinacija *CTLA4* +49/CT60 AA/AG genotipa i kombinacija *CTLA4* +49/*TNFRSF10A* AA/AA genotipa zajedno s kasnijom dobi nastupa bolesti povezana je s pozitivnim odgovorom na terapiju u svih MS bolesnika ($p=0,005$ i $p=0,046$), doprinoseći s 6,0% i 4,4% varijabilnosti odgovora.

9. Genotip *CTLA4* +49 AA je prediktor povoljnog odgovora na liječenje IFN- β prvenstveno kod MS bolesnica, što ujedno naglašava važnost terapijskog pristupa MS-u specifičnog za spol.

LITERATURA

1. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2018;378:169–80.
2. Walton C, King R, Rechtman L i sur. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler* 2020;26:1816–21.
3. Koch-Henriksen N, Magyari M. Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2021;17:676–88.
4. Benjak T, Štefančić V, Draušnik Ž i sur. Prevalence of multiple sclerosis in Croatia: data from national and non-governmental organization registries. *Croat Med J* 2018;59:65–70.
5. Simpson S, Wang W, Otahal P, Blizzard L, Van Der Mei IAF, Taylor BV. Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019;90:1193–200.
6. 't Hart BA, Luchicchi A, Schenk GJ, Stys PK, Geurts JJG. Mechanistic underpinning of an inside-out concept for autoimmunity in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2021;8:1709–19.
7. Morgan BP, Gommerman JL, Ramaglia V. An “Outside-In” and “Inside-Out” Consideration of Complement in the Multiple Sclerosis Brain: Lessons From Development and Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci* 2021;14:600656.
8. Delgado S, Sheremata WA. The role of CD4+ T-cells in the development of MS. *Neurol Res* 2006;28:245–9.
9. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695–705.

10. Liu R, Du S, Zhao L i sur. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol* 2022;13:996469.
11. Cencioni MT, Mattoscio M, Magliozzi R, Bar-Or A, Muraro PA. B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat Rev Neurol* 2021;17:399–414.
12. Ran Z, Yue-Bei L, Qiu-Ming Z, Huan Y. Regulatory B Cells and Its Role in Central Nervous System Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front Immunol* 2020;11:1884.
13. Campbell G, Licht-Mayer S, Mahad D. Targeting mitochondria to protect axons in progressive MS. *Neurosci Lett* 2019;710:134258.
14. Proulx ST, Engelhardt B. Central nervous system zoning: How brain barriers establish subdivisions for CNS immune privilege and immune surveillance. *J Intern Med* 2022;292:47–67.
15. Lublin FD, Reingold SC. 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* 1996;46:907–11.
16. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA i sur. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014;83:278–86.
17. Hamdy E, Talaat F, Ramadan I i sur. Diagnosing ‘transition’ to secondary progressive multiple sclerosis (SPMS): A step-by-step approach for clinicians. *Mult Scler Relat Disord* 2022;60:103718.
18. Müller J, Cagol A, Lorscheider J i sur. Harmonizing Definitions for Progression Independent of Relapse Activity in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *JAMA Neurol* 2023;80:1232–45.
19. Lublin FD, Häring DA, Ganjgahi H i sur. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain* 2022;145:3147–61.

20. Cagol A, Schaedelin S, Barakovic M i sur. Association of Brain Atrophy With Disease Progression Independent of Relapse Activity in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol* 2022;79:682–92.
21. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F i sur. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 2018;17:162–73.
22. Montalban X, Lebrun-Frénay C, Oh J i sur. Diagnosis of multiple sclerosis: 2024 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 2025;24:850–65.
23. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O i sur. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol* 2016;15:292–303.
24. Rocca MA, Preziosa P, Barkhof F i sur. Current and future role of MRI in the diagnosis and prognosis of multiple sclerosis. *Lancet Reg Health Eur* 2024;44:100978.
25. Candeloro R, Ferri C, Laudisi M, Baldi E, Pugliatti M, Castellazzi M. The Diagnostic Utility of Oligoclonal Bands in Multiple Sclerosis: A Time-Course Analysis. *Biomedicines* 2025;13:440.
26. Wuschek A, Bussas M, El Hussein M i sur. Somatosensory evoked potentials and magnetic resonance imaging of the central nervous system in early multiple sclerosis. *J Neurol* 2023;270:824–30.
27. Ning L, Wang B. Neurofilament light chain in blood as a diagnostic and predictive biomarker for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2022;17:e0274565.
28. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444–52.
29. Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol* 2014;14:58.

30. Roxburgh RHSR, Seaman SR, Masterman T i sur. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005;64:1144–51.
31. Barnes D, Hughes RA, Morris RW i sur. Randomised trial of oral and intravenous methylprednisolone in acute relapses of multiple sclerosis. *Lancet* 1997;349:902–6.
32. Habek M, Adamec I, Barun B i sur. Treatment of relapsing multiple sclerosis - recommendations of the Croatian Neurological Society. *Croat Med J* 2022;63:379–88.
33. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74 Suppl 1:S17-24.
34. Mitsdoerffer M, Kuchroo V. New pieces in the puzzle: how does interferon-beta really work in multiple sclerosis? *Ann Neurol* 2009;65:487–8.
35. Haji Abdolvahab M, Mofrad MRK, Schellekens H. Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016;326:343–72.
36. Weinstock-Guttman B, Badgett D, Patrick K i sur. Genomic effects of IFN-beta in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 2003;171:2694–702.
37. Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R i sur. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol Cell Biol* 2016;94:886–94.
38. Yong VW, Giuliani F, Xue M, Bar-Or A, Metz LM. Experimental models of neuroprotection relevant to multiple sclerosis. *Neurology* 2007;68:S32-37; discussion S43-54.
39. 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* 1993;43:655–61.

40. Kuhle J, Hardmeier M, Disanto G i sur. A 10-year follow-up of the European multicenter trial of interferon β -1b in secondary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2016;22:533–43.
41. Arbour N, Rastikerdar E, McCrea E i sur. Upregulation of TRAIL expression on human T lymphocytes by interferon beta and glatiramer acetate. *Mult Scler* 2005;11:652–7.
42. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol* 2001;49:290–7.
43. Khan O, Rieckmann P, Boyko A, Selmaj K, Zivadinov R, GALA Study Group. Three times weekly glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2013;73:705–13.
44. Prod'homme T, Zamvil SS. The Evolving Mechanisms of Action of Glatiramer Acetate. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2019;9:a029249.
45. Linker RA, Gold R. Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: mechanism of action, effectiveness, and side effects. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013;13:394.
46. Confavreux C, O'Connor P, Comi G i sur. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 2014;13:247–56.
47. Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol Scand* 2011;124:75–84.
48. Cohen JA, Barkhof F, Comi G i sur. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:402–15.

49. Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC i sur. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet* 2018;391:1263–73.
50. Comi G, Kappos L, Selmaj KW i sur. Safety and efficacy of ozanimod versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis (SUNBEAM): a multicentre, randomised, minimum 12-month, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 2019;18:1009–20.
51. Cook S, Leist T, Comi G i sur. Safety of cladribine tablets in the treatment of patients with multiple sclerosis: An integrated analysis. *Mult Scler Relat Disord* 2019;29:157–67.
52. Giovannoni G, Comi G, Cook S i sur. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:416–26.
53. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA i sur. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003;348:15–23.
54. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C i sur. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 2012;366:1870–80.
55. Khoy K, Mariotte D, Defer G, Petit G, Toutirais O, Le Mauff B. Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front Immunol* 2020;11:549842.
56. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G i sur. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376:221–34.
57. Hauser SL, Kappos L, Arnold DL i sur. Five years of ocrelizumab in relapsing multiple sclerosis: OPERA studies open-label extension. *Neurology* 2020;95:e1854–67.
58. Montalban X, Hauser SL, Kappos L i sur. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376:209–20.
59. Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA i sur. Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2020;383:546–57.

60. Bar-Or A, Grove RA, Austin DJ i sur. Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: The MIRROR study. *Neurology* 2018;90:e1805–14.
61. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL i sur. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012;380:1819–28.
62. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL i sur. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012;380:1829–39.
63. Havrdova E, Arnold DL, Cohen JA i sur. Alemtuzumab CARE-MS I 5-year follow-up: Durable efficacy in the absence of continuous MS therapy. *Neurology* 2017;89:1107–16.
64. Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *Int J Mol Sci* 2015;16:16414–39.
65. Toljan K, Aboseif A, Amin M. Efficacy of pharmacologic treatments for fatigue in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 2025;96:106352.
66. Rommer PS, Eichstädt K, Ellenberger D i sur. Symptomatology and symptomatic treatment in multiple sclerosis: Results from a nationwide MS registry. *Mult Scler* 2019;25:1641–52.
67. De Silvestri A, Capittini C, Mallucci G i sur. The Involvement of HLA Class II Alleles in Multiple Sclerosis: A Systematic Review with Meta-analysis. *Disease Markers* 2019;2019:1–7.
68. Vogel I, Kasran A, Cremer J i sur. CD28/CTLA-4/B7 costimulatory pathway blockade affects regulatory T-cell function in autoimmunity. *Eur J Immunol* 2015;45:1832–41.

69. Khan Z, Mehan S, Maurya PK i sur. The Polygenic Nature of Multiple Sclerosis: Genetic Variants, Immunological Modulation, and Environmental Connections. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2025;25:527–59.
70. Kular L, Liu Y, Ruhrmann S i sur. DNA methylation as a mediator of HLA-DRB1*15:01 and a protective variant in multiple sclerosis. *Nat Commun* 2018;9:2397.
71. Guerau-de-Arellano M, Smith KM, Godlewski J i sur. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain* 2011;134:3575–86.
72. Shams H, Shao X, Santaniello A i sur. Polygenic risk score association with multiple sclerosis susceptibility and phenotype in Europeans. *Brain* 2023;146:645–56.
73. Yang W, Liu C, Li Z, Cui M. Multi-omic biomarkers associated with multiple sclerosis: from Mendelian randomization to drug prediction. *Sci Rep* 2025;15:9421.
74. Mäurer M, Loserth S, Kolb-Mäurer A i sur. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (*CTLA4*) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002;54:1–8.
75. Patel H, Mansuri MS, Singh M, Begum R, Shastri M, Misra A. Association of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (*CTLA4*) and Thyroglobulin (TG) Genetic Variants with Autoimmune Hypothyroidism. *PLoS One* 2016;11:e0149441.
76. Liu J, Zhang HX. CTLA-4 Gene and the Susceptibility of Multiple Sclerosis: An Updated Meta-analysis Study Including 12,916 Cases and 15,455 Controls. *Journal of Neurogenetics* 2014;28:153–63.
77. Ghorban K, Dadmanesh M, Hassanshahi G i sur. Is the *CCR5-Δ32* Mutation Associated with Immune System-Related Diseases? *Inflammation* 2013;36:633–42.

78. Trebst C, Sørensen TL, Kivisäkk P i sur. CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2001;159:1701–10.
79. Gu SM, Park MH, Yun HM i sur. CCR5 knockout suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Oncotarget* 2016;7:15382–93.
80. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev* 2009;35:280–8.
81. de-la-Torre A, Silva-Aldana CT, Muñoz-Ortiz J i sur. Uveitis and Multiple Sclerosis: Potential Common Causal Mutations. *Mol Neurobiol* 2019;56:8008–17.
82. Huang W-X null, Huang MP, Gomes MA, Hillert J. Apoptosis mediators fasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in MS. *Neurology* 2000;55:928–34.
83. Chen B, Liu S, Wang XL i sur. TRAIL-R1 polymorphisms and cancer susceptibility: an evidence-based meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009;45:2598–605.
84. López-Gómez C, Fernández O, García-León JA i sur. TRAIL/TRAIL receptor system and susceptibility to multiple sclerosis. *PLoS One* 2011;6:e21766.
85. López-Gómez C, Oliver-Martos B, Pinto-Medel MJ i sur. TRAIL and TRAIL receptors splice variants during long-term interferon β treatment of patients with multiple sclerosis: evaluation as biomarkers for therapeutic response. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:130–7.
86. López-Gómez C, Pino-Ángeles A, Órpez-Zafra T i sur. Candidate gene study of TRAIL and TRAIL receptors: association with response to interferon beta therapy in multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2013;8:e62540.

87. Clarelli F, Liberatore G, Sorosina M i sur. Pharmacogenetic study of long-term response to interferon- β treatment in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics J* 2017;17:84–91.
88. Byun E, Caillier SJ, Montalban X i sur. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008;65:337–44.
89. Hočevár K, Ristić S, Peterlin B. Pharmacogenomics of Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Front Neurol* 2019;10:134.
90. Zula JA, Green HC, Ransohoff RM, Rudick RA, Stark GR, van Boxel-Dezaire AHH. The role of cell type-specific responses in IFN- β therapy of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:19689–94.
91. Szczuciński A, Losy J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta Neurol Scand* 2007;115:137–46.
92. Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, Masuda S, Nomura F, Kuwabara S. Expression of chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *BMC Neurol* 2010;10:113.
93. Song GG, Lee YH. A Meta-analysis of the relation between chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and multiple sclerosis susceptibility. *Immunol Invest* 2014;43:299–311.
94. Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen CV, Jensen J, Garred P. *CCR5* delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000;102:98–106.
95. Kantor R, Bakhanashvili M, Achiron A. A mutated *CCR5* gene may have favorable prognostic implications in MS. *Neurology* 2003;61:238–40.
96. Sellebjerg F, Kristiansen TB, Wittenhagen P i sur. Chemokine receptor *CCR5* in interferon-treated multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica* 2007;115:413–8.

97. Kulakova OG, Tsareva EY, Boyko AN i sur. Allelic Combinations of Immune-Response Genes as Possible Composite Markers of IFN- β Efficacy in Multiple Sclerosis Patients. *Pharmacogenomics* 2012;13:1689–700.
98. Greve B, Simonenko R, Illes Z i sur. Multiple sclerosis and the *CTLA4* autoimmunity polymorphism CT60: no association in patients from Germany, Hungary and Poland. *Mult Scler* 2008;14:153–8.
99. Heggarty S, Suppiah V, Silversides J i sur. *CTLA4* gene polymorphisms and multiple sclerosis in Northern Ireland. *J Neuroimmunol* 2007;187:187–91.
100. Roxburgh RH, Sawcer S, Maranian M i sur. No evidence of a significant role for CTLA-4 in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2006;171:193–7.
101. Suppiah V, Alloza I, Heggarty S, Goris A, Et. A. The *CTLA4* +49 A/G*G–CT60*G haplotype is associated with susceptibility to multiple sclerosis in Flanders. *Journal of Neuroimmunology* [Internet] 2005 [cited 2026 Jan 13]; Available from: <https://sci-hub.st/10.1016/j.jneuroim.2005.04.003>
102. Barcellos LF, Schito AM, Rimmler JB i sur. CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Genetics Group. Immunogenetics* 2000;51:281–8.
103. Gade-Andavolu R, Comings DE, MacMurray J i sur. Association of *CCR5* delta32 deletion with early death in multiple sclerosis. *Genet Med* 2004;6:126–31.
104. Mäurer M, Ponath A, Kruse N, Rieckmann P. *CTLA4* exon 1 dimorphism is associated with primary progressive multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2002;131:213–5.
105. Bilińska M, Frydecka I, Noga L i sur. Progression of multiple sclerosis is associated with exon 1 *CTLA-4* gene polymorphism. *Acta Neurologica Scandinavica* 2004;110:67–71.
106. Karabon L, Kosmaczewska A, Bilinska M i sur. The *CTLA-4* gene polymorphisms are associated with *CTLA-4* protein expression levels in multiple sclerosis patients and with susceptibility to disease. *Immunology* 2009;128:e787–96.

107. Karam RA, Rezk NA, Amer MM, Fathy HA. Immune response genes receptors expression and polymorphisms in relation to multiple sclerosis susceptibility and response to INF- β therapy. *IUBMB Life* 2016;68:727–34.
108. Carrasco-Campos MI, Pérez-Ramírez C, Macías-Cortés E i sur. Pharmacogenetic Predictors of Response to Interferon Beta Therapy in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 2021;58:4716–26.
109. Ristic S, Lovrečić L, Starcevic-Cizmarevic N i sur. No association of *CCR5*delta32 gene mutation with multiple sclerosis in Croatian and Slovenian patients. *Mult Scler* 2006;12:360–2.
110. Čizmarević NS, Gašparović I, Peterlin B i sur. CTLA-4 +49 A/G gene polymorphism in Croatian and Slovenian multiple sclerosis patients. *International Journal of Immunogenetics* 2011;38:419–26.
111. Gubbels Bupp MR, Potluri T, Fink AL, Klein SL. The Confluence of Sex Hormones and Aging on Immunity. *Front Immunol* 2018;9:1269.
112. Voskuhl RR, Gold SM. Sex-related Factors in Multiple Sclerosis: Genetic, Hormonal and Environmental Contributions. *Nat Rev Neurol* 2012;8:255–63.
113. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the *CCR5* gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 1997;16:100–3.
114. Bennetts BH, Teutsch SM, Buhler MM, Heard RNS, Stewart GJ. The *CCR5* Deletion Mutation Fails to Protect Against Multiple Sclerosis. *Human Immunology* 1997;58:52–9.
115. Lin TW, Hu YC, Yang YH i sur. CTLA-4 gene mutation and multiple sclerosis: A case report and literature review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2022;55:545–8.
116. Ristić S, Starcević Cizmarević N, Brajenović-Milić B, Crnić-Martinović M, Kapović M. Frequency of *CCR5* gene 32-basepair deletion in Croatian normal population. *Croat Med J* 2005;46:693–4.

117. Kosmaczewska A, Bilinska M, Ciszak L i sur. Different patterns of activation markers expression and CD4+ T-cell responses to ex vivo stimulation in patients with clinically quiescent multiple sclerosis (MS). *Journal of Neuroimmunology* 2007;189:137–46.
118. Oliveira EML, Bar-Or A, Waliszewska AI i sur. CTLA-4 dysregulation in the activation of myelin basic protein reactive T cells may distinguish patients with multiple sclerosis from healthy controls. *Journal of Autoimmunity* 2003;20:71–81.
119. Eschborn M, Pawlitzki M, Wirth T i sur. Evaluation of Age-Dependent Immune Signatures in Patients With Multiple Sclerosis. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation* 2021;8:e1094.
120. Kuchroo VK, Brown JA, Ranger AM i sur. B7-1 and B7-2 Costimulatory Molecules Activate Differentially the Th1/Th2 Developmental Pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy.
121. Hallal-Longo DEM, Mirandola SR, Oliveira EC i sur. Diminished Myelin-Specific T Cell Activation Associated with Increase in *CTLA4* and Fas Molecules in Multiple Sclerosis Patients Treated with IFN- β . *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2007;27:865–74.
122. Sellebjerg F, Krakauer M, Khademi M, Olsson T, Sørensen PS. FOXP3, CBLB and ITCH gene expression and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression on CD4+CD25^{high} T cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2012;170:149–55.
123. Espejo C, Brieva L, Ruggiero G, Ríó J, Montalban X, Martínez-Cáceres EM. IFN-beta treatment modulates the CD28/CTLA-4-mediated pathway for IL-2 production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004;10:630–5.
124. Wolf S, Mertens D, Pscherer A i sur. Ala228 variant of trail receptor 1 affecting the ligand binding site is associated with chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, prostate cancer, head and neck squamous cell carcinoma and bladder cancer. *Int J Cancer* 2006;118:1831–5.

125. Song K, Chen Y, Göke R i sur. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* 2000;191:1095–104.
126. Wandinger KP, Lünemann JD, Wengert O i sur. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 2003;361:2036–43.
127. Greer JM, McCombe PA. Role of gender in multiple sclerosis: Clinical effects and potential molecular mechanisms. *Journal of Neuroimmunology* 2011;234:7–18.
128. Contasta I, Totaro R, Pellegrini P, Del Beato T, Carolei A, Berghella AM. A gender-related action of IFNbeta-therapy was found in multiple sclerosis. *J Transl Med* 2012;10:223.
129. Golden LC, Voskuhl R. The importance of studying sex differences in disease: The example of multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research* 2017;95:633–43.
130. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ i sur. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *The American Journal of Pathology* 2008;172:146–55.

ILUSTRACIJE

Popis slika

Slika 1. Alelna diskriminacija postupkom Real-time PCR s vrijednosti Alela 1 (VIC boja) i Alela 2 (FAM boja)

Slika 2. EDSS nakon ≥ 2 godina od početka terapije prema odgovoru na liječenje IFN- β u: a) svih MS bolesnika (za Rs - $2,5 \pm 1,6$, za NRs - $3,9 \pm 1,7$); b) žena oboljelih od MS (za Rs - $2,7 \pm 1,7$, za NRs - $4,0 \pm 1,5$)

Popis tablica

Tablica 1. Klinički profil osoba oboljelih od MS (N=295)

Tablica 2. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja (Ts) za analizu *CCR5- Δ 32* polimorfizma

Tablica 3. PCR reakcijska smjesa za *CCR5- Δ 32* polimorfizam u konačnom volumenu od 15 μ l

Tablica 4. Program PCR – temperaturni ciklusi, *CCR5- Δ 32* polimorfizam

Tablica 5. Veličina PCR produkata pri utvrđivanju *CCR5- Δ 32* genotipova

Tablica 6. Sekvenca početnih oligonukleotida i temperatura njihovog spajanja (Ts) za analizu +49A/G i CT60 polimorfizama *CTLA4* gena

Tablica 7. PCR reakcijska smjesa za polimorfizme +49A/G i CT60 *CTLA4* gena u konačnom volumenu od 10 μ l

Tablica 8. PCR – temperaturni ciklusi, *CTLA4* +49A/G i CT60 polimorfizmi

Tablica 9. Restriksijska smjesa za analizu +49A/G i CT60 polimorfizama *CTLA4* gena

Tablica 10. Veličina PCR produkta i veličina restriksijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi +49A/G polimorfizma *CTLA4* gena

Tablica 11. Veličina PCR produkta i veličina restriksijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi CT60 polimorfizma *CTLA4* gena

Tablica 12. Opis TaqMan Assay C__12102849_10 za rs20576 polimorfizam *TNFRSF10A* gena

Tablica 13. Reakcijska smjesa za Real-time PCR (konačni volumen 9 μ L)

Tablica 14. Real-time PCR temperaturni ciklusi

Tablica 15. Kliničke karakteristike svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 16. Kliničke karakteristike osoba oboljelih od MS-a (N=295) prema spolu i odgovor na terapiju IFN- β

Tablica 17. Učestalost genotipova i alela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 18. Povezanost genetičkih modela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u svih MS bolesnika (N=295)

Tablica 19. Učestalost genotipova i alela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 20. Povezanost genetičkih modela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65)

Tablica 21. Učestalost genotipova i alela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena u žena oboljelih od MS-a (N=230) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 22. Povezanost genetičkih modela $\Delta 32$ polimorfizma (rs333) *CCR5* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u žena oboljelih od MS-a (N=230)

Tablica 23. Učestalost genotipova i alela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 24. Povezanost genetičkih modela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u svih MS bolesnika (N=295)

Tablica 25. Učestalost genotipova i alela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 26. Povezanost genetičkih modela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65)

Tablica 27. Učestalost genotipova i alela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena u žena oboljelih od MS-a (N=230) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 28. Povezanost genetičkih modela +49 A/G polimorfizma (rs231775) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u žena oboljelih od MS-a (N=230)

Tablica 29. Učestalost genotipova i alela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 30. Povezanost genetičkih modela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u svih MS bolesnika (N=295)

Tablica 31. Učestalost genotipova i alela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 32. Povezanost genetičkih modela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65)

Tablica 33. Učestalost genotipova i alela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena u žena oboljelih od MS-a (N=230) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 34. Povezanost genetičkih modela CT60 A/G polimorfizma (rs3087243) *CTLA4* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u žena oboljelih od MS-a (N=230)

Tablica 35. Distribucija kombinacija *CTLA4* 49+ i CT60 genotipova u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 36. Distribucija kombinacija *CTLA4* 49+ i CT60 genotipova u muškaraca oboljelih od MS-a (N=65) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 37. Distribucija kombinacija *CTLA4* 49+ i CT60 genotipova u žena oboljelih od MS-a (N=230) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 38. Učestalost genotipova i alela *TNFRSF10A* gena (rs20576) u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 39. Povezanost genetičkih modela varijante rs20576 *TNFRSF10A* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u svih MS bolesnika (N=285)

Tablica 40. Učestalost genotipova i alela *TNFRSF10A* gena (rs20576) gena u muškaraca oboljelih od MS-a (N=63) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 41. Povezanost genetičkih modela varijante rs20576 *TNFRSF10A* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u muškaraca oboljelih od MS-a (N=63)

Tablica 42. Učestalost genotipova i alela *TNFRSF10A* gena (rs20576) gena u žena oboljelih od MS-a (N=222) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 43. Povezanost genetičkih modela varijante rs20576 *TNFRSF10A* gena s odgovorom na liječenje IFN- β u žena oboljelih od MS-a (N=222)

Tablica 44. Učestalost kombinacije genotipova za *CCR5- Δ 32* varijantu (rs333) i *CTLA4* +49 A/G (rs231775) te CT60 A/G (rs3087243) varijante u svih MS bolesnika (N=295) prema odgovoru na liječenje IFN- β

Tablica 45. Učestalost kombinacije genotipova za varijante *CCR5-Δ32* (rs333) i *TNFRSF10A* rs20576 u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Tablica 46. Učestalost kombinacije genotipova za varijante *CCR5-Δ32* (rs333) i *TNFRSF10A* rs20576 u muškaraca oboljelih od MS-a (N=63) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Tablica 47. Učestalost kombinacije genotipova za varijante *CCR5-Δ32* (rs333) i *TNFRSF10A* rs20576 u žena oboljelih od MS-a (N=222) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Tablica 48. Učestalost kombinacije genotipova za *TNFRSF10A* rs20576 varijantu i *CTLA4* +49 A/G (rs231775) te CT60 A/G (rs3087243) varijante u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN-β

Tablica 49. Distribucija odabranih kombinacija genotipova za *CCR5-Δ32*, *TNFRSF10A* rs20576, *CTLA4* +49 A/G (rs231775) i CT60 A/G (rs3087243) varijante u svih MS bolesnika (N=285) prema odgovoru na liječenje IFN-β

POPIS POKRATA

APC – antigen predočne stanice (engl. *Antigen presenting cells*)

BPB – brom fenol modriilo (engl. *Bromphenol blue*)

CCR5 – kemokinski receptor 5 (engl. *Chemokine receptor 5*)

CIS – klinički izolirani sindrom (engl. *Clinicaly isolated syndrom*)

CSL – cerebrospinalni likvor

CTLA-4 – protein 4 vezan uz citotoksični limfocit T (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)

EAE – eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis (engl. *Experimental autoimmune encephalomyelitis*)

EDSS – proširena skala statusa onesposobljenosti (engl. *Expanded Dissability Status Scale*)

EVB – Epstein Barrov virus

GA – Glatiramer acetat

Gd- – gadolinij negativna lezija, neaktivna lezija

Gd+ – gadolinij pozitivna lezija, aktivna lezija

GWAS – cijelogenomska asocijacijska studija (engl. *Genom Wide Association Study*)

HHV-6 – humani herpes virus – 6

HLA – humani leukocitni antigen (engl. *Human Leukocyte Antigen*)

HSV – herpes virus

IFN- β – interferon beta

IFN- γ – interferon gama

IgG – imunoglobulin G

IL – interleukin

KMB – krvno-moždana barijera

MBP – bazična mijelinska bjelančevina (engl. *Myelin Basic Protein*)

MOG – mijelinski oligodendrocitni glikoprotein

MR – magnetska rezonanca

MS – multipla skleroza

MSSS – skala za procjenu težine multiple skleroze (engl. *Multiple Sclerosis Severity Score*)

NfL – laki lanci neurofilamenata (engl. *Neurofilament Light chain*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *Polimerase chain reaction*)

PPMS – primarno progresivna multipla skleroza

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time – PCR*)

RRMS – relapsno remitirajuća multipla skleroza

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

SPMS – sekundarno progresivna multipla skleroza

SŽS – središnji živčani sustav

TNF α – tumorski faktor nekroze alfa (engl. *Tumor necrosis factor alpha*)

TNFRSF10A – gen za receptor 10A čimbenika nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10A*)

TNFRSF1A – receptor 1A čimbenika nekroze tumora (engl. *Tumour-necrosis-factor receptor superfamily member 1A*)

ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Jasna Nekić

Adresa: Andretići 157, HR 51211 Matulji, Republika Hrvatska

Datum rođenja: 10. veljače 1974.

E-mail: jasna.nekic@gmail.com

Državljanstvo: Republika Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

Datum: 27.listopada 2014. – trenutačno

Ustanova zaposlenja: Klinički bolnički centar Rijeka, Krešimirova 42, 51000 Rijeka, Hrvatska

Radno mjesto: liječnica specijalistica nuklearne medicine

Datum: 22. siječnja 2022. – trenutačno

Ustanova zaposlenja: Medicinski fakultet u Rijeci, Braće Branchetta 20, Katedra za nuklearnu medicinu

Radno mjesto: asistentica

Datum: 25. kolovoza 2023. - trenutačno

Ustanova zaposlenja: Specijalna bolnica Medico, Agatićeva 8, Rijeka, Hrvatska

Radno mjesto: liječnica specijalistica

Datum: listopad 2016. - prosinac 2022.

Ustanova zaposlenja: Medicinski fakultet u Rijeci, Braće Branchetta 20, Katedra za nuklearnu medicinu

Radno mjesto: naslovna asistentica

Datum: siječanj 2010. – listopad 2014.

Ustanova zaposlenja: Klinički bolnički centar Rijeka, Krešimirova 42, 51000 Rijeka, Hrvatska

Radno mjesto: liječnik specijalizant nuklearne medicine

Datum: travanj 2006. – prosinac 2009.

Ustanova zaposlenja: «AstraZeneca» d.o.o , Zagreb, Branimirova 29

Radno mjesto: stručna suradnica u prodaji lijekova

Datum: kolovoz 2005. – travanj 2006.

Ustanova zaposlenja: Ordinacija opće medicine dr Ljiljana Radović Antolović, Rijeka,
Zametska 63

Radno mjesto: liječnica

Datum: studeni 2004.

Ustanova zaposlenja: Osnovna škola «Sveti Matej», Viškovo

Radno mjesto: učiteljica prirode i biologije

Datum: srpanj 2004. – rujan 2004. ; srpanj 2001. – rujan 2002.

Ustanova zaposlenja: Ordinacija opće medicine Mirjana Krstić Arbanas, dr.med, Bakar,
Veberova 157

Radno mjesto: liječnica

Datum: studeni 1998. – studeni 1999.

Ustanova zaposlenja: Dom zdravlja Rijeka

Radno mjesto: liječnica pripravnica

OBRAZOVANJE

Datum: 2009. –

Ustanova: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
Hrvatska

Studij: Posljediplomski sveučilišni (doktorski) sudij Biomedicina

Datum: 2010. – 2014.

Ustanova: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Studij: Sveučilišni specijalistički studij Nuklearna medicina

Datum: 1992. – 1998.

Ustanova: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
Hrvatska

Studij: Medicina

Titula: doktor medicine

Datum: 1988. – 1992.

Ustanova: Centar za kadrove u obrazovanju i kulturi, Rijeka

Smjer: laborant u fizici

USAVRŠAVANJA

- AD-LEARN mini-course for Residents: How to Start Reading Brain Scans in Neurocognitive Disorders, Beč, Austrija, 2025.
- Advanced Life Support (ALS) –Rijeka, 2019.
- "ESMIT Winter Course Thyroid and Cardiology tracs" Lisabon, Portugal. 2019
- "ESMIT Spring Course Musculoskeletal and Oncology tracs" Gronningen, Nizozemska. 2017
- IAEA Training Course on Managemet of Thyroid and Parathyroid Disease, Limassol, Cipar, 2015
- IAEA Regional Training Course on Hybrid Imaging: SPECT/CT, PET/CT and Sentinel Lymph Node Localization Techniques; Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2014
- 55. Seminar - European School of Nuclear Medicine, Bucharest, Rumunjska, 2013.
- 54. Seminar - European School of Nuclear Medicine, Opatija, Hrvatska, 2013.
- 51. Seminar – European School of Nuclear Medicine, Varna, Bugarska, 2012.
- Poslijediplomski tečaj "Ultrazvuk vratnih organa", KBC Zagreb, 2011.
- 47. Seminar – European School of Nuclear Medicine, Opatija, Hrvatska, 2011.

SUDJELOVANJE NA ISTRAŽIVAČKIM PROJEKTIMA

- „Farmakogenetika multiple skleroze: odgovor na imunomodulacijsku terapiju“. (Uniri- biomed-18-137) voditeljica prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević
- „Utjecaj gena autoimunosnog odgovora na učinkovitost imunomodulacijske terapije interferonom beta u multiploj sklerozi“. (MedRi potpora-100.24.0004.) voditeljica prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević
- „Genetičko epidemiološka reanaliza multiple skleroze u Gorskom kotaru „ (Uniri-iskusni-biomed-23-135) voditeljica prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević
- Značaj rijetkih varijanti gena imunološkog odgovora u istraživanju genetičke osnove multiple skleroze HRZZ IP-2025-02-1266- voditeljica prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

- Međunarodni kongres Hrvatskog društva za nuklearnu medicinu, Pula 2024. – usmena prezentacija i 3 poster prezentacije
- Međunarodni kongres, ISABS, Split 2024. - 1 poster prezentacija
- Međunarodni kongres Hrvatskog društva za nuklearnu medicinu, Rovinj 2017. – 3 usmene prezentacije i 1 poster prezentacija
- Međunarodni kongres Hrvatskog društva za nuklearnu medicinu, Šibenik 2014. – 1 poster prezentacija
- Međunarodni kongres Europskog društva za nuklearnu medicinu, Milano 2012. – 1 poster prezentacija

PUBLIKACIJE:

1. Nekić J, Stanković Matić I, Rački V, Janko Labinac D, Vuletić V, Kapović M, Ristić S, Peterlin B, Starčević Čizmarević N. CCR5 Δ 32 and CTLA-4 +49 A/G Gene Polymorphisms and Interferon- β Treatment Response in Croatian and Slovenian Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci.* 2024;25(13):7412.
2. Žuža I, Dodig D, Brumini I, Kutlić M, Đurić R, Katalinić N, Gršković A, Jakšić A, Mavrinac M, Čelić T, Rački S, Orlić L, Nekić J, Markić D. Impact of Pelvic Calcification Severity on Renal Transplant Outcomes: A Prospective Single-Center Study. *J Clin Med.* 2024;13(20):6171.
3. Kustić D, Klarica Gembić T, Grebić D, Petretić Majnarić S, Nekić J. The role of different lymph node staging systems in predicting prognosis and determining indications for postmastectomy radiotherapy in patients with T1-T2pN1 breast carcinoma. *Strahlenther Onkol.* 2020;196(11):1044-1054.

ČLANSTVO U STRUČNIM I ZNANSTVENIM DRUŠTVIMA:

Hrvatska liječnička komora, Hrvatsko društvo za nuklearnu medicinu, Hrvatsko društvo za štitnjaču

