

MEĐUODNOS BDNF, IL-6 I POKAZATELJA OKSIDACIJSKOG STRESA PRI DEMIJELINIZACIJSKIM OŠTEĆENJIMA

Bogoje Raspopović, Andrijana

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:996318>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Andrijana Bogoje Raspopović

**MEĐUODNOS BDNF, IL-6 I
POKAZATELJA OKSIDACIJSKOG
STRESA PRI DEMIJELINIZACIJSKIM
OŠTEĆENJIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE DEPARTMENT OF BIOLOGY

Andrijana Bogoje Raspopović

**CORRELATION OF BDNF, IL-6 AND
OXIDATIVE STRESS MARKERS IN
DEMYELINATING DAMAGE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024

Ovaj je doktorski rad izrađen u OB Dubrovnik i Zavodu za animalnu fiziologiju PMF Zagreb, pod vodstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića i akademkinje Vide Demarin, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog istraživanja Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Domagoju Đikiću i Akademkinji Vidi Demarin,
na stručnim savjetima, neiscrpnom znanju i iskustvu.

Velika hvala prijateljici kemičarki Dolores, sestrama Maji, Petrunjeli i Lini, kolegama Marini
i Maru na prijateljskoj podršci i pomoći, te svim ispitanicima i djelatnicima Opće bolnice
Dubrovnik koji su pomogli u izradi ovoga rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji
kojoj posvećujem ovaj rad.

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

MEĐUODNOS BDNF, IL-6 I POKAZATELJA OKSIDACIJSKOG STRESA PRI DEMIJELINIZACIJSKIM OŠTEĆENJIMA

ANDRIJANA BOGOJE RASPOPOVIĆ

BDNF, IL-6 i biljezi oksidacijskog stresa nedvojbeno imaju utjecaj na demijelinizacijski proces u multiploj sklerozi. Točni mehanizmi utjecaja na upalnu i neurodegenerativnu fazu nisu u potpunosti razjašnjeni. U ovo istraživanje je uključeno 60 ispitanika (19 muških i 41 ženskih) koji zadovoljavaju kriterije relapsno remitentne multiple skleroze (RRMS), i 66 zdravih kontrola (24 muških, 42 ženskih). Srednja dob oboljelih i zdravih je 43,5 godina. Iz krvi ispitanika određena je razina neurotrofina BDNF-a (proBDNF i mBDNF) i IL-6 ELISA testom, a biljega oksidacijskog stresa (MDA, GSH, katalaze i karboniliranih proteina) spektrofotometrijskom metodom, te ih se dodatno koreliralo s brojem demijelinizacijskih T1,T2/FLAIR i gadolinij imbibirajućih lezija. Utvrđena je i korelacija omjera navedenih fizioloških parametara sa stupnjem onesposobljenosti (EDSS), kognitivnim (MoCA test) i depresivnim deficitom (BDI-II upitnik). Dokazana je statistički značajna ($P < 0,001$) negativna korelacija serumskih razina biljega oksidacijskog stresa glutaciona (GSH) na razvoj kognitivnih promjena ispitanika s RRMS-om ispitanih MoCA testom. Ovo je prvo istraživanje ispitanika s RRMS-om temeljeno na istraživanju serumske razine glutaciona na stupanj kongitivnog oštećenja ispitanog MoCA testom. Na razvoj kognitivnih promjena u ovom istraživanju verificiranih MoCA testom, je statistički pozitivno značajno utjecao broj MR lezija (T1,T2,FLAIR) stupanj depresije, stupanj neurološke onesposobljenosti verificirane EDSS skalom, dob, te vrijednosti GSH. Ispitanici s višim vrijednostima MoCA testa su bili mlađi, imali manji stupanj neurološke onesposobljenosti, bili manje depresivni i imali su manje vrijednosti glutaciona i manje demijelinizacijskih lezija na MR-u. Glutacion bi mogao biti potencijalni biljeg progresije kognitivnog deficita kod bolesnika s RRMS-om.

(117 stranica, 37 slika, 32 tablice, 147 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: RRMS, biljezi oksidacijskog stresa, glutation (GSH), MoCA test

Mentori:

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
Akademkinja Vida Demarin, HAZU

Ocjenjivači:

Prof. dr. sc. Nada Oršolić, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
Prof. dr. sc. Mario Habek, Medicinski fakultet, Zagreb
Izv. Prof. dr. sc. Dubravka Švob Švarc, Institut Ruđer Bošković

SUMMARY

University of Zagreb

Doctoral Thesis

Faculty of Science
Department of Biology

CORRELATION OF BDNF, IL-6 AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN DEMYELINATING DAMAGE

ANDRIJANA BOGOJE RASPOPOVIĆ

BDNF, IL-6 and oxidative stress markers have a distinct role on the process of demyelination in multiple sclerosis. Distinct mechanisms of influence on inflammatory and neurodegenerative phase are not clarified. 60 subjects meeting the criteria for RRMS (19 men and 41 women) and 66 healthy control subjects (24 men, 42 women) were included in the study. The average age of patients and healthy people is around 43,5 years. The levels of the neurotrophin BDNF (proBDNF and mBDNF) and IL-6 were determined from the blood of the subjects by an ELISA test and oxidative stress markers (MDA, GSH, catalase and carbonylated proteins) were determined from subjects by the spectrophotometric method and correlated with the number of demyelinating T2/FLAIR lesions and gadolinium enhanced lesions. The correlation of the ratio of the mentioned physiological parameters with the degree of disability (EDSS), cognitive (MoCA test) and depressive deficit (BDI-II questionnaire) was determined. A statistically significant ($P < 0.001$) negative correlation of serum markers of oxidative stress levels of glutathione (GSH) on the development of cognitive changes in subjects with RRMS tested with the MoCA test was shown. This is the first study of subjects with RRMS that performed the mentioned research of serum glutathione levels on the degree of cognitive damage tested by the MoCA test. The development of cognitive changes in this study, verified by the MoCA test, was statistically significantly influenced by the positive number of MR lesions (T1, T2, FLAIR), degree of depression, EDSS, age, and GSH values. Subjects with higher MoCA test values were younger, had a lower degree of neurological disability, were less depressed and had lower glutathione values and fewer demyelinating lesions on MRI. Glutathione could be a potential marker of cognitive deficit progression in patients with RRMS.

(117 pages, 37 figures, 32 tables, 147 references, original in Croatian)

Keywords: RRMS, oxidative stress markers, glutathione (GSH), MoCA test

Supervisor:

Prof. Domagoj Đikić, PhD, Faculty of Science, Zagreb
Academic Vida Demarin, Croatian Academy of Sciences and Arts

Reviewers:

Prof. Nada Oršolić, PhD, Faculty of Science, Zagreb
Prof. Dubravka Hranilović, PhD, Faculty of Science, Zagreb
Prof. Mario Habek, PhD, School of Medicine, Zagreb
Ass. Prof. dr. sc. Dubravka Švob Švarc, Institute Ruđer Bošković

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Cilj istraživanja	2
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Multipla skleroza (MS)	3
2.2. Epidemiologija multiple skleroze	3
2.3. Relapsno remitentna multipla skleroza (RRMS)	6
2.4. Patofiziologija multiple skleroze	6
2.5. Upalna faza multiple skleroze	7
2.6. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)	11
2.7. Izoforme BDNF-a	14
2.8. Interleukin 6	17
2.9. Dualni koncept patogeneze multiple skleroze	18
2.10. Neurodegenerativna faza multiple skleroze	19
2.11. Oksidacijski stres i antioksidacijski mehanizmi u MS-u	19
2.12. Magnetna rezonacija (MRI) u multiploj sklerozi	24
2.13. Depresija kao komorbiditet	24
2.14. Kognitivni poremećaji u MS-u	26
3. ISPITANICI i METODE	28
3.1. Ispitanici	28
3.2. Plan ispitivanja (postupci)	31
3.2.1. Klinički postupci	31
3.2.1.1. Skala onesposobljenosti EDSS	31
3.2.1.2. Beckov upitnik za depresiju II (BDI-II)	33
3.2.1.3. MoCA (Montrealska ljestvica kognitivne procjene)	36
3.2.1.4. MRI središnjeg živčanog sustava	39

3.3. Serološke metode	41
3.3.1. Biljezi neuropale u serumu	41
3.3.1.1. Serumske koncentracije BDNF-a	41
3.3.1.2. Serumske koncentracije pro-BDNF-a	42
3.3.1.3. Serumske koncentracije IL-6	44
3.3.2. Biljezi oksidacijskog stresa	45
3.3.2.1. Mjerenje lipidne peroksidacije (MDA)	46
3.3.2.2. Mjerenje aktivnosti ukupnog glutationa (GSH)	46
3.3.2.3. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)	47
3.3.2.4. Mjerenje karboniliranih proteina (PC)	48
3.4. Statistička obrada podataka	48
4. REZULTATI	49
4.1. Kognitivni parametri i parametri oštećenja SŽS	49
4.2. Molekularni biljezi neuropale u serumu	54
4.3. Biološki biljezi antioksidacijske obrane u serumu	58
4.4. Korelacije između parametara kognicije, oštećenja SŽS i molekularnih biljega u serumu	62
4.5. Regresijska analiza	76
5. RASPRAVA	77
5.1. Klinička obilježja	77
5.1.1. MoCA u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	77
5.1.2. BDI-II u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	78
5.1.3. EDSS, MoCA i BDI-II u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	79
5.1.4. Broj MR lezija (T1,T2,FLAIR) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	82
5.2. Molekularni biljezi neuropale i antioksidacijske obrane u serumu	83
5.2.1. BDNF u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	83
5.2.2. Interleukin-6 (IL-6) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	85
5.2.3. Glutation (GSH) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	87

5.2.4. Katalaza (CAT) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	89
5.3. Korelacije seroloških biljega sa sociodemografskim i kliničkim parametrima	89
5.3.1. Glutation (GSH) i MoCA u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	89
5.3.2. Malondialdehid (MDA) i EDSS u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	90
5.3.3. BDNF i broj T2/FLAIR MR lezija u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	91
5.3.4. Izoforme BDNF-a, dob i EDSS u u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	91
5.3.5. Karbonilirani proteini i glutacion (GSH) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi	92
6. ZAKLJUČCI	93
7. CITIRANA LITERATURA	95
8. POPIS KRATICA	108
9. PRILOZI	110
10. ŽIVOTOPIS	114
10.1. Popis objavljenih radova	114

1. UVOD

Velika učestalost neuroimunskih poremećaja u našoj populaciji navodi potrebu za prepoznavanjem i istraživanjem potencijalnih biljega s ciljem ranijeg prepoznavanja patologije i liječenja takvih stanja. Biljezi su ključni pokazatelji i fizioloških i patoloških procesa. Specifične promjene molekularnog i staničnog mehanizma fizioloških procesa rezultiraju biokemijskim promjenama na sustavnom nivou, koja nam može dati informacije o prirodi bolesti (Schiro i sur., 2022). Prema razini biljega može se predvidjeti vjerojatnost pojavnosti bolesti, olakšati njihovu ranu dijagnozu, te postaviti smjernice za razvoj novih terapija za liječenje i što je najvažnije ukazati na proces nastajanja bolesti. Ovo istraživanje je usmjereno na upalne (IL-6), neuralne (proBDNF i BDNF) i molekularne biljege oksidacijskog stresa zbog njihovih višestrukih uloga u patogenezi multiple skleroze (MS). Neuroupala igra značajnu ulogu u razvoju MS-a, što dovodi do razaranja mijelinske ovojnice koja vodi prema oštećenju aksona oslobađanjem proupalnih citokina, proteaza, glutamata, i reaktivnih vrsta kisika. U tim uvjetima imunostne stanice stvaraju "zaštitnu autoimunost" proizvodeći neurotrofne čimbenike, te se povezuju s neuronima i glija stanicama kako bi ih zaštitile od oštećenja, potičući rast i oporavak (Nociti i sur., 2023). Razumijevanje odnosa između upale i neurodegeneracije ključno je za razvoj progresije bolesti, kao i učinkovitih terapijskih pristupa. To je zato što se glavno uporište liječenja multiple skleroze (MS) kreće prema sprječavanju neurodegenerativnih pojava, usporavanju progresije bolesti i pružanju neurozaštite. RRMS karakteriziraju kliničke epizode egzacerbacije i remisije, što sugerira prisutnost kompenzacijskih mehanizama nakon oštećenja (Cagol i sur., 2022.). Osim poznatog mehanizma oporavka poput remijelinizacije, važan je i fenomen - plastičnosti neurona. Nekoliko funkcionalnih istraživanja, koristeći tehnike kao što su funkcijska magnetska rezonanca fMRI (engl. *Functional magnetic resonance imaging*), su nam pružili vrijedne podatke o prisutnosti plastičnosti neurona kod MS pacijenata. Sposobnost SŽS-a da nadoknadi oštećenje neurona je vidljivo u relapso remitentnoj multiploj sklerozi (RRMS); no pokazalo se da je plastičnost mozga očuvana i kod pacijenata sa značajnim oštećenjem mozga (Ksiazek-Winiarek i sur., 2015.). Navedeni rezultati navode na istraživanje i pronalazak potencijalnog biljega koji bi mogao korelirati patološko stanje sa serumskim razinama molekularnih biljega upale (IL-6), neuralnih (proBDNF i BDNF) i biljega oksidacijskog stresa, moguće odgovornih za štetne promjene sinaptičkog prijenosa, plastičnosti, preživljavanje neurona i održavanje kognitivnih sposobnosti, što je također istraženo. Sukladno tome, istraživanje utjecaja navedenih parametara s patologijom multiple skleroze u smislu neurološke onesposobljenosti, depresivnih i kognitivnih promjena ispitanika,

te potencijalne poveznice s brojem demijelinizacijskih lezija verificiranih magnetnom rezonacijom, kao za sada najvažnijom parakliničkom metodom u otkrivanju tipičnih demijelinizacijskih lezija mozga i kralježnične moždine kod RRMS, bi moglo dati odgovor u smislu prepoznavanja potencijalnih biljega kod ispitanika s RRMS.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je utvrditi dinamiku i korelacije serumskih razina neurotrofina BDNF-a (proBDNF i mBDNF), IL-6 i biljega oksidacijskog stresa (MDA, GSH, i katalaze) u pojedinim fazama relapsno remitirajuće multiple skleroze, te ih dodatno korelirati sa brojem demijelinizacijskih T2/FLAIR lezija. Nadalje, cilj je utvrditi da li te promjene korelacijskih omjera navedenih fizioloških parametara koreliraju sa stupnjem onesposobljenosti, kognitivnim deficitom i depresijom u pojedinim fazama i progresiji bolesti.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Multipla skleroza (MS) je kronična, upalna, autoimuna demijelinizacijska bolest središnjeg živčanog sustava. Češća je u žena, omjer ženskih naspram muških bolesnika u Hrvatskoj je 2,5 prema 1. Pojavljuje se uglavnom u mlađoj životnoj dobi od 18.-50. godine života. Uzrok multiple skleroze još nije poznat, ali je poznato da je za razvoj ove kompleksne, multifaktorijalne i heterogene bolesti potrebno djelovanje različitih okolišnih čimbenika u osobe koja ima određenu genetičku i imunosnu predispoziciju.

2.2. Epidemiologija multiple skleroze. Prema dosadašnjim podacima cjelogenomskog istraživanja, asocijacija u multiploj sklerozi (engl. *genome-wide association study* - GWAS) geni mogu objasniti samo 25% rizika za razvoj multiple skleroze (Hafler i sur., 2007.). Rezultati genetskih istraživanja su potvrdili da je specifični haplotip HLA-DR2 (HLA-DRB1*1501-DQB*0602), MCH molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MCH) na kromosomu 6p21 snažno povezan s povećanim rizikom za MS, ali on može objasniti samo oko 30% genetske komponente MS-a (Habek, 2010.). Novija istraživanja su pokazala i da varijacije u DR1 kompleksu utječu na sklonost MS-u i to na vrlo složen način te da je HLA-DRB1*15 zapravo samo dio haplotipa koji povećava sklonost MS-a. Kasnije je otkriven veliki broj gena koji nose povećan rizik za razvoj MS-a, ali svaki od njih samostalno nosi vrlo mali rizik (povećanje od 1,1 do 1,5 puta). Način na koji geni uječu na rizik za pojavu MS-a je složen, postoji složena interakcija koja može povećati ili smanjiti rizik za razvoj multiple skleroze ovisno o kombinaciji alela, tzv. epistaza. Neki aleli povećavaju, a neki smanjuju rizik za nastanak MS-a u kombinaciji s HLA-DRB1*1501 alelom (Dymet i sur., 2005.). Jedno od najvećih i najvažnijih istraživanja cijeloga genoma provelo je međunarodno udruženje za istraživanje genetike u multiploj sklerozi (engl. *International Multiple Sclerosis Consortium*, IMSC). Pokazalo je da je više od 200 gena izvan HLA-regije odgovorno za povećani rizik za MS, uključujući gene za citokine, citokinke receptore, kostimulatorne molekule i prijenosnike signala. Ni jedan od njih nije pokazao konzistentnost u ponovljenim istraživanjima (Oksenberg i sur., 2008.). Unatoč intenzivnim istraživanjima, jedinstveni gen odgovoran za nastanak MS-a nije pronađen, tako da se vjerojatno radi o poligenomskom nasljeđivanju.

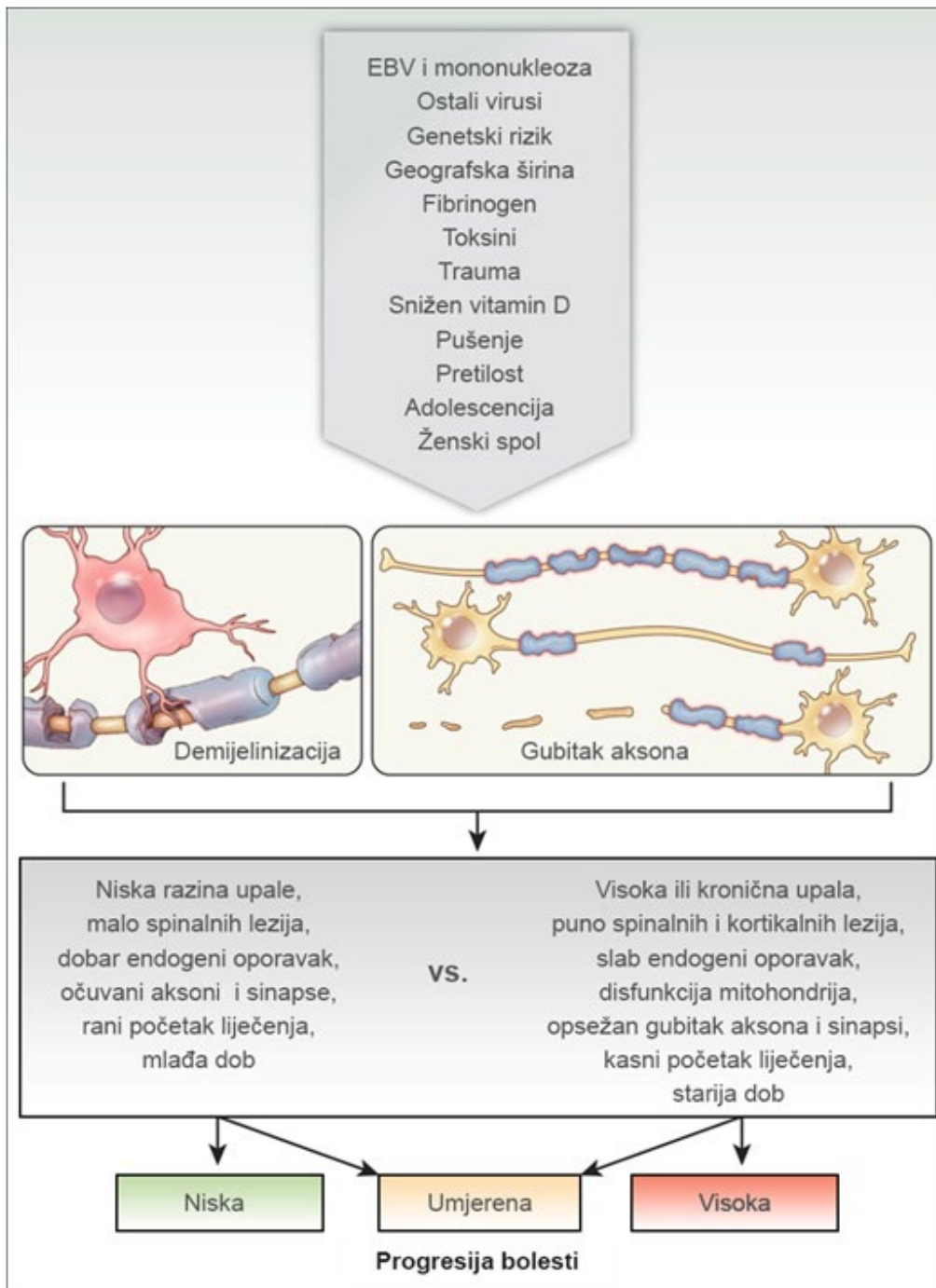
Za razliku od genetskih čimbenika, postoje vrlo uvjerljivi dokazi o okolišnim čimbenicima koji povećavaju rizik za nastanak bolesti. Istraživanja su pokazala da primjerice, Epstein-Barr virus (EBV) igra vrlo važnu ulogu kao jedan od okolišnih rizičnih čimbenika, pogotovo ako je prvi susret s virusom (primoinfekcija) nastupio u ranoj adolescenciji i ako je bio klinički manifestan

(razvijena klinička slika infektivne mononukleoze), te ako je osoba pozitivna na EBV-ov jezgrin antigen (EBNA)-1 IgG ili ima visok titar EBNA-1. Istraživanja pokazuju da je veći postotak bolesnika s multiplom sklerozom seropozitivan na EBV (Ascherio i sur., 2010.). Međutim sam EBV ne može objasniti neke aspekte epidemiologije MS-a, uključujući smanjenje rizika u osoba koje su migrirale iz područja s visokim u područja s niskim rizikom za obolijevanje od multiple skleroze (Habek i sur., 2010.). S druge strane postoje snažni dokazi o ulozi vitamina D u MS-u, a upravo vitamin D može razjasniti prije navedene nepodudarnosti. Epidemiološka istraživanja su pokazala da je pojavnost MS-a puno viša u sjevernim zemljama (sjeverno-južni gradijent), pa se nameće zaključak da vitamin D ima važnu ulogu kao posljedica smanjene insonacije. Opservacijska istraživanja su pokazala da bolesnici s MS-om imaju nižu koncentraciju vitamina D od kontrolne zdrave skupine, te da su povišene koncentracije vitamina D ili uzimanje vitamina D povezani s nižim rizikom od razvoja multiple skleroze (Munger i sur. 2004.).

Pušenje cigareta je još jedan okolišni čimbenik koji je u nekim istraživanjima povezan s rizikom za MS (Riise i sur., 2003.). Mnogobrojni su mehanizmi kojima se objašnjava utjecaj pušenja na nastanak MS-a. Oni uključuju modulaciju imunskog odgovora, oštećenja aksona dušikovim oksidima iz duhana, demijelinizaciju uzrokovanu kroničnom intoksikacijom cijanidima, kao i češće respiratorne infekcije (Hernan i sur., 2001.).

U novijim epidemiološkim istraživanjima je dokazano da povećana tjelesna masa u adolescenciji i mlađoj odrasloj dobi povećava rizik za MS (Mokry i sur., 2016.). Moguća je i uloga crijevne mikroflore pri nastanku multiple skleroze. Dokazano je da se crijevna mikroflora bolesnika s MS-om i zdrave populacije razlikuje (Chen i sur., 2016.). Smatra se da neravnoteža crijevnih mikroorganizama može potaknuti ili pojačati autoimunosnu reakciju u multiploj sklerozi za sada nepoznatim mehanizmom. U dosadašnjim istraživanjima dokazano je da mikroflora bolesnika s multiplom sklerozom povećava broj pomoćničkih limfocita T i smanjuje broj regulatornih T stanica, kao i da neki mikroorganizmi iz crijeva imaju epitope slične mijelinu (molekularna mimikrija).

Malo je vjerojatno da će se multipla skleroza u konačnici pripisati jednom uzroku. Umjesto toga, genetski i okolišni čimbenici ili kombinacija čimbenika koji rezultiraju predispozicijom za multiplu sklerozu, pokreću bolest i mijenjaju njezin tijek vrlo su različiti od osobe do osobe (Reich i sur., 2018.). Čimbenici rizika za razvoj multiple skleroze su prikazani u Slici 1.



Slika 1. Multipla skleroza, čimbenici rizika, okidači, modifikatori i tijek bolesti. Gornji dio slike prikazuje usmjeravanje predloženih čimbenika, za koje postoje različite razine dokaza, u razvoj upalnih, demijelinizirajućih lezija s heterogenim gubitkom aksona (srednji dio). Donji dio slike navodi značajke lezija i njihove posljedice koje su općenito korisne ili štetne i koje mijenjaju rizik od progresije (preuzeto i prilagođeno prema Reich i sur., 2018.).

Kratice: EBV - Epstein-Barr virus.

2.3. Relapsno remitentna multipla skleroza (RRMS)

Multipla skleroza može rezultirati nizom neuroloških simptoma budući da može utjecati na različite regije mozga, leđne moždine i optičkog živca (Stadelmann i sur., 2004.). Pojam "klinički izolirani sindrom" (engl. *clinically isolated syndrome*, CIS) odnosi se na prvu epizodu neuroloških simptoma koji su u skladu s demijelinizirajućom etiologijom i upućuju na MS. Na početku, gotovo 85% bolesnika ima relapsno-remitentnu multiplu sklerozu (RRMS), koju karakteriziraju epizode akutnih egzacerbacija nakon kojih slijedi remisija (Stadelmann i sur., 2004.). Relaps, napadaj ili egzacerbacija multiple skleroze je definiran kao akutni novi simptom ili pogoršanje postojećih simptoma vezano uz oštećenja bijele tvari mozga koji dovodi do relativno brzog razvoja maksimalnog neurološkog oštećenja (unutar 2-3 tjedna), te traje više od 24 sata u odsutnosti povišene tjelesne temperature i encefalopatije. Prema revidiranim McDonaldovim kriterijima iz 2017. godine, dijagnoza MS-a je temeljena na kliničkim i parakliničkim kriterijima (MR, likvorska dijagnostika, evocirani potencijali) koji se temelje na dva osnovna postulata, diseminaciji u prostoru i diseminaciji u vremenu koji se mogu zadovoljiti klinički i/ili nalazom magnetne rezonancije. Kriterij diseminacije u prostoru je ispunjen kada imamo klinički ili MR-om znakove oštećenja u najmanje dva sustava, a diseminacija u vremenu je zadovoljena ako bolesnik ima ili klinički ili neuroradiološki dokaz da su dva oštećenja nastala u različito vrijeme.

2.4. Patofiziologija multiple skleroze

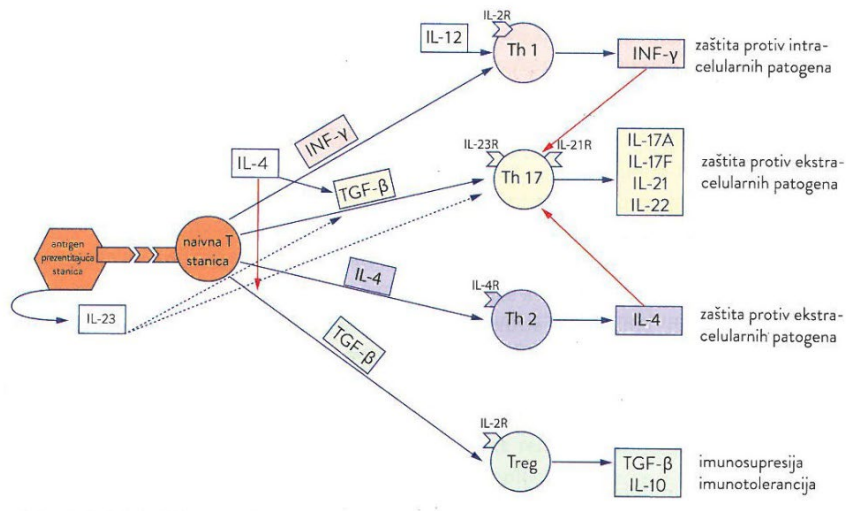
Patološki mehanizam dovodi do demijelinizacije i oštećenja mijelinske ovojnice koju stvaraju oligodendrociti. Mijelinska ovojnica izolira aksone, te na taj način omogućuje saltatornu kondukciju s jednog na drugi Ranvierov čvorić, te se tako omogućuje brzo provođenje živčanog signala. Na mjestima oštećenja ovojnice dolazi do hiperpolarizacije što dovodi do poremećaja u provođenju impulsa. Zbog gomilanja akcijskih potencijala na mjestu oštećene ovojnice može doći do efaptičkog provođenja, tj. preskakanja električnog impulsa na druga živčana vlakna (Brinar i sur., 2009.). Demijelinizirano vlakno ne provodi živčane impulse, osobito brze frekvencije, te nastaju neurološki ispadi. Spoznaja o patogenezi multiple skleroze se temelji na sličnosti MS-a i životinjskog modela bolesti – eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE). EAE nastaje kada se eksperimentalne životinje imuniziraju mijelinskim proteinima, te je ponajprije posredovan CD4+ limfocitima T. Sličan proces je i u oboljelih od MS-a, kad aktivirane CD4+ stanice uz pomoć adhezijskih molekula prođu krvno-moždanu barijeru, koja

je nepropusna u zdravih osoba, te izazvaju daljnje uništenje mijelinske ovojnice. Nepoznato je što dovodi do aktivacije tih stanica na periferiji (Brinar i sur., 2019.).

Oštećena funkcija regulatornih stanica T i otpornost autoreaktivnih stanica T na supresiju dva su mehanizma kroz koje periferna tolerancija može zakazati. Komplikirana interakcija između genetskih i okolišnih čimbenika rizika može utjecati na aktivnost i aktivaciju ovih autoreaktivnih stanica, pridonoseći razvoju bolesti. Smatra se da kada se ispune genetički, okolišni i do sada nepoznati preduvjeti za nastanak MS-a, CD4⁺ limfociti T pokreću imunopatogenetsku kaskadu (Slika 2), koja dovodi do kronične upale (Dobson i sur., 2019.).

2.5. Upalna faza multiple skleroze

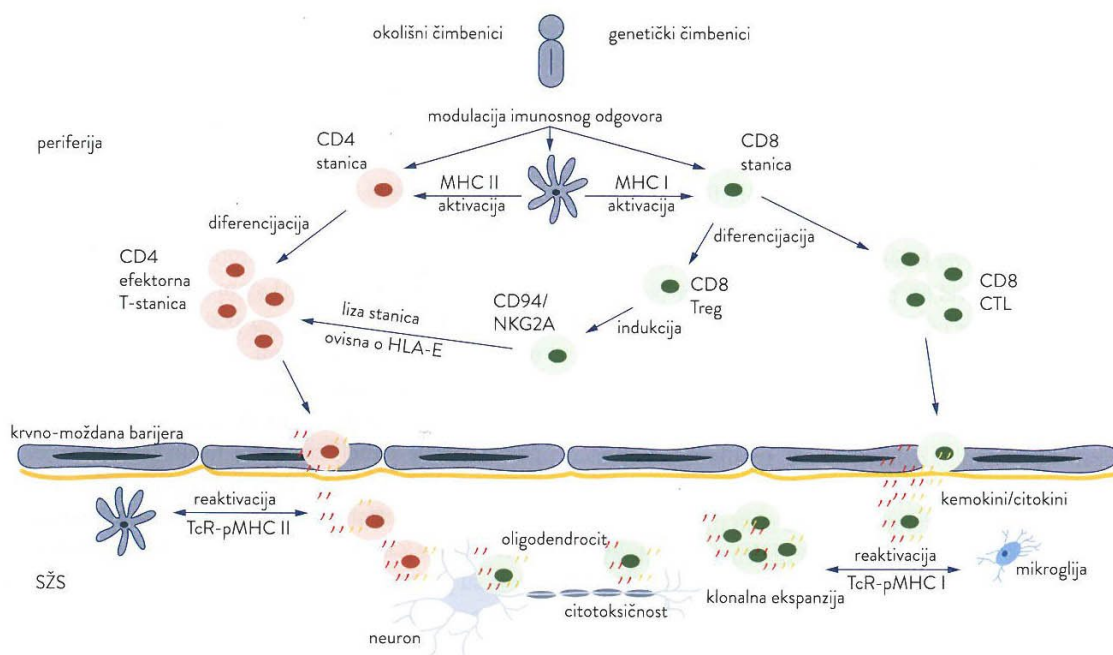
Prva upalna, relapsna faza multiple skleroze je reverzibilna. U patogenezi demijelinizacijskog oštećenja glavnu ulogu imaju autoreaktivni limfociti T, koji se aktiviraju na periferiji. Zašto uopće dolazi do aktivacije autoreaktivnih limfocita T do danas nije razjašnjeno. Smatra se da predočavanjem antigena nekog uzročnika (virusa ili bakterije) autoreaktivnoj stanici T čiji receptori prepoznaju virusne, ali i antigene mijelinskih proteina nastaje ukrižena reaktivnost tj. molekularna mimikrija. CD4⁺ limfociti T nakon antigene stimulacije se diferenciraju u pomoćne limfocite Th1, Th2 i Th17, a definirani su citokinima koje izlučuju (Slika 2.). Stanice Th1 imaju proupalnu funkciju, luče interferon, TNF- α , interleukin IL-2 i IL-12. Limfociti Th2 izlučuju Th2 protuupalne citokine (IL-4, IL-5, IL-13, TGF- β), te mogu aktivirati limfocite B na produkciju imunoglobulina, ali mogu imati i protuupalnu ulogu. Limfociti Th17 proizvode proupalne citokine (IL-17, IL-6 i TNF- α) (Brinar i sur., 2009.).



Slika 2. Prikaz aktivacije i daljnje diferencijacije CD4⁺ stanica. Plave strelice pokazuju pozitivan, a crvene negativan utjecaj (preuzeto iz Brinar i sur, Neurologija za medicinare, 2. izd., 2019.).

Kratice: IL – 23 – interleukin 23; IL-4 – ineterleukin 4; INF- γ – interferon γ ; TGF- β – transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor β* , TGF- β); IL-4 – interleukin 4; IL-12 – interleukin 12; IL-2R – interleukin 2 receptor; IL-23R – interleukin 23 receptor; IL-4R – interleukin 4 receptor; IL-2R – interleukin 2 receptor; Th 17 – limfociti Th 17; Th 2 – limfociti Th 2; Treg – regulacijski limfociti T; IL-17-A – interleukin 17A; IL-17F – interleukin 17F; IL 21 – interleukin 21; IL-22 – interleukin 22; IL-4 – interleukin 4; IL-10 – interleukin 10

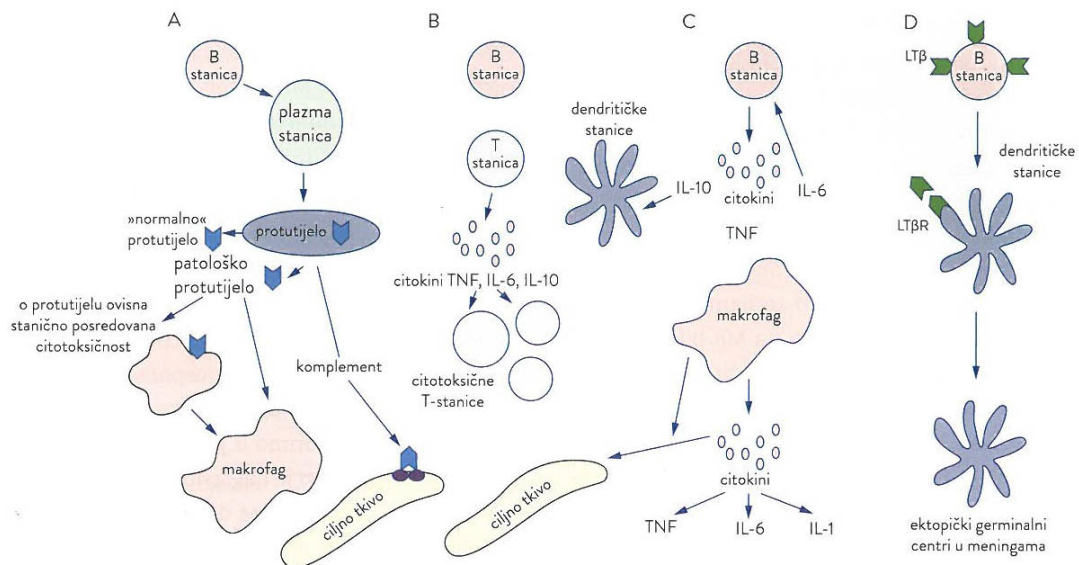
Omjer između stanica Th17 i Th1 određuje hoće li doći do inicijacije upale i nastanka demijelinizacijskog plaka. Naime, upala nastaje kad omjer između Th17 i Th1 bude veći od 1, jer tada je prisutan disproporcionalni porast sekrecije IL-17, koji se danas smatra glavnim medijatorom autoimunih procesa u SŽS-u. U kralježničnoj moždini je obratno, upala nastaje kada je omjer Th17 i Th1 manji od 1, što upućuje na zaključak da su glavni medijatori upale u kralježničnoj moždini Th1 stanice. Važnu ulogu u upalnom procesu imaju i CD8⁺ citotoksični limfociti T, koji pospješuju propusnost krvno-moždane barijere, jednog od ključnih koraka u imunopatogenezi MS-a, te sudjeluju u oštećenju neuroglijalnih stanica, ogoljavanju aksona i aktiviraju smrt oligodendrocita (Slika 3). Imaju regulatornu ulogu u progresiji bolesti. Suprimiraju proliferaciju CD4⁺ limfocita T i uzrokuju njihovu inaktivaciju (Zadro, 2020.).



Slika 3. Slika prikazuje ulogu CD8+ T-stanica na imunopatogenezu multiple skleroze, CD8+ T-stanice dijele se u regulatorne i efektorne podtipove koji mogu proći krvno-moždanu barijeru. Ulaskom stanica u SŽS može doći do izravnog oštećenja neurona, a lučenjem kemokina i citokina, efektorne CD8+ T-stanice pridonose upali i održavaju upalnu reakciju. S druge strane, regulatorne CD8+ T-stanice mogu izravno uništiti patogene CD4+ T-stanice te na taj način smanjiti upalu i potaknuti remisiju (preuzeto iz Brinar i sur, Neurologija za medicinare, 2. izd., 2019.).

Kratice: CTL – citotoksični CD8+ limfociti T

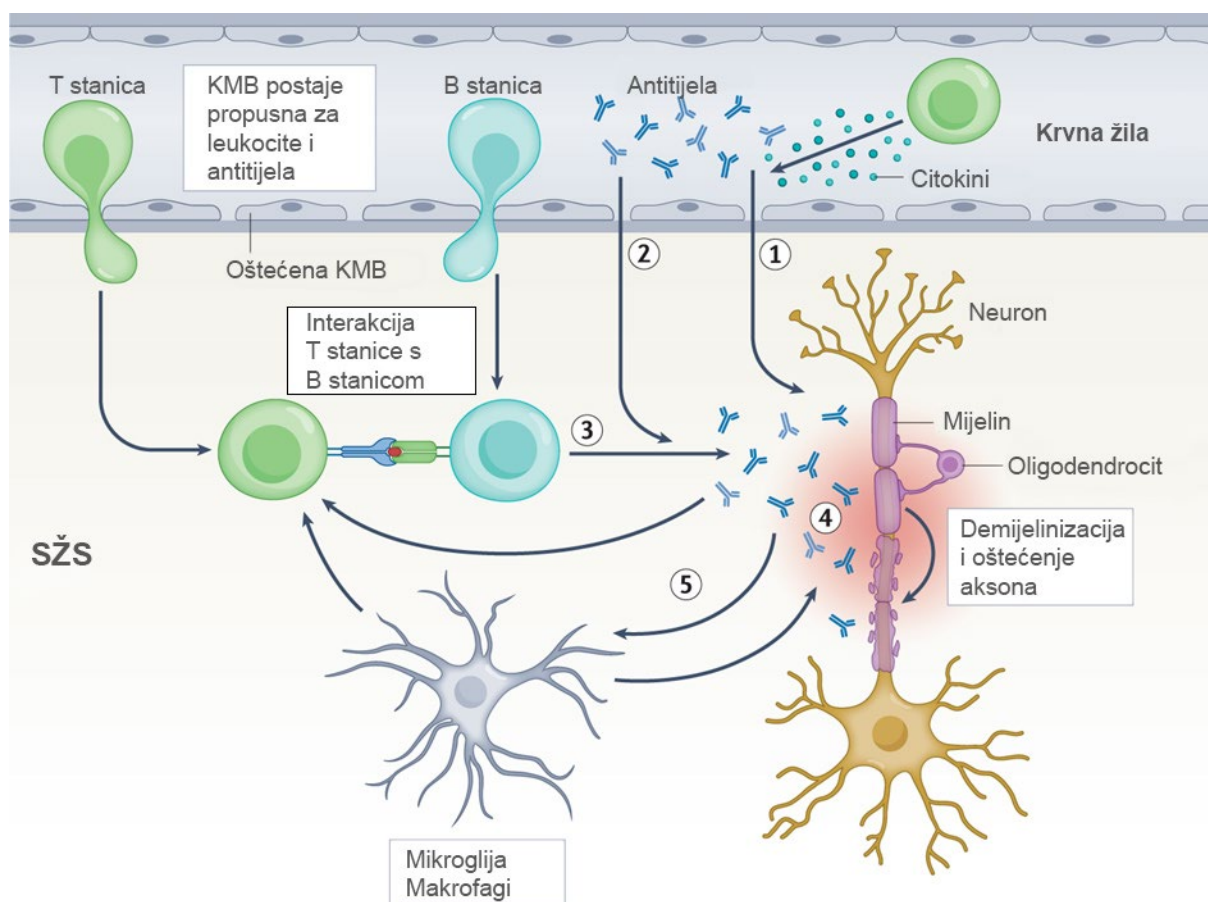
Za aktivaciju limfocita-T nužna je interakcija s limfocitima-B koji imaju ulogu antigenpredočnih stanica koje proizvode kostimulacijske signale/molekule nužne za aktivaciju limfocita-T. Interakcija limfocita-T i B je izravna i dvosmjerna. Limfociti-B pružaju limfocitima-T kostimulacijski signal predočavanjem antigena, a limfociti-T utječu na B-stanice putem citokina i površinskih liganda. Ta interakcija stvara potencijal za nastanak pozitivne povratne sprege. Postavlja se pitanje koja od tih stanica čini ključnu pogrešku koja je okidač za nastanak autoimunog procesa. Osim predočavanja antigena i stvaranja kostimulacijskih signala aktivnim T-stanicama, B-stanice luče upalne citokine u većem omjenu nego protuuplane, stvaraju antitijela koja uzrokuju oštećenje tkiva (Slika 4), aktiviraju makrofage i urođene stanice ubojice (engl. *natural killers*, NK), te stvaraju ektopične limfoidne strukture slične folikulima u intrameningealnim prostorima (Bašić Kes i sur., 2021.).



Slika 4. Mogući mehanizmi djelovanja B-stanice u imunopatogenezi multiple skleroze. A) stvaraju protutijela koja uzrokuju oštećenje tkiva; B) djeluju kao antigen predočne stanice; C) stvaraju protuupalne citokine; D) stvaraju i održavaju ektopičke germinalne centre u intermeningealnim prostorima (preuzeto iz Brinar i sur, Neurologija za medicinare, 2. izd., 2019.).

Kratice: IL-interleukin; LTBR - limfotoksin-B-receptor; LTB – limfotoksin-B; TNF – čimbenik tumorske nekroze

Aktivirani CD4+ limfociti koji su prošli krvno-moždanu barijeru i ušli u središnji živačani sustav, reaktiviraju se ako im makrofagi ili mikroglia predoče autoantigene – proteine mijelinske ovojnice, te se luče upalni citokini koji aktiviraju makrofage i mogu uzrokovati oštećenje mijelinske ovojnice (Brinar i sur., 2009.). Potencijalni mehanizmi patogenosti protutijela u multiploj sklerozi su prikazani na Slici 5.



Slika 5. Patogena autoantitijela u multiploj sklerozi (preuzeto i prilagođeno prema Hoftberger i sur., 2022.).

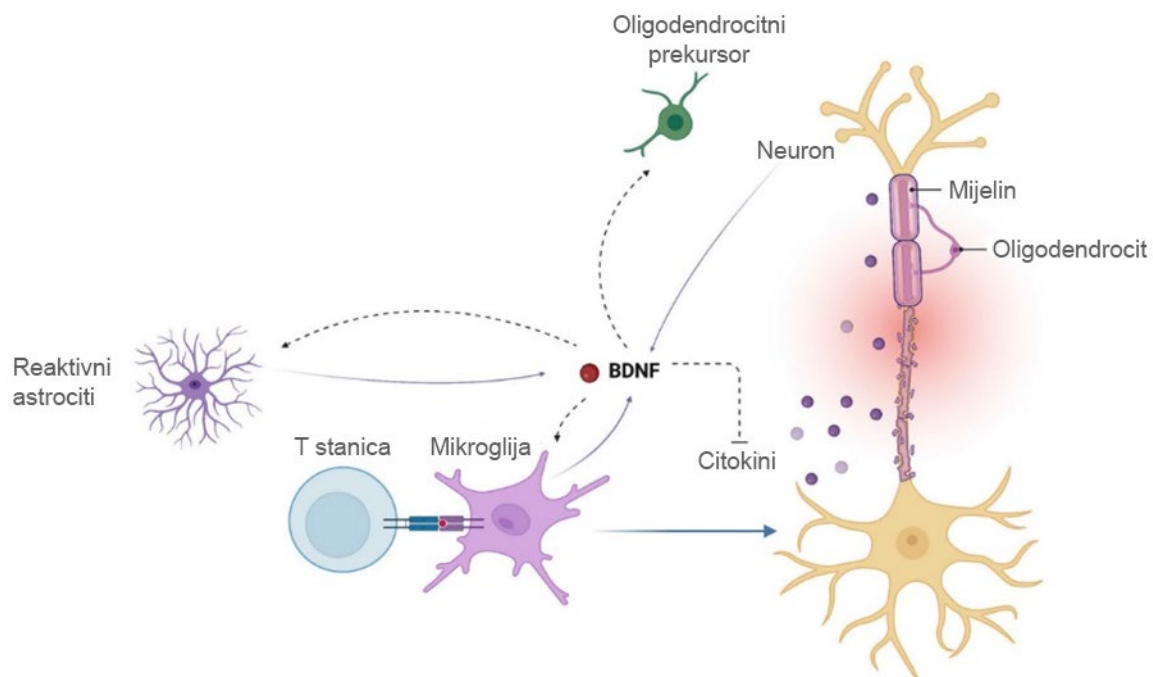
Kratice: KMB-krvno moždana barijera; SŽS-središnji živčani sustav

2.6. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)

Značajan broj dokaza pokazao je da upala nije posve štetna. Prethodna istraživanja su dokumentirala reparativne aktivnosti upalnog odgovora kod neuroloških poremećaja, uključujući MS (Graber i sur., 2009.). U tim uvjetima, imunosne stanice proizvode neurotrofne čimbenike i povezuju se s neuronima i glija stanicama kako bi ih zaštitile od oštećenja, te potaknule rast i popravak. Ovaj fenomen se naziva "zaštitna autoimunost" (Hohlfeld i sur., 2000.). Jedan od mogućih mehanizama za ovaj neuroprotektivni učinak je oslobađanje neurotrofina od strane imunosnih stanica kako u periferiji tako i u SŽS-u (Kalinowska-Lyszczarz i sur., 2020.).

Moždani neurotrofni čimbenik (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) je poseban neurotrofin u ovom kontekstu, budući da može modulirati neuroupalu i pružiti neurozaštitu u MS (Nociti i sur., 2020.). U multiploj sklerozi BDNF omogućuje neurozaštitu, ali također može

promovirati bolest putem održavanja autoreaktivnih stanica T. BDNF pripada klasi proteina izraženih u živčanom sustavu sisavaca koji se zovu neurotrofini, a utječu na razvoj i preživljavanje neurona. Neurotrofini kontroliraju nekoliko aspekata razvoja i funkcije neurona i oligodendrocita, uključujući diferencijaciju, proliferaciju, preživljavanje, apoptozu, rast aksona i sinaptičku plastičnost (Huang i sur., 2001.). *In vivo* dokazi također podupiru kritičnu ulogu BDNF-a u plastičnosti. Istraživanja mutacija su pokazala ulogu ovog neurotrofina u strukturalnoj i sinaptičkoj plastičnosti i dendritičkoj arborizaciji, te moduliranju i uspostavljanju neuronskih krugova za regulaciju složenog ponašanja. Dokazano je da povećava stanice oligodendrocitne loze i mijelinskih proteina u modelima glodavaca, te sudjeluje u regeneraciji ozlijeđenih ili degeneriranih neurona i tako stimulira aksonski rast (McTigue i sur., 1998.).



Slika 6. Uloga BDNF-a u endogenoj komunikaciji između astrocita i mikroglije u modulaciji neuroupalnih mehanizama, te regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica prekursora oligodendrocita (OPC) u zrele oligodendrocite (preuzeto i prilagođeno prema Nociti i sur., 2023.).

Kratica: BDNF moždani neurotrofni čimbenik (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF)

Potpuni nedostatak BDNF-a je smrtonosan i većina miševa bez BDNF-a umire tijekom drugog postnatalnog tjedna (Ernfors i sur., 1994.). Pokazalo se da BDNF povećava aktivnost kaskade protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) potičući preživljavanje u kulturama živčanih stanica (Hetmani sur., 2002.). Utvrđeno da BDNF može pojačati diferencijaciju oligodendrocita nakon demijelinizirajuće lezije. BDNF ima važnu ulogu u regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica prekursora oligodendrocita (OPC) u zrele oligodendrocite (Slika 6). Kod

ljudi je također prisutan u krvnim stanicama gdje se nakuplja nakon svoje biosinteze u megakariocitima. Razine BDNF-a se stoga mogu lako detektirati u ljudskom serumu i mogle bi na neki način služiti kao pokazatelj moždane aktivnosti. Normalna razina BDNF-a u serumu je $32,69 \pm 8,33$ ng/mL (SD) (Naegelin i sur., 2018.). Razine BDNF-a su promijenjene u raznim neurološkim bolestima. Prema nekim istraživanjima osobe s multiplom sklerozom imaju niže razine BDNF-a u serumu u usporedbi sa zdravim osobama (Castellano i sur., 2008., Frota i sur., 2009., Wens i sur., 2016., Naegelin i sur., 2020.). Većina ovih istraživanja bila je usredotočena na bolesnike s RRMS-om (Azoulay i sur., 2005., Wens i sur., 2016.), ali u bolesnika s SPMS-om smanjenje BDNF-a bilo je još izraženije (Naegelin i sur., 2020.). Neka su istraživanja također otkrila povećanje cirkulirajućih razina BDNF-a tijekom relapsa MS (Frota i sur, 2009., Oraby i sur., 2021.).

Ovi su nalazi u skladu s hipotezom da su više razine BDNF-a povezane s aktivnom upalom. Povećanje BDNF-a tijekom relapsa moglo bi poduprijeti hipotezu o neurozaštitnom učinku BDNF-a koji proizvode upalne stanice za promicanje preživljavanja i remijelinizacije kroz proizvodnju neurotrofina. Naprotiv, druga istraživanja nisu pokazala značajnu razliku u razinama BDNF-a kod pacijenata s multiplom sklerozom i zdravih kontrolnih ispitanika (Damasceno, 2014). Pacijenti s RRMS-om s aktivnim lezijama imali su povećane razine BDNF-a u usporedbi s onima bez (Sarchielli i sur., 2007., Sarchielli i sur., 2002.).

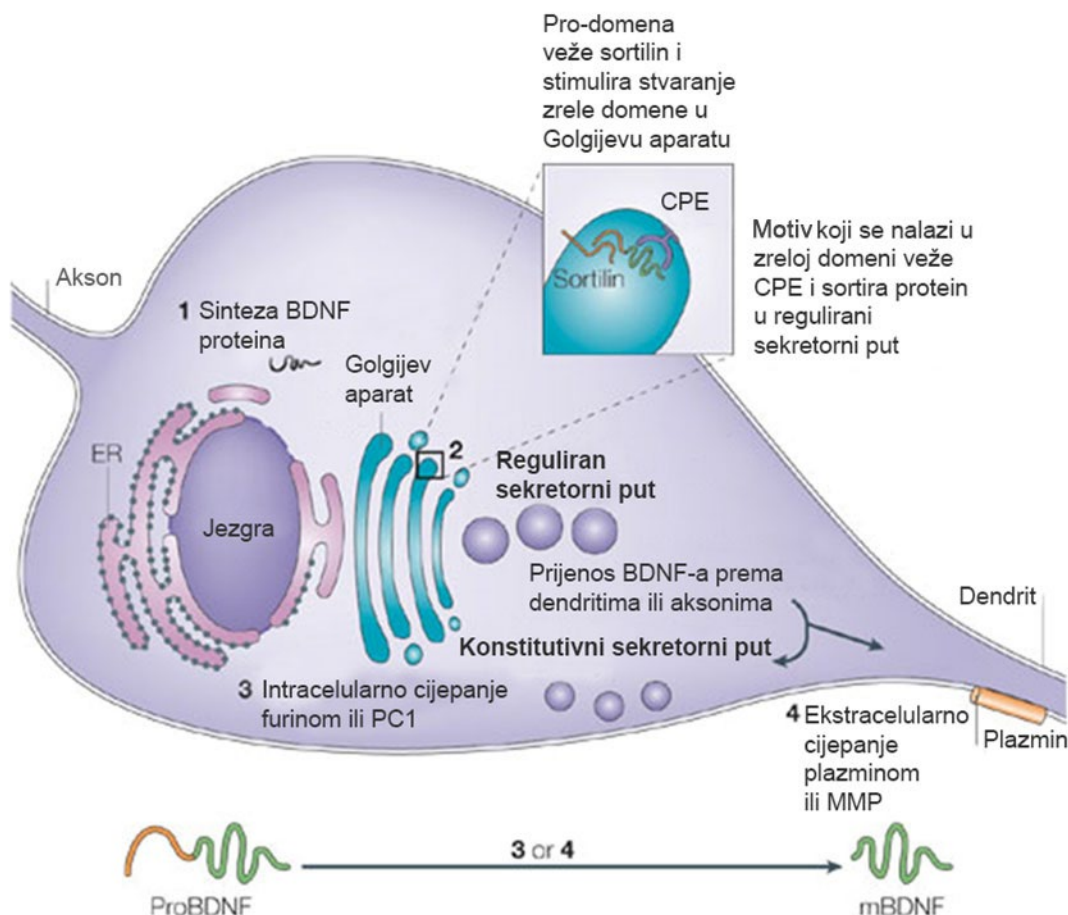
Nedavna MRI istraživanja također su potvrdile vezu između stvaranja BDNF-a i upalnog odgovora. Osim toga, pojavila se značajna pozitivna korelacija između broja lezija koje pojačavaju gadolinij i razine BDNF (Weinstock-Guttman i sur., 2007.) Ipak, nedavno istraživanje otkrilo je povišene razine pro-BDNF-a u imunskim stanicama, što ukazuje na moguću ulogu izoforme pro-neurotrofina u patogenezi MS. U SŽS-u se BDNF luči iz SŽS rezidentnih i imunskih stanica. U normalnom SŽS-u, BDNF se prvenstveno luči iz neurona (Lewin i sur., 1996.). Međutim, nakon demijelinizacije kao što je u MS-u aktivirani astrociti i mikroglija ekspresiraju povišene razine endogenog BDNF-a (Stadelmann i sur., 2004., Burbach i sur., 2004., Linker i sur., 2010.). Osim toga, BDNF mogu proizvesti podtipovi imunskih stanica, kao što su autoreaktivne T-stanice, B-stanice i monociti. Štoviše, TrkB, receptor za BDNF je otkriven u neuronima u blizini MS plakova i u reaktivnim astrocitima unutar lezija. BDNF imunopozitivne stanice također su bile u korelaciji s opsegom demijelinizirajućih lezija, koje su bile brojnije u područjima s aktivnom demijelinizacijom od neaktivnih područja (Kerschensteiner i sur., 1999., Stadelmann i sur., 2004.). Cirkulirajući BDNF potječe iz perifernih i cerebralnih izvora jer je krvno-moždana barijera propusna u oba smjera. Istraživanja

na životinjama i ljudima ukazala su na korelaciju između cirkulirajućih i moždanih razina BDNF (Klein i sur., 2011.). BDNF regulira upalnu homeostazu, smanjujući upalnu aktivnost kroz signalne putove hedgehog i eritropoetina. BDNF signalni put također regulira endogenu poveznicu između astrocita i mikroglije u modulaciji neuroupalnih mehanizama (Lai i sur., 2018.).

BDNF u SŽS-u igra ključnu neurozaštitnu ulogu u autoimunoj demijelinizaciji. Miševi deficijentni BDNF-om su izloženi progresivnim invaliditetu i pojačanim gubitkom aksona (Linker i sur., 2010.).

2.7. Izoforme BDNF-a

BDNF se u početku sintetizira kao prekursor protein (preproBDNF) u endoplazmatskom retikulumu. Nakon cijepanja signalni peptid, proBDNF se transportira do Golgijevog aparata za razvrstavanje (Slika 7.). Nedavna istraživanja sekrecije nezrelog proBDNF-a i njegove pretvorbe u zreli (engl. *mature*) mBDNF *in vitro* plazminom i matriks metaloproteazama sugeriraju da proBDNF može biti biološki aktivan, iako je učinkovitost unutarstaničnog cijepanja kontroverzna i može varirati kod neuronskih tipova stanica (Michael i sur., 2009.).

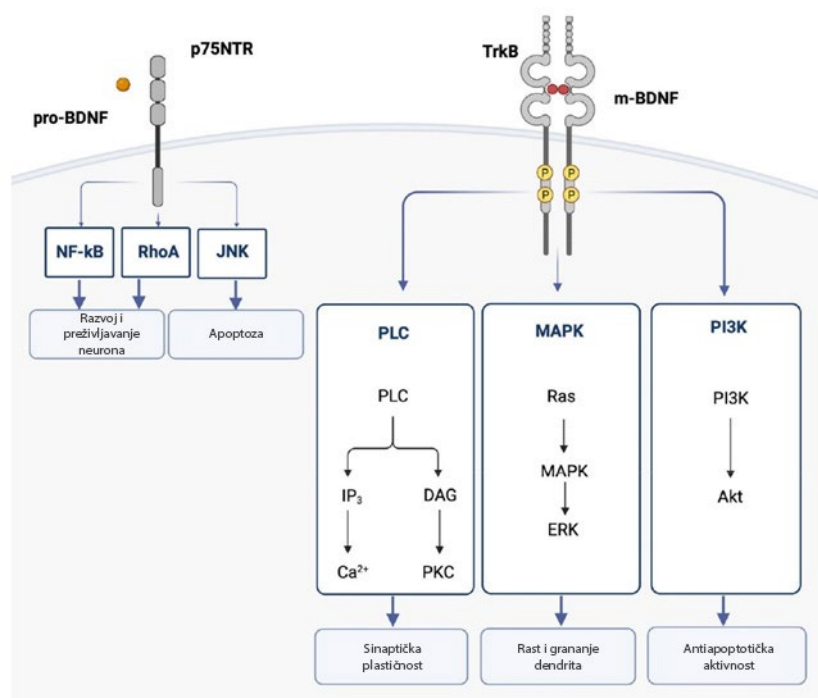


Slika 7. Sinteza proBDNF-a i mBDNF-a (preuzeto i prilagođeno prema Lu i sur., 2005.).

Kratice: BDNF – moždani neurotrofni čimbenik (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF); proBDNF – nezrela BDNF izoforma (engl. *pro brain derived neurotrophic factor*, proBDNF); mBDNF – zrela BDNF izoforma (engl. *mature brain derived neurotrophic factor*, m-BDNF); ER – endoplazmatski retikulum; MMP matične metaloproteinaze; CPE citopatski učinak (engl. *cytopathic effect*, CPE); PC1 – prohormonska konvertaza 1 (engl. *prohormone convertase 1*, PC1)

ProBDNF i mBDNF izazivaju suprotne sinaptičke učinke preko aktivacije dva različita receptora; p75NTR i TrkB receptorske tirozin kinaze. U CNS-u, TrkB je primarno prisutan u regijama mozga s visokim stupnjem plastičnosti, kao što su korteks i hipokampus (Barbacid i sur. 1994). p75NTR se široko eksprimira u CNS-u tijekom razvoja, dok se u mozgu odrasle osobe p75NTR progresivno smanjuje, a njegova ekspresija postoji u ograničenim regijama, uključujući kolinergičko bazalno područje prednjeg mozga (Boskovic i sur. 2014). Zanimljivo je da pro-BDNF i m-BDNF imaju suprotne učinke na staničnu funkciju. Pro-BDNF se s niskim afinitetom veže za p75 neurotrofinski receptor (p75NTR), koji je dio obitelji TNF receptora i inducira apoptozu. S druge strane, m-BDNF se veže s visokim afinitetom prema svom receptoru, TrkB (tirozin kinaza B), te potiče preživljavanje stanica i trofičke učinke (Yoshii i

sur., 2010.). Vežanjem zrele BDNF izoforme (m-BDNF) na receptor tirozin kinaze B (TrkB) dovodi do dimerizacije i fosforilacije u unutarstaničnim Trk domenama, čime se pokreću citoplazmatski signalni putevi čija aktivacija dovodi do rasta i grananja dendrita, kao i do regulacije apoptoze i sinaptičke plastičnosti. Vežanje izoforme pro-neurotrofina BDNF-a (pro-BDNF) na p75 neurotrofinski receptor (p75NTR) dovodi do aktivacije signalnog puta koji potiče apoptozu (JNK), kao i signalnih puteva (NF- κ B i RhoA) koji uzrokuju rast neurona i neuronski opstanak (Slika 8).



Slika 8. Vežanje m-BDNF-a na receptor tirozin kinaze (TrkB) i vežanje proBDNF-a na p57 neurotrofinski receptor (P75NTR) (preuzeto i prilagođeno prema Yoshii i sur., 2010.).

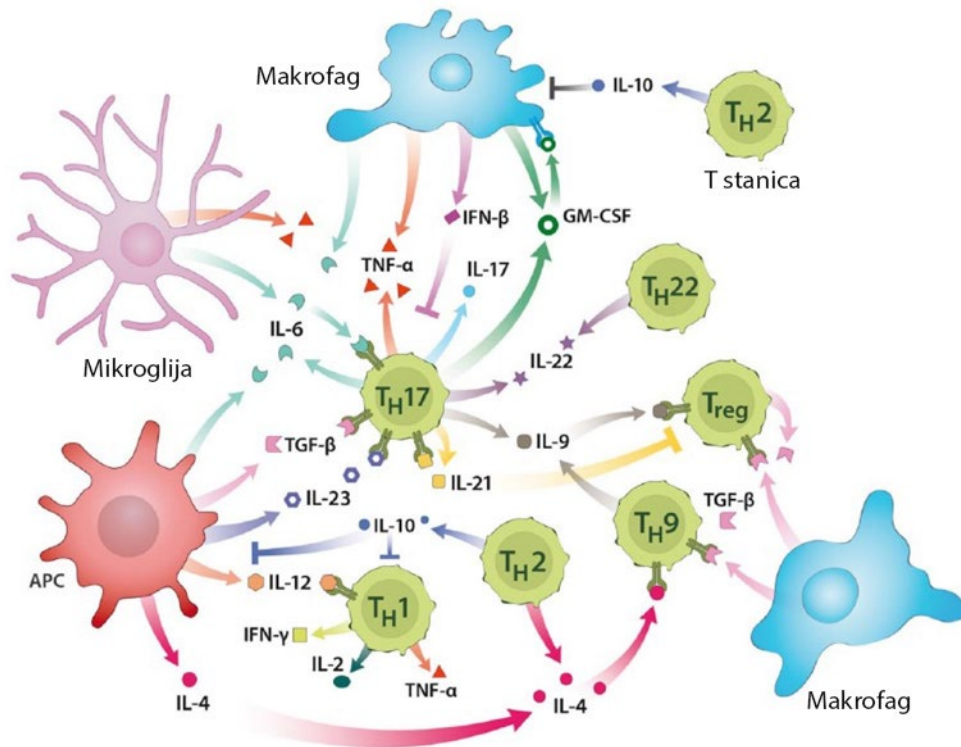
Kratice: proBDNF – nezrela BDNF izoforma (engl. *pro brain derived neurotrophic factor*, proBDNF); mBDNF – zrela BDNF izoforma (engl. *mature brain derived neurotrophic factor*, m-BDNF); Akt – proteinska kinaza B (engl. *protein kinase B*, Akt); DAG – diacilglicerol (engl. *diacylglycerol*, DAG); ERK – kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK); IP₃ – inozitol trofosfat 3 (engl. *inositol trisphosphate 3*, IP₃); JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK); MAPK – protein kinaze aktivirane mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK); NF- κ B – nuklearni faktor kapa-lakih lanaca (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- κ B); PI3K – fosfoinozitol 3-kinaza (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K); PK – proteinska kinaza C (engl. *protein kinase C*, PCK); PLC – fosfolipaza C (engl. *phospholipase C*, PHC); RhoA – član A obitelji homolognih gena (engl. *Ras homolog gene family member*, RhoA); TrkB – tirozin kinaza B (engl. *tyrosine kinase B*, TrkB)

Pokazalo se da BDNF povećava razine Ca^{2+} u korteksu i hipokampusu. Smatra se da sudjeluje u trajnom unutarstaničnom povećanju Ca^{2+} aktiviranog BDNF-om, te tako potiče preživljavanje neurona i može pridonijeti početku dugotrajne potenciranosti (Mizoguchi i sur., 2003.). Ovi BDNF signalni putovi aktiviraju faktore transkripcije koji uvjetuju ekspresiju gena koji kodiraju proteine uključene u neuralnu plastičnost i preživljavanje stanica i de novo ekspresiju BDNF gena (Yoshii i sur., 2010.). Uloga BDNF-a u multiploj sklerozi je u niskom pro-BDNF-u koji dovodi do izostanka ograničavanja (inhibicije) autoreaktivnih T stanica apoptotičkom delecijom i smanjenjem zrelog BDNF-a, koji tada ne može omogućiti dovoljnu neuprotekciju, te se povećava postotak krnjeg BDNF-a, kao kompenzacijski mehanizam (Tongiorgi i sur., 2012.). BDNF bi mogao biti potencijalni klinički biljeg progresije bolesti.

2.8. Interleukin 6

IL-6 nastaje u makrofazima i potiče akutnu fazu upalnog odgovora. Stvara ga reaktivna astroglia, kao odgovor na oštećenje neurona, djelujući kao promotor neurotrofina koji potiču preživljavanje neurona, a povećane razine IL-6 su negativno povezane s bolestima SŽS-a. Tako IL-6 predstavlja jedan od najvažnijih proupalnih citokina u patofiziologiji MS (Gobel i sur., 2018.). Preklinička istraživanja na životinjskim modelima MS-a (tj. eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa, EAE) pokazale su da su miševi s nedostatkom IL-6 bili potpuno otporni na indukciju bolesti (Kleiter i sur., 2016.). Slično, blokiranje IL-6 receptora (IL6R) dovelo je do značajnog smanjenja simptoma EAE (Rothaug i sur., 2016.). IL-6 aktivira različite tipove stanica koje nose membranski vezane IL-6R. IL-6 signaliziranje ima središnju ulogu u kontroli diferencijacije i aktivaciji limfocita T (Slika 9.). Posebno, IL-6 modulira otpor T stanica protiv apoptoze, izaziva aktivaciju T pomoćne stanice i kontrolira ravnotežu između regulacijskih T-stanica i stanica Th17. Važno je, nedavni rezultati ukazuju na to da je blokada IL-6 signaliziranja učinkovita u liječenju eksperimentalnim modelima autoimunih i kroničnih upalnih bolesti kao što je multipla skleroza. IL-6 predstavlja posebnu poveznicu između monocitne infiltracije i neuronalnih promjena u upalnim bolestima. Jedan od načina je što suprimira ekspresiju BDNF gena. Kod multiple skleroze (MS), IL-6 utječe na funkciju T-stanica inducirajući proliferaciju i infiltraciju u SŽS-u regulacijom VCAM-1 na vaskularnim endotelnim stanicama. U prisutnosti TGF- β , također inducira diferencijaciju T-stanica u Th17 stanice koje luče IL-17 koji stimulira proizvodnju IL-6 u astrocitima pozitivnim na povratne petlje. Osim toga, T-stanica izravno inducira proizvodnju IL-6, reaktivnih vrsta kisika (ROS) i dušičnog oksida (NO) u astrocitima, koje doprinose oštećenju mijelinske ovojnice (Marcus i

sur., 2011.). Istraživanje koje je napravio Beauchemini sur. 2016. godine je opisalo pacijenta s reumatoidnim artritismom koji je razvio MS tijekom anti-IL-6 terapije, tako da uloga IL-6 u multiploj sklerozi nije posve štetna.



Slika 9. Pojednostavljena shema mreže citokina koja se pripisuje multiploj sklerozi ili eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu (preuzeto i prilagođeno prema Gobel i sur., 2018.).

Kratice: APC – antigen prezentirajuća stanica (engl. *antigen presenting cell*, APC); IL – 6 – interleukin 6; IL-2 – interleukin 2; IL-4 – ineterleukin 4; IL-9 – interleukin 9; INF-β – interferon β; TGF-β – transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor β*, TGF-β); IL-10 – interleukin 10; IL-12 – interleukin 12; IL 21 – interleukin 21; IL-22 – interleukin 22; IL-23 – interleukin 23; Th 1 – limfociti Th 1; Th 2 – limfociti Th 2; Treg – regulacijski limfociti T; Th 9 – limfociti Th 9; Th 17 – limfociti Th 17; IL-17 – interleukin 17; Th 22 – limfociti Th 22

2.9. Dualni koncept patogeneze multiple skleroze

Patogeneza je multiple skleroze multikomponentna, a karakterizira je upala, neurodegeneracija i otkazivanje mehanizama za obnavljanje SŽS-a. Dosadašnjem uvriježenom stajalištu da je MS upalna demijelinizacijska bolest vođena autoimunim procesom suprotstavlja se teorija da je MS zapravo neurodegenerativna bolest, bilo primarna ili povezana sa životnom dobi. Istraživanja pokazuju da postoji uporište za oba scenarija, te da „sindrom demijelinizacije“ podrazumijeva različite vrste oštećenja, što upućuje na različite mehanizme koji su involvirani

u njihovu nastanku. Stoga je dualni koncept patogeneze najprihvatljivija opcija prema kojoj je MS zapravo bifazična bolest, pri čemu je prva faza obilježena autoimunom upalom s još uvijek potencijalno reverzibilnim oštećenjima, a u kasnijoj fazi dominira aksonalno oštećenje s gubitkom aksona, te atrofija mozga koja se smatra najvažnijim prediktorom ireverzibilnosti. Upalne promjene u kasnoj su fazi manje izražene iako bolest pokazuje sve veću progresiju. Ta disocijacija između intenziteta upale i sve veće progresije neuroloških ispada predstavlja upalno-neurodegenerativni paradoks koji je karakterističan za MS (Lazibat, 2021.) Rezultati istraživanja MR-spektroskopijom su pokazali da oštećenja aksona nastaju već vrlo rano u multiploj sklerozi i ona su kao i propadanje neurona, glavni uzrok progresivne atrofije u SŽS-u.

2.10. Neurodegenerativna faza multiple skleroze

Smatra se da se proces neurodegeneracije javlja sekundarno nakon upale; no nedavna otkrića pokazala su da neurodegeneracija može karakterizirati sve kliničke fenotipove multiple skleroze uključujući rane faze MS-a (Nociti i sur., 2023.). Neurodegeneracija bi mogla biti potaknuta neovisnim patološkim procesima koji se mogu pojaviti neovisno o demijelinizaciji. U drugoj neurodegenerativnoj fazi MS-a važnu ulogu ima smrt oligodendrocita i manjak maturacije progenitornih oligodendrocita što rezultira manjkavom remijelinizacijom. Postoji nekoliko hipoteza o tome što dovodi do neurodegeneracije u MS-u. Demijelinizirani aksoni jedno su od glavnih obilježja MS-a, pa se pretpostavlja da su zbog toga izloženi toksičnim tvarima u okruženju kronične upale (Brinar i sur. 2019). Kronična upalna reakcija djelovanjem proupalnih medijatora, neurotoksina glutamata, kisikovih radikala i dušikova oksida sudjeluju u daljnjem oštećenju mijelina i posljedično aksonalnog oštećenja (Rajda i sur., 2017.). Aktivirana mikroglija i makrofagi dovode do oksidacijskog stresa s mitohondrijskom disfunkcijom koja zbog oslobađanja kisikovih i dušikovih oksidnih radikala uzrokuje oštećenje (Luo i sur., 2017.).

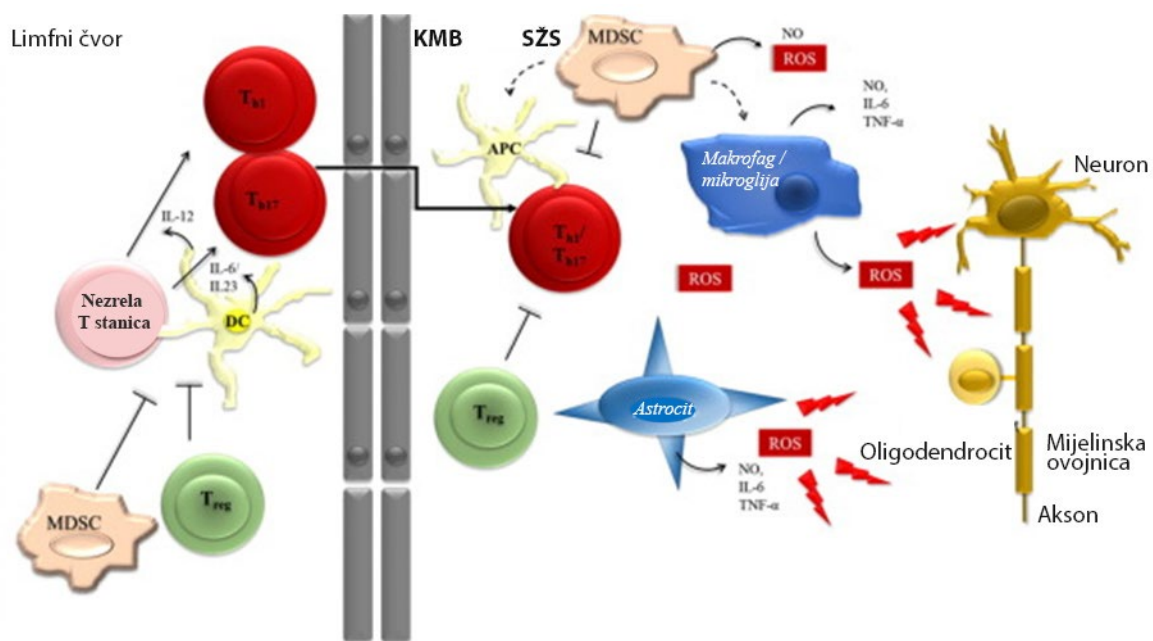
2.11. Oksidacijski stres i antioksidacijski mehanizmi u MS-u

Oksidacijski stres snažno je upleten u upalne i neurodegenerativne patološke mehanizme kod multiple skleroze (MS). Reakcija oksidacije je reakcija u kojoj elektroni prelaze s jedne tvari (reaktanta) na drugu. Ova reakcija rezultira proizvodnjom slobodnih radikala kisika (ROS) (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Oksidacijski stres je stanje uzrokovano neravnotežom

između relativnih razina proizvodnje reaktivnih oksidacijskih metabolita i njihove eliminacije pomoću enzimskog ili neenzimskog antioksidacijskog sustava. Oksidacijsko stanje induciraju oksidacijski stresori koji potječu od ksenobiotika ili su proizvedeni djelovanjem oksidacijskih enzima i bitnih staničnih sastojaka (Sies i sur., 2018.). Oksidacijski stresori povezani su s procesom starenja, neurološkim bolestima i psihijatrijskim poremećajima uključujući Alzheimerovu bolest (AD), Parkinsonovu bolest (PD), MS, amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS) i depresiju.

Dobro je poznato da su stanice mozga i živčanog sustava sklone oksidacijskom oštećenju zbog relativno niskog sadržaja antioksidansa, posebno enzimskih, te visokih razina membranskih polinezasićenih masnih kiselina i željeza koje se lako otpušta iz oštećenih stanica. Kao odgovor na oksidacijski stres, stanice pojačavaju i aktiviraju svoje stanične antioksidacijske mehanizme. Glutation (GSH) je glavni antioksidans u mozgu i kao takav igra ključnu ulogu u detoksikaciji reaktivnih oksidansa. Homeostaza GSH je promijenjena u MS-u, te ima potencijal *in vivo* biomarkera u MS-u, jer omogućuje procjenu oksidacijskog stanja u bolesnika s MS-om i praćenje napredovanja bolesti. ROS su visoko reaktivne molekule koje igraju važnu ulogu u raznim fiziološkim staničnim procesima, kao što je stanična signalizacija, ekspresija gena i obrana domaćina; međutim, povećane razine ROS-a izazivaju oksidacijski stres, što je uobičajena patološka značajka u nekoliko neuroloških poremećaja, uključujući MS (Van Horssen i sur., 2011.). Da bi se zaštitili se od oštećenja izazvanih ROS-om i stanične smrti, stanice su opremljene razrađenim antioksidacijskim mehanizmima i pod fiziološkim uvjetima, razine staničnih ROS su u ravnoteži s ovim endogenim antioksidacijskim sustavom; međutim, kada je ova ravnoteža promijenjena povećanjem proizvodnje ROS-a ili smanjenjem antioksidacijske zaštite, dolazi do povećanja oksidacijskog stresa i naknadnog oštećenje proteina, lipida i deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Aktivnosti antioksidacijskih enzima, kao što je superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutacion peroksidaza (GPx) su niže u mozgu, u usporedbi s drugim tkivima (Dringen i sur., 2003.). Sve u svemu, ovo sugerira da detoksikacija i antioksidacijska zaštita od ROS su važni procesi unutar mozga i mnogi radovi su naglasili važnost oksidacijskog stresa u patogenezi MS-a (Fischer i sur., 2012.). U stanicama SŽS-a koncentracija GSH je oko 1-2 mM, nekoliko stotina puta viša je u cerebrospinalnoj tekućini, koja iznosi ~4 μM , i u krvi, što je ~2 μM . Za održavanje ovoga prilično različitog omjera koncentracije, potrebna je unutarstanična sinteza GSH (Johnson i sur., 2012.). Smatra se da GSH iz krvi ulazi u mozak putem prijenosnika u moždanim kapilarama i endotelnim stanicama preko krvno moždane barijere, glavna se resintetizira od strane astrocita i neurona,

a neizostavan je za nekoliko važnih procesa povezanih s antioksidansima oba tipa stanica. Dva su različita izvora uglavnom odgovorna za proizvodnju ROS unutar stanice: enzimi koji proizvode ROS i mitohondriji. Enzimi koji proizvode ROS visoko su eksprimirani u makrofagima, neutrofilima i mikroglijama, kako bi ubili invazivne patogene u procesu koji se naziva „oksidacijski prasak“. U aktivnom stadiju formiranja MS lezija, ekspresija nekoliko enzima koji stvaraju ROS, uključujući nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze (NOXs), mijeloperoksidazu (MPO) i inducibilni dušikov oksid (NO) sintazu (iNOS), te je utvrđeno da se povećava, osobito u mikroglijama i makrofagima (Fischer i sur., 2012.) Mitohondriji proizvode ROS kao nusproizvod staničnog disanja, a oštećena mitohondrijska funkcija obično se povezuje s pojačanom proizvodnjom ROS. Nedavno je pokazano da su disfunkcionalni mitohondriji uključeni i u rane i u kronične stadije MS patologije, aktivno pridonoseći i aksonskim i neuronskim ozljedama. Raspravlja se o uzroku mitohondrijske disfunkcije u bolesnika s MS-om, ali se pojavljuju dokazi da bi proizvodnja ROS-a od strane makrofaga/mikroglije mogla izazvati mitohondrijsku disfunkciju u bolesnika s MS-om, vjerojatno putem oksidacijskog oštećenja mitohondrijske DNA (Witte i sur., 2014.).



Slika 10. Oksidacijski stres u multiploj sklerozi, centralno i periferno djelovanje (preuzeto i prilagođeno prema Ohli sur., 2016.).

Kratice: IL-6 – interleukin 6; IL-12 – interleukin 12; IL 23 – interleukin 23; Th 1 – limfociti Th 1; Th 17 – limfociti Th 17; Treg – regulacijski limfociti T; KMB-krvno moždana barijera; SŽS-središnji živčani sustav; APC – antigen prezentirajuća stanica (engl. *antigen presenting cell*, APC); ROS – reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS); TNF-α – čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor*, TNF-α); NO – dušikov oksid (engl. *nitric oxide*, NO)

U početnoj fazi stvaranja MS lezija, lokalno proizvedeni ROS mogu izazvati poremećaj krvno-moždane barijere (BBB) i pospješiti migraciju leukocita. Istraživanja *in vitro* pokazuju da ROS promiču propusnost BBB-a, uzrokujući citoskeletne preraspodjele u endotelnim stanicama (Slika 10.), te preraspodjelu i gubitak uskih spojeva (Schreilbelt i sur., 2006.). Ove promjene barijere izazvane monocitima i naknadna migracija monocita mogu se spriječiti ROS čistačima, što dokazuje da ROS igra ključnu ulogu u transendotelnoj migraciji leukocita. S druge strane, smatra se da ROS proizveden od strane infiltriranih leukocita i rezidentnih mikroglija stanica pridonosi patologiji MS-a, potičući mijelinsku fagocitozu i uzrokujući smrt stanica oligodendrocita izazvanu oksidacijskim oštećenjem, ozljedu aksona i disfunkciju mitohondrija (Van Horssen i sur., 2011.). Kao odgovor na oksidacijski stres, stanice pojačavaju i aktiviraju svoje stanične antioksidacijske mehanizme.

Kao ključna komponenta neenzimske grane stanične detoksikacije ROS-a, GSH je sveprisutno raspoređen u stanicama po cijelom tijelu, a oštećenje metabolizma GSH uključeno je u patogenezu nekoliko neurodegenerativnih bolesti. Glutation je prisutan u stanici u reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG) obliku, u tipičnom unutarstaničnom omjeru od $> 100:1$ (GSH:GSSG) i služi kao važan pufer za održavanje redukcijsko-oksidacijskih (redoks) procesa stanice. Ima raznolik niz funkcija u stanici: djeluje kao kofaktor u reakcijama detoksikacije kataliziranim glutathion S-transferazama (GST) i uključen je u izravne (neenzimske) i neizravne (enzimske, posredovane GPx-om) inaktivacije slobodnih radikala. GSH je također važan u skladištenju i prijenosu cisteina i održavanju proteinskih sulfhidrilnih skupina u reduciranom obliku (Carvalho i sur., 2014). Moždane stanice su različito osjetljive na oksidacijski stres, pri čemu su neuroni i oligodendrociti osjetljiviji na oksidacijski stres od astrocita, koji općenito imaju najviše razine GSH. Štoviše, astrociti imaju učinkovitiji metabolizam GSH, budući da su u stanju iskoristiti širi izbor supstrata prekursora za sintezu GSH. S druge strane, neuroni, iako sposobni sintetizirati GSH, ovise o susjednim astrocitima za opskrbu GSH prekursorima. Neuronski sadržaj GSH nije nadopunjen izravnim unosom GSH, jer je izvanstanična koncentracija GSH vrlo niska i stoga bi koštala neproporcionalnu količinu energije. Aktivne MS lezije pokazuju visoke razine ekspresije glutaminaze, koja pretvara glutamin u glutamat u makrofagima i mikroglijama u neposrednoj blizini distrofičnih aksona, što ukazuje da bi proizvodnja glutamata od strane makrofaga mogla biti u osnovi degeneracije aksona i smrti oligodendrocita u MS. U skladu s ovim, nekoliko istraživanja pokazuje da oligodendrociti imaju posebno niske razine GSH, što ih čini osjetljivijima na oštećenja uzrokovana oksidacijskim stresom (Carvalho i sur., 2014.).

Katalaza može pretvoriti H_2O_2 , u vodu i molekularni kisik. Pokazalo se da prekomjerna ekspresija katalaze u citosolu ili mitohondrijima štiti stanice od oksidacijskog oštećenja. Kofaktor se oksidira pomoću jedne molekule vodikovog peroksida, a zatim regenerira prijenosom vezanog kisika na drugu molekulu supstrata. Enzim se nalazi u peroksisomima, citosolu eritrocita i mitohondrijima, uklanjajući štetne vodikove peroksidge kako bi spriječio oštećenje stanica i tkiva (Reiter i sur., 2018.).

Gubitak sposobnosti remijelinizacije može dovesti do aksonalne degeneracije i progresije bolesti. Oštećenje aksona jedan je od glavnih razloga koji dovode do nepovrane onesposobljenosti, a do njega može doći putem kombinacije akutnog upalnog oštećenja, degeneracije kroničnih, demijeliniziranih aksona, te distalne aksonalne transsinaptičke degeneracije zbog distalne transekcije aksona. U aksonima je opisana i mitohondrijska disfunkcija koja najvjerojatnije nastaje zbog poremećaja u prijenosu mitohondrija, podložnosti oksidacijskom stresu, te mutacijama u mitohondrijskoj DNA, što dovodi do smanjenja stvaranja energije, te stvaranju slobodnih radikala. Sve navedeno za posljedicu ima nakupljanje toksina, pojačane potrebe stanice za energijom, nemogućnost te iste stanice da stvori energiju, te razvoj virtualne hipoksije koja dovodi do neurodegeneracije (Brinar i sur., 2019.).

Smatra se da se proces neurodegeneracije javlja sekundarno nakon upale; no nedavna otkrića pokazala su da neurodegeneracija može karakterizirati sve kliničke fenotipove, uključujući rane faze MS-a. Stoga se može pretpostaviti da neurodegeneraciju pokreću neovisni patološki procesi koji se mogu pojaviti neovisno o demijelinizaciji (Frischer i sur., 2009., Louapre i sur., 2015.). Neurodegeneraciji pridonose: djelovanje glutamata koji djeluje toksično na neurone; poremećaj homeostaze natrijskih kanalića koji uzrokuju oštećenje aksona, a izazivaju aktivaciju mikroglije; te oksidacijski stres. Nedavni podaci ukazuju da je oštećenje mitohondrija i posljedični nedostatak energije ključni čimbenik u indukciji demijelinacije i neurodegeneracije. Oksidacijski stres inducira mitohondrijsko oštećenje kod pacijenata s multiplom sklerozom. Međusobno povezani mehanizmi odgovorni za proizvodnju slobodnih radikala u pacijenata s multiplom sklerozom su: upalom izazvano oslobađanje slobodnih radikala putem aktiviranih imunskih stanica, oslobađanje željeza iz mijelinske ovojnice tijekom demijelinacije i oštećenje mitohondrija s posljedičnim pomanjkanjem energije.

2.12. Magnetna rezonancija (MRI) u multiploj sklerozi

Primjena magnetne rezonancije (MRI) u kliničkoj praksi je napravila revoluciju u dijagnozi MS-a. MRI je važan za kliničko praćenje bolesnika s MS-om, pridonoseći procesu definiranja recidiva MS-a i napredovanja bolesti. T1 i T2 lezije koreliraju s progresijom MS-a (Lewin i sur., 1996., Brinar i sur., 2009.). Kao rezultat toga, MRI se sve više koristi kao biljeg za dijagnozu i praćenje aktivnosti bolesti i progresije u MS bolesnika. MRI središnjeg živčanog sustava pokazuje demijelinizacijske lezije u 99% ispitanika. Patološke promjene također su prisutne u lezijama bijele tvari normalnog izgleda (NAWM) i sive tvari (Lassmann i sur., 2018.). Demijelinizacijske promjene se prikazuju u T2 mjernim snimkama protonskim i FLAIR-snimkama (engl. *fluid attenuated inversion recovery*) magnetne rezonancije. Lezije su ovalne veličine oko 5 mm i veće. U T1 mjernim snimkama se mogu vidjeti manje točkaste hipotenzivne promjene koje odgovaraju hiperintenzivnim promjenama u T2 mjernim snimkama. To su tzv. crne točke (engl. *black holes*) koje upućuju na mjesta aksonalnog oštećenja. Ovisno o lokalizaciji demijelinizacijskih oštećenja mogu se očekivati komorbiditeti. Česta je depresije i kognitivni poremećaji.

2.13. Depresija kao komorbiditet

Depresija se pojavljuje u 50-60% ispitanika s MS-om, a može biti reaktivna, endogena ili dio same bolesti, te može pridonositi razvoju umora. Različita istraživanja su pokazala da je godišnja prevalencija velikog depresivnog poremećaja u oboljelih od multiple skleroze veća u usporedbi sa zdravom populacijom i u usporedbi s oboljelima od drugih kroničnih bolesti. Psihička patnja u bolesnika s MS-om je povezana s neurološkom onesposobljenošću, ali je prisutna i u bolesnika s minimalnom neurološkom onesposobljenošću ili bez nje. Suicid je uzrok smrti u 15% pacijenata, a rizični čimbenici uključuju muški spol i društvenu izolaciju (Bašić Kes i sur., 2021.). Nekoliko mehanizama može objasniti visoku prevalenciju depresije uz MS. Ona se može objasniti kao reakcija na stres zbog dijagnoze, te nesigurnost u vezi s prognozom. U nedostatku odgovarajuće društvene potpore stresna reakcija se može produljiti. Ako bolesnik nema potrebne psihološke resurse kako bi prekinuo začarani krug, tijekom vremena se može razviti kronična klinička depresija. Organska komponenta također ima ulogu, a povezana je sa zahvaćenošću određenih područja mozga tijekom razvoja bolesti.

Neuroradiološke pretrage pokazuju pozitivnu korelaciju između depresije i lezija u dominantnom fasciculusu arcuatusu, frontalne i parijetalne atrofije, lezija u lijevoj medijalnoj prefrontalnoj regiji, s atrofijom u dominantnom prednjem temporalnom režnju i općenito više abnormalnosti u bijeloj i sivoj tvari. Zamijećenja je povezanost između depresije i lezija u moždanom deblu i limbičkom sustavu. Patofiziologija depresije u MS-u nije razjašnjena. Neuropalna komponenta multiple skleroze može pridonijeti razvoju depresije. Snižene koncentracije BDNF-a u serumu često su povezane s MDD-om (Karege i sur., 2002., 2005., Sen i sur., 2008., Molendijk i sur., 2011.). Temeljita meta-analiza Molendijka i sur. pokazala je da su, unatoč vidljivoj heterogenosti istraživanja, razine BDNF-a u serumu ukupno niže kod pacijenata s depresijom (Molendijk i sur., 2014.). Ova otkrića nedavno su potvrdila dva druga metaanalitička pokušaja (Polyakova i sur., 2015., Kishi i sur., 2017.). U glodavaca je izravna infuzija BDNF-a u hipokampusu (Shirayama i sur., 2002., Deltheil i sur., 2008., 2009., Sirianni i sur., 2010.) i srednjem mozgu (Siuciak i sur., 1997.) pokazala učinke slične antidepressivima. Nasuprot tome, prijavljen je suprotan, prodepresivni učinak nakon infuzije BDNF-a u VTA ili NAc (Eisch i sur., 2003.). Isti je nesrazmjer bio prisutan korištenjem obaranja ekspresije BDNF-a specifičnog za regiju. Oštećenje BDNF signalizacije u hipokampusu (Taliaz i sur., 2010.) izazvalo je prodepresivno ponašanje, dok je obaranje BDNF-a u NAc imalo antidepressivni učinak (Berton i sur., 2006.). Uzeti zajedno, ovi podaci sugeriraju da bi se BDNF mogao smatrati ključnom terapijskom molekulom protiv depresije (Allen i sur., 2015.).

Meta-analiza je izvjestila o povećanim razinama IL-6 u krvi (Wang i sur., 2018.), a druga istraživanja su pokazala smanjene razine BDNF u krvi kod bolesnika s depresijom (Kishi i sur., 2018.).

Oslobađanje proupalnih citokina kao što su interferon, IL-6 ili TNF- α može pridonijeti razvoju simptoma koji mogu potaknuti razvoj depresije, kao što su gubitak apetita, poremećaj spavanja, umor, te gubitak tjelesne mase. Neki od pacijenata koji primaju kortikosteroidnu terapiju zbog relapsa reagiraju hipomanijom, koja može biti predispozicija za bipolarni afektivni poremećaj. Komorbiditeti kao što je depresija utječu na tijek bolesti (Marrie i sur., 2010.). Za procjenu depresije najčešće se primjenjuje Beckova skala.

2.14. Kognitivni poremećaji u MS-u

Kognitivni poremećaji su prisutni u do 65% bolesnika s multiplom sklerozom, zahvaćajući različite kognitivne funkcije kao što su pamćenje, brzina obrade informacija, pažnja, verbalna fluentnost, vizualno prostorna analiza i egzekutivne funkcije. Kognitivne disfunkcije značajno utječu na kvalitetu života osoba s MS-om, neovisno o tijeku i fazama bolesti. Rezultat su patoloških promjena u mozgu. Kognitivna disfunkcija kod multiple skleroze određene funkcije zahvaća češće nego druge; uglavnom su zahvaćene frontalne i temporalne strukture koje imaju veliku ulogu u emocionalnim funkcijama, stoga povezanost između kognitivnih i emocionalnih poremećaja može biti povezana s područjem oštećenja (Bašić Kes i sur., 2021.). Oštećenja u mozgu vizualizirana MR-om koreliraju s rezultatima neurofizioloških testova. Lezije bijele tvari i kortikalna atrofija su dobri prediktori kognitivnih poremećaja u MS-u. Rezultati mnogobrojnih MR istraživanja ukazuju da su oštećenja bijele i sive moždane tvari uključena u razvoj kognitivnih poremećaja (Mesaroš i sur., 2012.). Promjene u bijeloj tvari mijenjaju veze unutar neuronalnih mreža, a time smanjuju brzinu misaonog procesuiranja, remete pažnju i radnu memoriju, a promjene u sivoj tvari mogu rezultirati promjenama u pamćenju i ponašanju. MRI tehnike su pokazali da je kortikalna siva tvar u MS-u uključena od samog početka bolesti. Oštećenje talamusa može pridonijeti poremećaju kortiko-subkortikalnih i kortiko-kortikalnih veza (Amin i sur., 2020.). Zahvaćenost kortikalnih područja može objasniti oštećenje učenja i pamćenja u oštećenja hipokampusa ili izvršnih funkcija u promjenama frontalnog režnja (Benedict i sur., 2020.). Gubitak neurona u temporalnoj i frontalnoj kortikalnoj sivoj tvari i regionalna atrofija su odgovorni za kognitivni poremećaj.

MS je kompleksna bolest i mnogi klinički i patološki čimbenici sudjeluju u kognitivnim poremećajima što uključuje depresiju, umor ali i fluktuaciju upale i aktivnost imunskog sustava (Miller i sur., 2018.). Dosadašnji radovi prikazuju korelaciju kognitivnih oštećenja s T2 i T1 prikazom bijele i sive tvari. Patanella i sur. (2010) su pokazali korelaciju između sniženog BDNF-a i povišenog IL-6 te nižih vrijednosti kognitivnih testova u RRMS što ukazuje na moguću ulogu ovih čimbenika u kognitivnom poremećaju u MS-u. Postoje dokazi da je BDNF suštinski važan u održavanju normalnih fizioloških procesa mozga u odraslih. BDNF ima ulogu u modulaciji dendritičkog grananja i dendritičke morfologije kralježnice (Horsh i sur., 2002., Tanaka i sur., 2008.), kao i sinaptičke plastičnosti i dugoročnog potenciranja (Kang i sur., 1995., Fugurov i sur., 1996.) Na taj način BDNF utječe na učenje i pamćenje (Yamada i sur. 2002., Egan i sur., 2003., Cathomas i sur., 2010.). BDNF također modulira metaboličku

funkciju hipotalamusa, što dalje odražava njezinu ulogu u raznolikosti mozga odrasle osobe (Xu i sur., 2003., Cao i sur., 2009.).

Moguće je da uloga BDNF-a u ljudskoj memoriji leži u njegovom polimorfizmu. Jedan takav polimorfizam sastoji se od valina do supstitucije aminokiseline metionina na kodonu 66 (Val66Met) pro-BDNF sekvence, koja se javlja s učestalošću do 30% među bijelcima (Shimizu i sur., 2004.). Ova mutacija dovodi do poremećaja u pakiranju BDNF-a u sekretorne granule, te smanjenju otpuštanja BDNF-a ovisnog o aktivnosti (Egan i sur., 2003.). Val/Met varijanta povezana je s oštećenjem epizodične memorije i drugih parametara ljudske kognicije, zajedno sa smanjenom aktivacijom hipokampusa kako je izmjereno funkcionalnom magnetskom rezonancijom (MRI), (Egan i sur., 2003., Hariri i sur., 2003., Dempster i sur., 2005.). Val/Met heterozigoti također imaju smanjen volumen hipokampusa u usporedbi s Val/Val homozigotima (Pezawas i sur., 2004.). Povezano s godinama zabilježeni su padovi serumskih razina BDNF-a uz smanjenje volumena hipokampusa i prostorne memorije u starijih (Erickson i sur., 2010.). Ova otkrića upućuju na ulogu BDNF-a u ljudskoj memoriji i poremećajima moždanih funkcija.

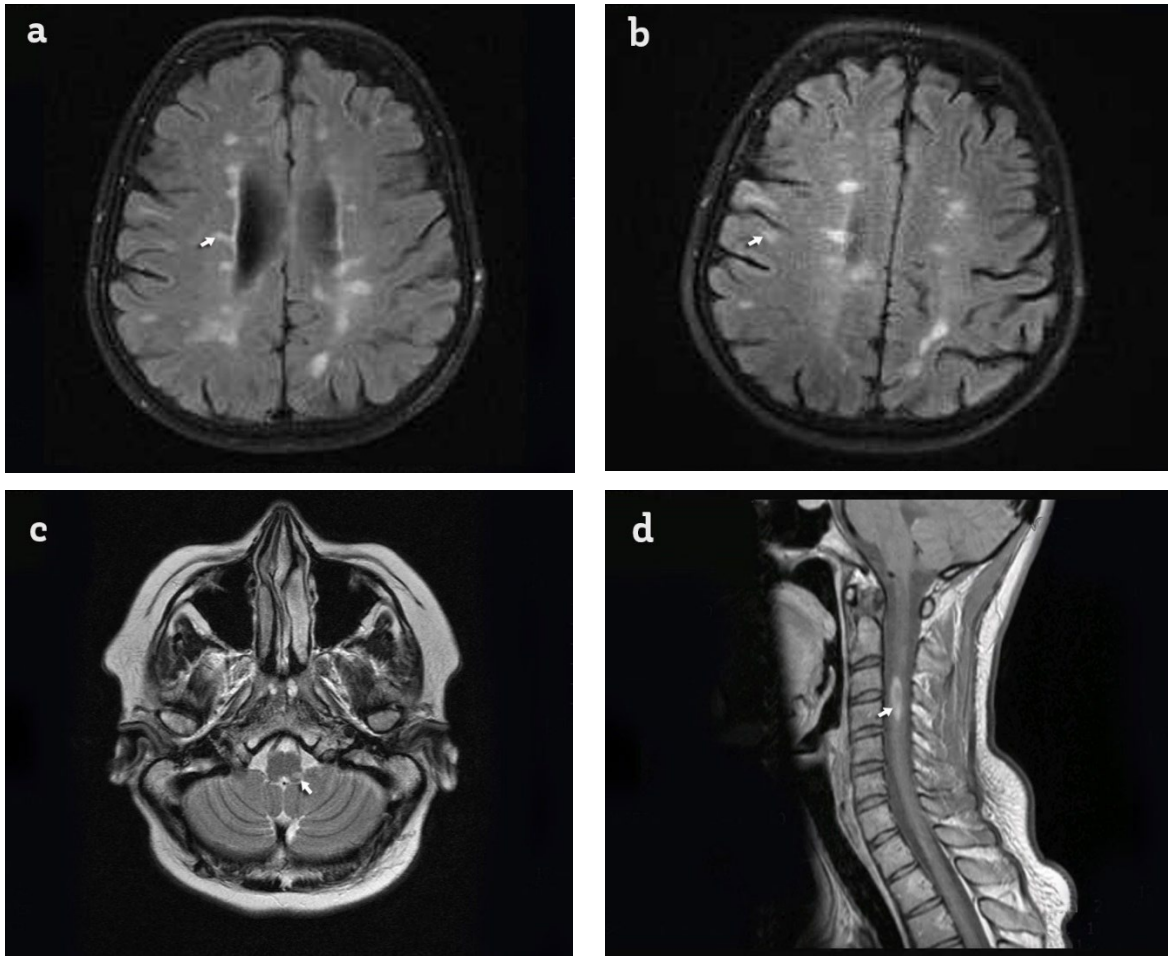
3. ISPITANICI i METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Općoj bolnici Dubrovnik. Podatci su prikupljeni u razdoblju od 01. rujna 2020. do 01. listopada 2021. godine.

Ispitivanje je provedeno na 60 ispitanika s verificiranim demijelinizacijskim oštećenjima koji zadovoljavaju kriterije RRMS-a. Dijagnoza MS-a se postavlja na temelju pet osnovnih principa: postojanje tipične kliničke prezentacije koja upućuje na MS (optički neuritis, inkompletni transverzalni mijelitis, simptomi od strane moždanog debla i malog mozga); objektivnog dokaza zahvaćenosti središnjeg živčanog sustava; primarno pomoću magnetne rezonance; demonstraciji diseminacije u prostoru; demonstraciji diseminacije u vremenu; nepostojanju boljega objašnjenja kliničke prezentacije od MS-a. Ispitanicima je dijagnoza postavljena na temelju revidiranih Mc Donaldovih kriterija uz uključujuće kriterije (trajanje bolesti manje od deset godina, klinička i radiološka potvrda bar jednog relapsa u godini dana, Standardizirana Kurtckeova skala proširenog stanja invaliditeta u MS-u (engl. *Expanded Disability Status Scale*, EDSS) zbroj manji od 5.

Najosjetljivija paraklinička metoda u otkrivanju tipičnih lezija mozga i kralježnične moždine je magnetna rezonancija (MR), koja je ujedno korisna u isključivanju drugih bolesti. Dokazivanje diseminacije u prostoru MR-om postiže se prisutnošću barem jedne hiperintenzivne lezije u T2 sekvenci MR-a u najmanje dva od četiri tipična područja (periventikularnom, jukstakortikalnom ili kortikalnom, infratentorijskom ili spinalnom). Dokazivanje diseminacije u vremenu MR-om se postiže istodobnom prisutnošću lezije koja se imbibira kontrastom i lezije koja se ne imbibira kontrastnim sredstvom na jednoj snimci MR-a ili pojavom nove hiperintenzivne lezije u T2 sekvenciji odnosno lezije koja se imbibira kontrastnim sredstvom na kontrolnoj snimci MR-om, neovisno o razdoblju između dviju snimki. Potrebno je učiniti magnetnu rezonanciju kralježnične moždine, jer se demijelinizacijske lezije kralježnične moždine nalaze u 80-90% bolesnika s multiplom sklerozom i polovine bolesnika s klinički izoliranim sindromom.



Slika 11. Demijelinizacijske lezije u 4 tipične regije za multiplu sklerozu; a) periventrikularne; b) jukstakortikalne c) infratentorijske d) spinalna lezija koja se imbibira kontrastom (slike su preuzete iz Baze Infinit – Opće Bolnice Dubrovnik).

Iznimno je važno da svi ispitanici rade magnetnu rezonanciju na istom uređaju kao i u prethodnom snimanju, što olakšava usporedbu snimki i omogućava bolje praćenje jer se pri snimanju pridržavalo pravila iz istog protokola, što i je preporuka skupine MAGNIMS (engl. *Magnetic Resonance Imaging in MS*).

Uz MR, dodatna paraklinička metoda, indikativna za dijagnozu MS-a je prisutnost oligoklonskih vrpca u likvoru, koja može zamijeniti kriterij diseminacije u vremenu (Thompson i sur., 2018.).

U kontrolnu skupinu u istraživanje je uključeno 66 zdravih ispitanika koji su se obrađivali radi kroničnog umora, kojima su svi rezultati obrade bili u granicama normale, dakle nije dijagnosticirana patologija od strane SŽS-a. Ispitanici su dobrovoljno odlučili sudjelovati u istraživanju nakon što im je prezentiran plan, postupci i svrha izvođenja istraživanja (Prilog 1) te su pristupili istraživanju nakon što su potpisali suglasnost za sudjelovanje - Informirani

pristanak (Prilog 2). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Opće bolnice Dubrovnik, kao i Etičko povjerenstvo Medicinskoga fakulteta u Zagrebu, a provedeno je u skladu s principima Dobre kliničke prakse. Svakom je ispitaniku pridodan identifikacijski broj i oznaka.

Između spola i dobi ispitanika koji su pripadali muškarcima i ženama nije bilo statistički značajne razlike (Tablica 1).

Tablica 1. Profil ispitanika po dobi

Skupina		N	Medijan	SD	Min	Max	Centile		P
							25.	75.	
Dob (godine)	Zdravi	66	43,50	9,58	20,00	60,00	32,00	48,00	0,300
	Bolesni	60	43,50	10,76	18,00	66,00	36,00	50,00	

Ispitanici su ujednačeni po dobi, srednja dob zdravih i oboljelih je oko 43 godine.

Prema spolu ispitanici su bili raspoređeni tako da je u zdravih ispitanika bilo 24 muških, 42 ženskih, a od bolesnih 19 muških i 41 ženskih ispitanika što je u skladu s prevalencijom bolesti i omjerom žene/muškarci 2-2,5:1 puta za obolijevanje od multiple skleroze (Tablica 2).

Ispitanici su preuzeti iz neurološke ambulante u koju dolaze na redovitu kontrolu ili zbog pogoršanja (relapsa). Pri ovim neurološkim pregledima i obradama su napravljeni navedeni postupci.

Tablica 2. Profil ispitanika po spolu

		Skupina				P
		Zdravi		Bolesni		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	24	36,4%	19	31,7%	0,579
	Ženski	42	63,6%	41	68,3%	

3.2. Plan ispitivanja (postupci)

3.2.1. Klinički postupci

3.2.1.1. Skala onesposobljenosti EDSS

Pri svakom pregledu osobi koja se liječi radi RRMS-a se redovito određuje EDSS (engl. *expanded disability status scale*) ljestvica zlatnog standarda u ocjenjivanju onesposobljenosti u oboljelih od MS-a (Tablica 3). S pomoću ove ljestvice kvantitativno se procjenjuje stupanj kliničkog oštećenja za osam pojedinih sustava u tijelu: piramidni, osjetni, sustav moždanog debla, malog mozga, vidni sustav, kontrola sfinktera, kognitivne funkcije, ostalo (Kurtzke, 1983.).

Na temelju zbroja u tim sustavima izračunava se ukupni EDSS zbroj koji neurolozima daje objektivnu kvantifikaciju onesposobljenosti, a ukupna vrijednost može biti od 0-10, s tim da se vrijednosti EDSS-a od 0-4,5 odnose na bolesnike koji su u potpunosti pokretni, dok su vrijednosti od 5,0-9,9 definirane poteškoćama u kretanju. Minimalni stupanj porasta na EDSS ljestvici iznosi 0,5 pod uvjetom da je inicijalni EDSS barem 1 (Meyer-Mooock i sur, 2014.).

Tablica 3. EDSS skala Standardizirana Kurtzkeova proširena skala stanja invaliditeta u MS (engl. *Expanded Disability Status Scale, EDSS*)

EDSS skala - Standardizirana Kurtzkeova proširena skala stanja invaliditeta u MS – (EDSS)	
0,0	Normalan neurološki status
1,0	Nema neuroloških ispada, ali postoje minimalni znaci u jednom funkcionalnom sustavu (FS).
1,5	Nema neurološkog ispada, ali postoje minimalni znaci poremećaja u više funkcionalnih sustava (FS)
2,0	Vrlo mali ispad jednog funkcionalnog sustava (FS).
2,5	Blagi ispad u jednom funkcionalnom sustavu (FS) ili minimalan u 2 (FS).
3,0	Umjereni ispad u 1 funkcionalnom sustavu (FS), ili znaci u 3 – 4 (FS), potpuno pokretan
3,5	Potpuno pokretan, ali sa umjerenim ispadom u jednom funkcionalnom sustavu (FS) i više od minimalnih znakova u ostalim (FS).
4,0	Potpuno pokretan bez pomoći, samostalan oko 12 sati na dan. Uprkos relativno teškom ispadu može hodati bez pomoći ili odmora oko 500 metara
4,5	Potpuno pokretan uz pomoć, veći dio dana pokretan, ali uz ograničenju potpune samostalnosti koje zahtjeva manju pomoć, može hodati bez odmora 300 metara
5,0	Pokretan uz pomoć ili uz odmor nakon hoda od 200 metara; umanjena je potpuna svakodnevna aktivnost
5,5	Pokretan bez pomoći ili uz odmor nakon hoda od 100 metara; onesposobljenost je toliko jaka da potpuno utječe na sve dnevne aktivnosti
6,0	Pokretan uz povremenu ili jednostranu, stalnu pomoć (štap, štaka ili proteza), za hod do 100 m sa ili bez odmora. (Obično su (FS) ekvivalentni kombinaciji više od dva (FS), najčešće nivoa 3+).
6,5	- Pokretan uz stalnu obostranu pomoć (štap, štaka ili proteza) za hod do 20 metara bez odmaranja. (Obično su (FS) ekvivalentni kombinaciji više od dva (FS) nivoa 3+).
7,0	Nesposoban za hodanje više od 5 metra, čak i uz tuđu pomoć, bolesnik je ograničen na upotrebu invalidskih kolica ; samostalno se kreće u njima i obavlja redovne aktivnosti; u kolicima provodi 12 sati dnevno. (Obično su FS ekvivalentni kombinaciji više od jednog (FS) nivoa 4+).
7,5	Nesposoban za hod više od nekoliko koraka; ograničen na upotrebu invalidskih kolica; može biti potrebna pomoć pri obavljanju aktivnosti; može upravljati kolicima ali ne može brinuti o sebi u standardnim kolicima čitav dan; može zahtjevati upotrebu motornih kolica. (Obično su (FS) ekvivalentni kombinaciji više od jednog (FS) nivoa 4+)
8,0	Bolesnik je ograničen na krevet ili stolicu ili samostalni boravak u invalidskim kolicima ali veći dio dana provodi van kreveta; očuvane su mnoge funkcije osobne higijene; efikasno koristi ruke. (Obično su (FS) ekvivalentni kombinaciji, nivoa 4+ u nekoliko sustava).
8,5	Bolesnik je ograničen na krevet veći dio dana; ima minimalnu efikasnost korištenja ruke ili ruku; izostaju neke funkcije osobne njege. (Obično su (FS) ekvivalentni kombinaciji, nivoa 4+ u nekoliko sustava).
9,0	Bolesnik je bespomoćan u krevetu, može kontaktirati i jesti. (Obično su (FS) ekvivalentni kombinacije većine nivoa 4+).
9,5	Bolesnik je potpuno bespomoćan u krevetu; nesposoban je normalno kontaktirati, jesti ili gutati. (Obično su (FS) ekvivalentni kombinaciji skoro svih nivoa 4+).
10,0	Smrt

3.2.1.2. Beckov upitnik za depresiju II (BDI-II)

Multipla skleroza i depresivni poremećaj često se pojavljuju istovremeno, ali depresija često ostaje nedijagnosticirana u oboljelih od multiple skleroze. Depresija je najčešći psihijatrijski poremećaj kod multiple skleroze. Upitnici za samoprocjenu depresije dobra su opcija tamo gdje standardizirana dijagnostika temeljena na kliničarima nije izvediva.

Beckov upitnik za depresiju II (Tablica 4) je jedna od najupotrebljivijih skala samoprocjene za otkrivanje i mjerenje ozbiljnosti prisustva depresije kod odraslih osoba. Prvobitno je razvijena za upotrebu na kliničkoj populaciji. Međutim, kada je skala pokazala zadovoljavajuće psihometrijske karakteristike i faktorsku strukturu nakon testiranja na različitim nekliničkim uzorcima, opravdano se počela primjenjivati i na nekliničkim populacijama. Sacco i sur. su 2016. god. napravili istraživanje koja je istraživala psihometrijska svojstva drugog izdanja Beckovog popisa depresije (BDI-II) za procjenu depresivnih poremećaja na uzorku 141 talijanskog pacijenta s MS-om. BDI-II je pokazao dobru unutarnju konzistentnost (Cronbachov alfa 0,89) i dobru konvergentnu i divergentnu valjanost. S obzirom na CMDI koji služi kao "zlatni standard", krivulja radne karakteristike prijavnika otkrila je da je BDI-II odgovarajuća dijagnostička mjera i da je optimalni ukupni granični rezultat bio 18,5. Takav je rezultat identificirao klinički relevantne simptome depresije u 25,5% našeg MS uzorka (Sacco i sur., 2016.). Mjere se kognitivni, bihevioralni, afektivni, somatski i motivacijski simptomi depresivnosti.

To je samoocjenska ljestvica i sastoji se od 21 pitanja, a na svako je moguće odgovoriti s četiri odgovora koja se ocjenjuju vrijednostima od 0 do 3. Minimalni rezultat je 0, a maksimalni 63, veći rezultat ukazuje na veći stupanj depresije. Ispituje se poremećaj raspoloženja, gubitak nade, osjećaj odbačenosti, nesposobnost za uživanje, osjećaj krivice, potreba za kaznom, mržnja prema sebi, samoosuđivanje, sklonost samoubojstvu, plačljivost, razdražljivost, poremećaj u odnosu s drugim ljudima, neodlučnost, negativna slika o sebi, nesposobnost za rad, poremećaj sna, umor, nedostatak apetita, mršavljenje, hipohondrija i gubitak libida. Od ispitanika se traži da označe odgovor koji najbolje opisuje njihova osjećanja u protekla dva tjedna, uključujući i danas.

Tablica 4. Beckov upitnik za depresiju (BDI-II)

Beckov inventar depresije BDI-II		ŠIFRA ISPITANIKA / SUDIONIKA	
1.		2.	
0	ne osjećam se tužno	0	nisam pretjerano obeshrabren/a oko budućnosti
1	osjećam se tužno	1	obeshrabren/a sam oko budućnosti
2	tužan/na sam cijelo vrijeme i ne mogu se oprijeti tome	2	osjećam se kao da se nemam čemu radovati
3	tako sam tužan/na i nesretan/a cijelo vrijeme i ne mogu to podnijeti	3	osjećam kako je budućnost beznadna i da se stvari ne mogu popraviti
3.		4.	
0	ne osjećam se kao neuspješan/a	0	uživam u stvarima baš kako sam to i prije radio/la
1	mislim da sam neuspješniji/a od prosječne osobe	1	ne uživam u stvarima kao prije
2	osvrćući se na svoj život, sve što vidim je dosta neuspjeha	2	ništa mi više ne može priuštiti zadovoljstvo
3	kao osoba osjećam se kao potpuni neuspjeh	3	nezadovoljan/a sam sa svime i sve mi je dosadno
5.		6.	
0	nemam osjećaj krivnje	0	ne osjećam kao da sam kažnjen
1	osjećam se krivim/om dobar dio vremena	1	osjećam kako bih mogao biti kažnjen/a
2	osjećam se poporilično krivim/om većinu vremena	2	očekujem da ću biti kažnjen/a
3	stalno se osjećam krivim/om	3	osjećam kao da sam kažnjen/a
7.		8.	
0	ne osjećam se razočaranim/om u sebe	0	ne osjećam da sam lošiji/a od drugih
1	raočaran/a sam u sebe	1	kritičan/na sam prema sebi zbog svojih slabosti ili pogrešaka
2	gadim se samome/oj sebi	2	čitavo vrijeme krivim sebe za svoje pogreške
3	mrzim sebe	3	krivim sebe za sve loše što se dogodi
9.		10.	
0	nemam misli o samoubojstvu	0	ne plaćem više nego obično
1	razmišljam o samoubojstvu, ali ne bih to napravio	1	plaćem više nego što je to bio slučaj prije
2	volio/la bih se ubiti	2	sada plaćem cijelo vrijeme
3	ubio bi se ako bi imao/la priliku	3	prije sam mogao/la plakati, a sada to ne bih mogao/la čak niti kada bih to htio

Tablica 4. (nastavak)

11.		12.	
0	stvari me više iritiraju nego ikada prije	0	nisam izgubio/la interes za druge ljude
1	stvari me iritiraju malo više nego obično	1	manje sam zainteresiran/a za druge ljude nego prije
2	poprilično sam izivcirani/a i iziritiran/a velik dio vremena	2	izgubio/la sam većinu svog interesa za druge ljude
3	osjećam se iziritirano čitavo vrijeme	3	izgubio/la sam interes za druge ljude
13.		14.	
0	donosim odluke vješto, baš kao i prije	0	ne osjećam se kao da izgledam išta lošije nego prije
1	odgađam donošenje odluka više nego prije	1	Zabrinut sam da izgledam staro i neprivlačno
2	imam više teškoća u donošenju odluka nego prije	2	Osjećam kako su se dogodile trajne promjene mog fizičkog izgleda koje su me učinile neatraktivnim
3	Uopće više ne mogu donositi odluke	3	Vjerujem da izgledam ružno
15.		16.	
0	mogu raditi jednako kao prije	0	spavam jednako kvalitetno kao prije
1	dodatni napor je potreban kako bi započeo/la nešto raditi	1	ne mogu spavati jednako kvalitetno kao prije
2	moram se zaista jako potruditi kako bih nešto učinio/la	2	probudim se sat, dva ranije nego prije i teško mi je ponovo zaspati
3	uopće ne mogu raditi	3	probudim se nekoliko sati ranije nego prije i ne mogu ponovo zaspati
17.		18.	
0	ne umaram se više nego inače	0	apetit mi je lošiji nego inače
1	umaram se brže nego inače	1	apetit mi nije dobar kao što je bio
2	Umaram se	2	apetit mi je puno lošiji sad
3	Preumoran/a sam da bi išta radio/la	3	više uopće nemam apetita
19.		20.	
0	U zadnje vrijeme nisam puno izgubio/la na kilaži	0	Nisam zabrinut/a za svoje zdravlje više nego obično
1	izgubio/la sam više od dva kilograma	1	zabrinut/a sam oko fizičkih problema kao što su bolovi, nadražen trbuh, zatvor
2	izgubio/la sam više od četiri kilograma	2	Veoma sam zabrinut/a oko svojih fizičkih problema i teško mi je misliti o nečemu drugome
3	izgubio/la sam više od sedam kilograma	3	Toliko sam zabrinut/a oko svojih fizičkih problema da ne mogu misliti o ničemu drugome
21.			
0	Nisam primjetio/la nikakvu promjenu oko svojeg interesa za seks	0	
1	Manje sam zainteresiran/a za seks nego što sam to prije bio	1	
2	Gotovo nemam interes za seks	2	
3	Potpuno sam izgubio/la interes za seks	3	

Prosječni rezultati testa prikazanog u Tablici 4, pokazuju da ispitanici koji su postigli do 11 bodova nemaju depresiju, a ispitanici koji su postigli rezultat od 12 do 19 bodova imaju blagu depresiju, od 20 do 28 bodova imaju umjerenu depresiju (Beck i sur., 1996.). Teška depresivna

epizoda dijagnosticira se kada je postignut rezultat veći od 28. Rezultat iznad 63 boda ukazuje na ozbiljan mentalni poremećaj i treba hitnu psihijatrijsku pomoć.

3.2.1.3. MoCA - Montrealska ljestvica kognitivne procjene (engl. *Montreal cognitive Assessment, MoCA*)

MoCA je relativno jednostavan i kratak test koji pomaže brzo odrediti ima li osoba odstupanja u kognitivnim funkcijama. Test je osmišljen 1996. godine u Montrealu, Kanada. Njegov autor i vlasnik autorskih prava je dr. Ziadom Nasreddine (McGill University, Sherbrooke sveučilište, Kanada). Koristi se za kliničku uporabu, edukativne i istraživačke svrhe. Dozvolu za korištenje imaju sveučilišta, zaklade, zdravstveni djelatnici, bolnice, ordinacije, zavodi za javno zdravstvo. Test se može koristiti, reproducirati i distribuirati i bez dopuštenja. Dostupan je i besplatan za sve ispitanike. MoCA test se koristi u 100 zemalja i preveden je na 36 jezika i narječja. Istraživanje o korisnosti Montrealske ljestvice pokazalo je kako je ljestvica značajno sredstvo za otkrivanje blagog kognitivnog poremećaja (engl. *mild cognitive impairment, MCI*) i ranog otkrivanja Alzheimerove bolesti. Njegova senzitivnost je više ili jednako 94%, a specifičnost manje ili jednako 60% (Rossetti i sur., 2011.).

Osim za rano otkrivanje Alzheimerove bolesti, MoCA test može se koristiti i za rano otkrivanje drugih neuroloških bolesti: Parkinsonove bolesti, Huntingtonove bolesti, multiple skleroze, epilepsije, poremećaja spavanja REM i drugih stanja. Prema istraživanju Freitas i sur. iz 2016. godine MoCA je koristan i osjetljiv instrument za prepoznavanje kognitivnog oštećenja povezanog s MS-om. Također je u istraživanju Dagenaisa i sur. iz 2014. godine potvrđena validacija MoCA testa kao alata za probir prisutnosti kognitivne disfunkcije u bolesnika s multiplom sklerozom, čak i u bolesnika s blagim funkcionalnim nedostatkom (EDSS). Osmišljena je kao brzi test za probir ispitanika s blagim poremećajem kognitivnih funkcija koji obuhvaća različite kognitivne domene: pažnju, koncentraciju, izvršne funkcije, pamćenje, jezik, vizuokonstrukcijske sposobnosti, konceptualno mišljenje, računanje i orijentaciju.

Vrijeme primjene MCP testa je približno 10 minuta. Ukupni mogući rezultat je 30 bodova, rezultat od 26 bodova i više smatra se normalnim. Budući da rezultat MoCA ovisi o stupnju obrazovanja, autori preporučuju dodavanje boda ako pacijent ima više od 12 godina školovanja.

Visoka pouzdanost MoCA u bolesnika s MS-om dokazana je u nekoliko istraživanja. Test je pokazao kompatibilna psihometrijska svojstva s konvencionalnim, opsežnijim

neuropsihološkim testovima koji se koriste u bolesnika s multiplom sklerozom kao „Kratka ponovljiva baterija neuropsiholoških testova“ (engl. *Brief Repeatable Battery*, BRB) i „Minimalna procjena kognitivnih funkcija u MS“ (engl. *Minimal Assessment of Cognitive Function in Multiple Sclerosis*, MACFIMS) (Charest i sur., 2020.). Iako je MoCA test pokazao dobru osjetljivost i specifičnost kada se koristi na preporučenom pragu od 26, također se navodi da je niži prag od izvorne granične vrijednosti koristan za optimalni probir, jer smanjuje lažno pozitivne stope i poboljšava dijagnostičku točnost. Nadalje, u bolesnika s multiplom sklerozom bez subjektivnih kognitivnih tegoba, granična vrijednost od 27 mogla bi pružiti bolju ravnotežu između osjetljivosti i specifičnosti testa. Prednost MoCA u odnosu na druge mjere kognitivnog probira je širina pokrivenosti kognitivne domene izvan memorije, a također otkriva pojedince koji pokazuju neamnestičke kognitivne promjene (Vogel i sur., 2015.). U bolesnika s multiplom sklerozom MoCA daje informacije o općim poremećajima kognitivnih funkcija. Unatoč tome, potrebno je više istraživanja kako bi se ispitao optimalni granični rezultat za otkrivanje kognitivnih oštećenja kod pacijenata s MS-om (Rosca i sur., 2020.).

Test se temelji na:

- kratkotrajno pamćenje (5 bodova)
 - vizualne i prostorne sposobnosti s testom sata (3 boda)
 - zadatak koji se sastoji od kopiranja kocke (1 bod)
 - izvršne funkcije (1bod)
 - fonemska fluentnost (1 bod)
 - verbalna apstrakcija (2 boda)
 - pozornost, koncentracija i radna memorija (1 bod)
 - oduzimanje serije (3 boda)
 - čitanje brojeva desnom stranom prema gore (1 bod) i unatrag (1 bod)
 - jezik s predstavljanjem kućnih ljubimaca (3 boda),ponavljanjem složenih rečenica (2 boda)
 - orijentacija u vremenu i prostoru (6 bodova).
-
- Bodovi se mogu tumačiti na sljedeći način:
 - 26/30 = nema neurokognitivnih oštećenja
 - 18-25/30 = blago oštećenje
 - 11-17 = umjereno oštećenje
 - Manje od 10 = teško oštećenje.

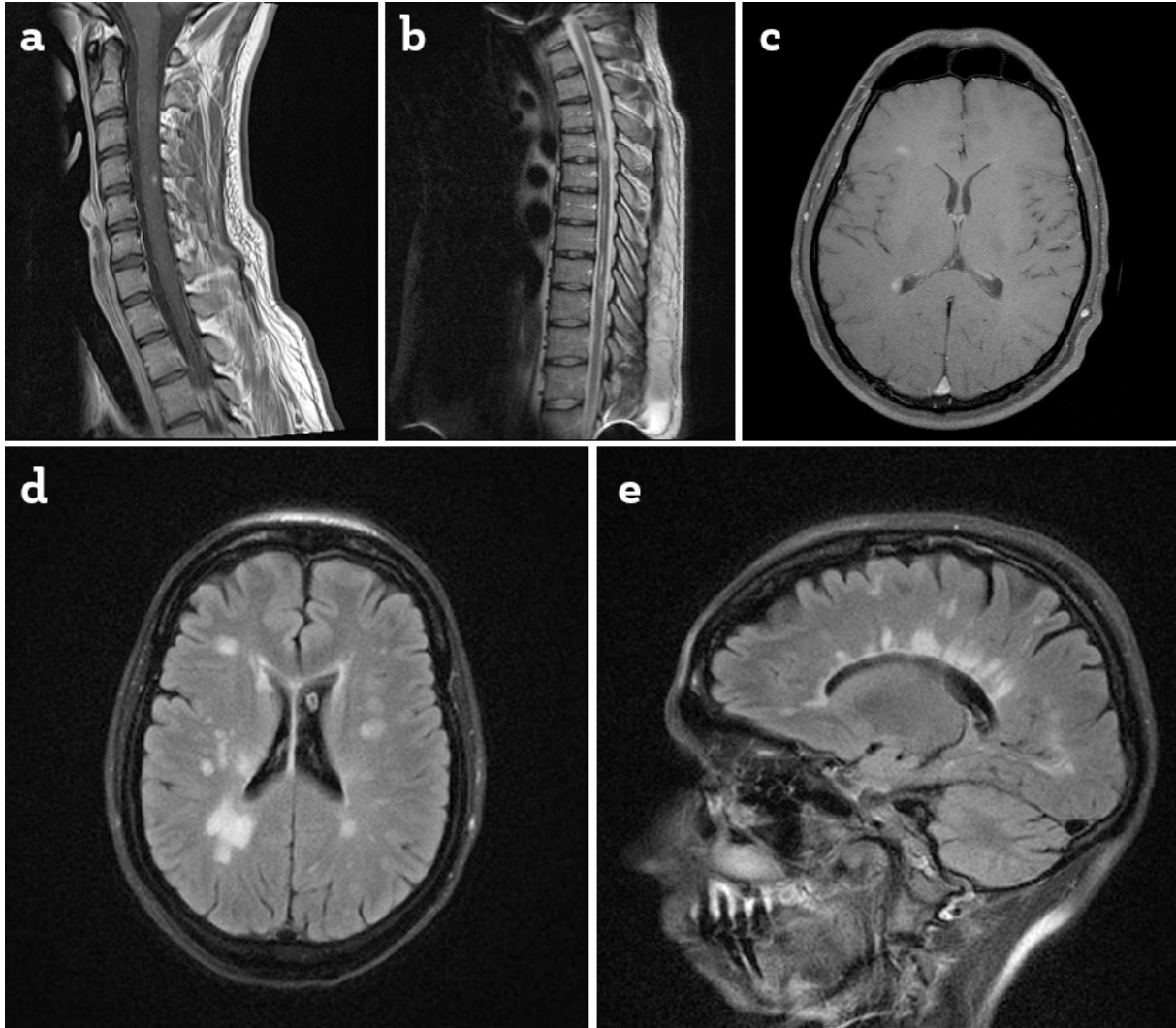
3.2.1.4. MRI središnjeg živčanog sustava

Svim ispitanicima (s RRMS-om i kontrolnoj skupini) je napravljen MRI središnjeg živčanog sustava, tjedan dana unutar uzimanja krvi na aparatu 1,5 Tesla (Siemens Somatom Essenza). Magnetnom rezonacijom se s pomoću elektromagnetnih valova niske energije oslikavaju mozak i kralježnična moždina. Oslikavanje je sigurno i nije štetno za bolesnika, primjenjuju se magnetni i radiovalovi. Dio tijela koje se snima stavlja se u područje jakog magnetnog polja. Kako je naše tijelo uglavnom građeno od vode koja sadržava veliku količinu vodikovih iona, pod utjecajem magnetnog polja, protoni u vodikovim atomima postavljaju se paralelno s magnetnim poljem. Tada se emitiraju pulsni radiovalovi koji prolaskom kroz naše tijelo pomiču protone u vodikovim atomima iz njihovog položaja. Prestankom odašiljanja radiovalova protoni se vraćaju u liniju paralelnu s magnetnim poljem i pri tome se odašilju signali koji se prihvaćaju tzv. radioprijamnikom i potom se kompjutorski pretvaraju u sliku. Tijekom pregleda bolesnik mora biti miran, jer svaki pomak tijekom snimanja remeti sliku i otežava interpretaciju dobivenih snimaka. Pretraga traje približno 45 minuta. Jakost signala ovisi o tkivu koje se ispituje, a to uključuje denzitet protona, kretanje, magnetnu primljivost i vremensku konstantu.

Ovisno o vremenskoj konstanti koja se primjenjuje slike se prikazuju u T1 ili T2 mjernim snimkama. Stupanj zacrnjenja kojim se prikazuju anatomske strukture u MR tomografskoj slici ovisi o tome je li snimanje birano prema T1 ili T2 osobitostima tkiva. U T1 mjernoj snimci signalima siromašna područja s dugim T1 vremenom prikazana su crno, a u T2 mjernoj snimci signalima bogata područja s dugim T2 vremenom prikazana su bijelo. T2 mjerne snimke pokazuju hiperintenzivno demijelinizacijska oštećenja. FLAIR (engl. *fluid attenuation inversion recovery*) je poseban postupak produljenja inverznog vremena (T1) koje rezultira gubitkom signala cerebrospinalnog likvora. Oštećenja se prikazuju izrazitije hiperintenzivno nego u uobičajenim T2 mjernim snimkama. Supratentorijske lezije se bolje vide na FLAIR sekvencama, a infratentorijske na T2 sekvencama.

U MR snimkama rabi se gadolinijски kontrast (Gd), a primjenjuje se intravenski. Lezije koje se imbibiraju kontrastom hiperintenzivne su u T1 mjernim snimkama. Alergijske reakcija na tu vrstu kontrasta su rijetkost, a ako i postoje one su blage ili su srednjeg stupnja (Brinar i sur., 2019.). Magnetska rezonanca je najosjetljivija paraklinička metoda u otkrivanju tipičnih lezija mozga i kralježnične moždine, a ujedno je korisna u isključivanju drugih bolesti. Snimke su napravljene u T1, T2 i FLAIR mjernim vremenima, u sagitalnim, koronarnim i transverzalnim presjecima. Neuroradiolog koji je zadužen za očitavanje je analizirao i izbrojio broj T1

hipointenzivnih, T2/FLAIR hiperintenzivnih i Gd + lezija u aksijalnim presjecima 3 mm duljine.



Slika 13. Prikaz MR-a mozga, vratne i torakalne kralježnice kod ispitanika s multiplom sklerozom. Demijelinizacijske lezije su prikazane u različitim mjernim vremenima: a) sagitalni T1 presjek kroz cervikalnu kralježnicu prikazuje demijelinizacijsku leziju u razini C4-C5 segmenta, b) sagitalni T2 presjek kroz torakalnu kralježnicu prikazuje multiple demijelinizacijske lezije, c) transverzalni T1 presjek prikazuje gadolinij imbibirajuću leziju, d) FLAIR transverzalni presjek prikazuje periventrikularne i jukstakortikalne demijelinizacijske lezije, e) FLAIR sagitalni presjek prikazuje Dawsonove prste (slike su preuzete iz Baze Infinit – Opće Bolnice Dubrovnik).

3.3. Serološke metode

Laboratorijski testovi provodili su se u Medicinsko biokemijskom laboratoriju Opće bolnice Dubrovnik i Zavodu za animalnu fiziologiju PMF-a Zagreb. Uzorci periferne venske krvi za određivanje BDNF-a, pro-BDNF-a, IL-6, te biljega oksidacijskog stresa (MDA, GSH, katalaze, karbonilirane proteine) prikupljeni su od svih ispitanika u jutarnji satima, u standardizirane epruvete za biokemijske pretrage/serum. Centrifugiranje uzoraka provodilo se nakon 30 minuta, u trajanju od 15 minuta na 1000xg. Prema uputi proizvođača kita za analizu BDNF-a, svim uzorcima je nakon centrifugiranja dodano 0,5 TIU aprotinina – enzimskog inhibitora, da bi se spriječila degradacija uzorka (Aprotinin, AVISCERA: 00700-01-25). Uzorci BDNF-a su pohranjeni na temperaturi od -20 °C, pro-BDNF-a na 2-8 °C, IL-6 i biljega oksidacijskog stresa na -70 °C sve prema uputi proizvođača kitova. Svi su uzorci transportirani u laboratorij Zavoda za animalnu fiziologiju PMF-a Zagreb na istoj temperaturi.

3.3.1. Biljezi neuropale u serumu

3.3.1.1. Serumske koncentracije BDNF-a

Serumske koncentracije BDNF-a određene su ELISA testom uporabom kita za istraživačke svrhe tvrtke AVISCERA BIOSCIENCE, USA, Catalog No. SK00752-01.

Svi reagensi bili su na sobnoj temperaturi prije upotrebe. Prema uputama proizvođača napravljeni su slijedeći postupci:.

1. Priprema standarda - rekonstituiran je BDNF standard s 1 mL pufera za razrjeđivanje, te je na taj način napravljena standardna otopina od 1500 pg/mL. Ostavljena je da odstoji 15 minuta, uz lagano miješanje prije pravljenja razrijeđenja. Pipetirano je 250 µL pufera za razrjeđivanje iz 0. u 1., iz 1. u 2. te tako do 7. epruvete, te su napravljena razrijeđenja prema uputi. Pufer za razrjeđivanje je nulti standard (0 pg/mL). Priprema 126 uzoraka (uzorci ljudskog seruma u razrijeđenjima od 40-160).
2. Otopina od 500 mL pufera za ispiranje je dobivena razrijeđivanjem 50 mL pufera za ispiranje s 450 mL destilirane vode.
3. Priprema reagensa na sobnoj temperaturi. Pripremljen je koncentrat otopine detekcijskog antitijela s 1,2 mL pufera za razrjeđivanje. Pipetira se 9,45 mL pufera za razrjeđivanje u tubu za centrifugu od 15 mL i prenese 1,05 mL pripremljene otopine detekcijskog protutijela, te se pripremi radna otopina.

4. Radna otopina streptavidin-HRP konjugata je dobivena pipetiranjem 11,88 mL HRP otopine za razrjeđivanje (DB08C) u 15 mL tubu za centrifugu i dodavanjem 120 μ L Streptavidin HRP konjugata. Zaštićena je od sunca, te ovako pripremljena po uputi je upotrijebljena u roku od dva sata.

Prema ELISA protokolu slijepa proba, standardna otopina, pozitivne kontrole i uzorci su izmjereni u duplikatu.

1. Dodano je 100 μ L standardne otopine, uzoraka i pozitivne kontrole u jažice, te se je inkubiralo na sobnoj temperaturi tijekom dva sata, nakon čega je uslijedilo aspiriranje i ispiranje 4 puta.
2. Dodano je 100 μ L radne otopine za otkrivanje antitijela u svaku jažicu, inkubirano na sobnoj temperaturi dva sata, te je aspirirano i isprano 4 puta.
3. Dodano je 100 μ L radne otopine konjugata streptavidina HRP u svaku jažicu, te je inkubirano 60 minuta na sobnoj temperaturi uz zaštitu od svjetla, nakon čega je aspirirano i isprano 4 puta.
4. Dodano je 100 μ L otopine supstrata u svaku jažicu, potom inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi uz zaštitu od svjetla.
5. Dodano je 100 μ L stop otopine u svaku jažicu, te očitano na 450 nm čitaču u roku od 3 minute.

3.3.1.2. Serumske koncentracije pro-BDNF-a

Serumske koncentracije proBDNF-a su određene ELISA metodom uporabom kita za istraživačke svrhe tvrtke Nordic BioSite, Sweden, Catalog No. EKX-FT77TY-96.

Svi reagensi bili su na sobnoj temperaturi prije upotrebe. Prema uputama proizvoača napravljeni su slijedeći postupci:

1. Priprema standarda – 1 mL pufera za razrjeđivanje standarda je dodano u jednu standardnu tubu (nulta) i nakon 10 minuta stajanja na sobnoj temperaturi promiješano. Označeno je 7 tuba sa $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$ i na kraju jedna prazna. Dodano je 0,3 mL pufera za razrjeđivanje uzoraka u 1-7 tubu. U prvu je dodano 0,3 mL standardne otopine iz nulte tube i promiješano. U drugu je dodano 0,3 mL iz prve tube i promiješano, te tako sve do sedme tube. 126 uzoraka je razrijeđeno s puferom za razrjeđivanje i promiješano.

2. Pufer za ispiranje je zagrijan u vodenoj kupki od 40 °C zbog pojave kristala. Ohlađen je na sobnoj temperaturi. Razrijeđeno je 30 mL koncentriranog pufera za ispiranje u 750 mL pufera za pranje s destiliranom vodom. Neupotrijebljena tekućina je pohranjena na 4 °C.
3. Radna otopina antitijela obilježenih biotinom je pripravljena jedan sat prije izvođenja eksperimenta. Izračunat je totalni željeni volumen radne otopine: 0,1 mL/jažici x količina jažica. Antitijela obilježena biotinom su razrijeđena s puferom za razrjeđivanje protutijela 1:100 i dobro promiješana.
4. Radna otopina konjugata streptavidina HRP (SABC) je pripravljena 30 minuta prije izvođenja eksperimenta. Izračunat je totalni volumen radne otopine; 0,1 mL/jažici x količina jažica, te je razrijeđen SABC sa SABC puferom za razrjeđivanje u omjeru 1:100 i dobro promiješano.

Prema ELISA protokolu za pro-BDNF slijepa proba, standardna otopina, pozitivne kontrole i uzorci se rade u duplikatu. Svi uzorci i reagensi su nakon pripreme dobro promiješani. Prije dodavanja TMB-a u jažice, substrat TMB-a treba biti 30 minuta na 37 °C. Podloga treba biti isprana dva puta prije dodavanja standarda, uzoraka i kontrola (blank). ELISA postupak je slijedeći:

1. Dodano je 100 µL standardne otopine, 126 uzoraka i pozitivnih kontrola u jažice, te inkubirano 90 minuta na 37 °C. Isprano je dva puta s puferom za ispiranje, te nije dopušteno da se jažice isušaju.
2. Dodano je 100 µL radne otopine antitijela obilježenih biotinom u svaku jažicu i inkubirano 60 minuta na 37 °C. Potom je isprano tri puta s puferom za ispiranje, te svaki put ostavljeno da odstoji u jažici 1-2 minute.
3. Dodano je 100 µL radne otopine konjugata streptavidina HRP u svaku jažicu, te je inkubirano tijekom 30 minuta na 37 °C. Isprano je pet puta s puferom za ispiranje i ostavljeno da svaki put odstoji u jažici 1-2 minute.
4. Dodano je 90 µL TMB otopine supstrata u svaku jažicu, poklopljeno i inkubirano u mraku na 37 °C tijekom 10-20 minuta.
5. Dodano je 50 µL otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu, te se je boja promijenila u žutu. Očitane su adsorbance na spektrofotometru 450 nm mikroplate čitaču odmah nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije.

3.3.1.3. Serumske koncentracije IL-6

Serumske koncentracije IL-6 su određene ELISA metodom uporabom kita za *in vitro* dijagnostičku upotrebu tvrtke Diaclone, France, Catalog No. 950.030.192.

Svi reagensi bili su na sobnoj temperaturi prije upotrebe. Prema uputama proizvođača napravljeni su sljedeći postupci:

1. Pripremljeno je 126 uzoraka, nulti i standard, sve u duplikatu, te je zatvoreno i vraćeno na 2-8 °C.
2. Otopina pufera za ispiranje je pripremljena na način da je koncentrat pufera za ispiranje razrijeđen 200 puta s destiliranom vodom, te je dobivena radna otopina. Čitavi sadržaj koncentrata pufera za ispiranje je izliven u čisti 2000 mL baždarni cilindar, te je dodana destilirana voda i nježno je promješano da se ne stvara pjena. Otopina je prelivena u čisto opranu bocu i pohranjena na 2-25 °C.
3. Pripremljen je pufer za razrjeđivanje standarda tako što je sadržaj koncentriranog pufera za razrjeđivanje (25 mL) razrijeđen deset puta destiliranom vodom (225 mL). Ova otopina je postojana do tjedan dana na 2-8 °C.
4. Priprema standarda – standardne epruvete su rekonstituirane s volumenom standardnog pufera za razrjeđivanje, te je napravljena otopina od 200 pg/mL IL-6 i promiješana inverzijom. Serijska razrjeđenja standarda su napravljena direktno na ploči za ispitivanje u rangu koncentracija od 200 do 6,25 pg/mL. 200 µL rekonstituiranog standarda je dodano u jažice A1 i A2 u kojima je najveća koncentracija standarda 200 pg/mL. Dodano je 100 µL standardnog seruma za razrjeđivanje u preostale jažice B1, B2 sve do F1, F2. Prebačeno je 100 µL iz A1 i A2 u B1 i B2, te je sadržaj promiješan ponavljanim aspiracijama i ekcijama pazeći da se ne ošteti unutrašnji zid. Nastavljena su razrjeđenja 1:1 uzimajući 100 µL iz jažica B1 i B2 do F1 i F2 stvarajući serijsko razrjeđenje u rangu od 200 pg/mL do 6,25 pg/mL. Iz zadnje jažice F1 i F2 je odbačeno 100 µL. Kontrole su pripremljene sa serumom uz dodatak pufera za razrjeđenje standarda.
5. Otopina antitijela obilježenih biotinom za otkrivanje IL-6 je pripremljena neposredno prije upotrebe, razrijeđeno je 240 µg protutijela obilježenih biotinom za otkrivanje IL-6 sa 6360 µL rotopine za razrjeđivanje biotiniziranih antitijela u staklenoj epruveti.
6. Bočica streptavidin-HRP je prvo centrifugirana na par sekundi u mikrocentrifugi da bi se volumen spustio na dno. Nakon toga je razrijeđeno 5 µL iz bočice sa 0,5 mL

streptavidin HRP razrjeđivača neposredno prije upotrebe. Za 96 jažica je potrebno 150 μL streptavidin-HRP-a i 10 mL streptavidin-HRP razrjeđivača.

Prema ELISA protokolu za IL-6 slijepa proba, standardna otopina, pozitivne kontrole i uzorci su napravljeni u duplikatu. Svi uzorci i reagensi su nakon pripreme dobro promiješani, bez pjene.

1. Pripremljeni su standardi, 126 uzoraka i kontrole. Dodano je 100 μL uzorka ili standardne otopine ili pozitivne kontrole u pripadajuće jažice.
2. Dodano je 50 μL razrijeđenog biotiniziranog anti-IL-6 u jažice, pokriveno plastičnim poklopcem i inkubirano na sobnoj temperaturi od 18-25 °C tijekom jednog sata. Nakon toga je odstranjen plastični poklopac, aspirirana je tekućina iz svake jažice, dodano 0,3 mL pufera za ispiranje u svaku jažicu, te je aspiriran sadržaj iz svake jažice. Postupak dodavanja 0,3 mL pufera za ispiranje i aspiriranja sadržaja se je ponovio još dva puta.
3. Dodano je 100 μL razrijeđene otopine streptavidin-HRP u svaku jažicu, pokriveno plastičnim poklopcem i inkubirano na sobnoj temperaturi od 18-25 °C tijekom 30 minuta. Nakon toga je odstranjen plastični poklopac, aspirirana je tekućina iz svake jažice, dodano 0,3 mL pufera za ispiranje u svaku jažicu, te je aspiriran sadržaj iz svake jažice. Postupak dodavanja 0,3 mL pufera za ispiranje i aspiriranja sadržaja se je ponovio još dva puta.
4. Dodano je 100 μL TMB otopine supstrata spremne za upotrebu, uz zaštitu od svjetla zamotavanjem u aluminijsku foliju i inkubirano u mraku na sobnoj temperaturi 12-15 minuta.
5. Dodano je 100 μL H_2SO_4 otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu. Odmah su očitane adsorbance vrijednosti za svaku jažicu na spektrofotometru koristeći 450 nm kao primarnu valnu duljinu.

3.3.2. Biljezi oksidacijskog stresa

Koncentracije biljega oksidacijskog stresa: malondialdehida (MDA), glutationa (GSH), katalaza (CAT) i karboniliranih proteina su određene spektrofotometrijski standardiziranim metodama u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta.

3.3.2.1. Mjerenje lipidne peroksidacije (MDA)

Lipidna peroksidacija određena je modificiranom metodom opisanom u Balta i sur. (2018.). Metoda se temelji na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA) koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Reakcijom malondialdehida i tiobarbituratne kiseline stvara se kromogen ružičaste boje koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.

U eppendorf epruveti pomiješano je 200 μL nerazrijeđenog supernatanta seruma s 100 μL 8,1%-tne vodene otopine SDS-a, 750 μL 20%-tne vodene otopine octene kiseline ($\text{pH} = 3,5$) i 750 μL 0,8%-tne vodene otopine tiobarbituratne kiseline. Smjesa je zagrijavana 60 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 95 $^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije smjesa je naglo ohlađena na ledu, a potom centrifugirana 15 minuta na 5000 rpm pri +4 $^{\circ}\text{C}$. Odvojenom supernatantu izmjerena je apsorbancija pri $\lambda = 532 \text{ nm}$ i 600 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo). Ukupna apsorbancija određuje se prema formuli $A = A_{532 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}$.

Koncentracija MDA izračunata je prema formuli:
$$c(\text{MDA}) = \frac{A \cdot V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL})}{\varepsilon \cdot V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})}$$

gdje ε iznosi $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a duljina kivete l iznosi 1 cm. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao nmol MDA/mL seruma.

3.3.2.2. Mjerenje aktivnosti ukupnog glutationa (GSH)

Koncentracija ukupnog glutationa u uzorcima seruma određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze 1969 god. Postupak određivanja koncentracije ukupnog GSH se temelji na kemijskoj reakciji tiolnog reagensa 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) i GSH pri čemu dolazi do nastanka kromofora 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (NTB) i male količine glutation disulfida (GSSG). NTB je žuto obojeni produkt koji se mjeri na Plate Reader-u pri $\lambda = 412 \text{ nm}$, a na temelju čega indirektno dobivamo podatak o koncentraciji GSH (Eyer i sur., 2003.).

Priprema otopina:

Otopina A: 10 mM DTNB (20 mg DNTB-a otopljeno u 5 mL 0,5 M fosfatnog pufera koji sadržava 0,5 M EDTA-e). Reakcijska smjesa B: 20 μL enzima glutation reduktaze i 9980 μL

0,8 mM NADPH (6,67 mg NADPH otopljeno je u 10 mL 0,5 M fosfatnog pufera koji sadržava 0,5 M EDTA-e).

U jednu jažicu mikrotitarske pločice dodano je 20 μL razrijeđenog uzorka, 40 μL 0,035 M HCl-a i 40 μL otopine A. Nakon inkubacije od 10 minuta pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija (prvo mjerenje, DTNB). Nakon prvog mjerenja dodano je 100 μL reakcijske smjese B, te je mjerena apsorbancija 5 minuta u pravilnim vremenskim razmacima. Promjena apsorbancije izračunata je prema formuli: $\Delta A = A_{\text{bez enzima}} - A_{\text{s enzimom}}$. Ukupna koncentracija

$$c(\text{GSH}) = \frac{\Delta A_{\text{uzorak}} \cdot V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL})}{\varepsilon \cdot V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})} \cdot d$$

gdje $\varepsilon(\text{DTNB})$ iznosi $8,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a duljina kivete l iznosi 0,6 cm. d predstavlja faktor razrjeđenja uzorka. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u uzorcima seruma izražena je kao mU/mL seruma.

3.3.2.3. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Katalazna aktivnost u supernatantu seruma određena je spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984). U kiveti je pomiješano 20 μL fosfatnog pufera i 980 μL 10 mM H_2O_2 , što predstavlja slijepu probu. U sljedećoj kiveti je pomiješano 20 μL razrijeđenog uzorka seruma i 980 μL 10 mM H_2O_2 , čime započinje enzimski reakcija. Svaki uzorak termostatiran je na 25 $^{\circ}\text{C}$. Aktivnost enzima mjerena je jednu minutu pri valnoj duljini $\lambda = 240 \text{ nm}$. Pad u apsorbanciji u jedinici vremena je mjera katalazne aktivnosti, pri čemu je jedinica katalazne aktivnosti definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1 μmol H_2O_2 u minuti kod $\text{pH} = 7,0$ pri 25 $^{\circ}\text{C}$ gdje koncentracija H_2O_2 pada od 10,3 do 9,2 mM. Koncentracija katalaze izračunata je prema

$$c(\text{KAT}) = \frac{A \cdot V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL})}{\varepsilon \cdot V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})} \cdot d$$

gdje $\varepsilon(\text{H}_2\text{O}_2)$ iznosi $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a duljina kivete l iznosi 1 cm. d predstavlja faktor razrjeđenja uzorka. Aktivnost CAT-a u uzorcima seruma izražena je u μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina (μmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ mg proteina), što odgovara jedinicama CAT-a po mL seruma (U/mL).

3.3.2.4. Mjerenje karboniliranih proteina (PC)

Za utvrđivanje količine oštećenja proteina korištena je metoda po Levine i sur. (1994), a određuje se kao sadržaj karbonilnih skupina u proteinskom uzorku. Karbonilne skupine proteinskog lanca reagiraju s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) otopljenim u HCl-u te daju 2,4-dinitrofenilhidrazon.

Volumenu od 200 μL homogenata uzorka seruma dodano je 300 μL 10 mM DNPH u 2M HCl. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani pri sobnoj temperaturi tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Proteini su precipitirani s 10% (w/v) trikloroocetnom kiselinom (TCA) na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 5 minuta te nakon toga centrifugirani na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri 12000 g 10 minuta. Supernatant je uklonjen, a precipitat resuspendiran u mješavini etanola i etil acetata u omjeru 1:1 i centrifugiran pri istim uvjetima. Postupak ispiranja peleta je ponovljen sve dok se sav nevezani DNPH nije isprao. Nakon toga je precipitat otopljen u 6 M guanidin HCl u kupeljina $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobivena otopina je korištena za mjerenje apsorbancije pri $\lambda = 370\text{ nm}$. Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je izračunata korištenjem molarnog ekstincijskog koeficijenta prema formuli:

$$c(\text{PC}) = \frac{A_{\text{uzorak}}}{\varepsilon \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})}$$

gdje ε iznosi $0,022\text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, a duljina kivete l iznosi 1 cm. Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je prikazana kao omjer količine karbonila i koncentracije proteina, te je izražena kao nmol/mL seruma.

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka se provodila pomoću SPSS statističkog programa. U analizi podataka primijenjena je kvantitativna analitička paradigma. Rezultati kvantitativne analize podataka interpretirani su na najmanje 5%-tnoj razini značajnosti, a analizirani su uz pomoć programske podrške STATISTIKA 11. StatSoft. Inc. Distribucija kvalitativnih podataka je prikazana tablicama kontingencije, a podaci analizirani χ^2 testom ili po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Distribucije kvantitativnih izmjera (svojstava) je testirana na normalnost Smirnov-Kolmogorovljevim testom te su primijenjeni statističko-analitički postupci (Studentov T test, Mann-Whitney U test, ANOVA, Kruskal Wallis ANOVA test). U analizi podataka su se koristili korelacijski i regresijski modeli s obzirom na distribuciju podataka (Spearmanova korelacija).

4. REZULTATI

4.1. Kognitivni parametri i parametri oštećenja SŽS

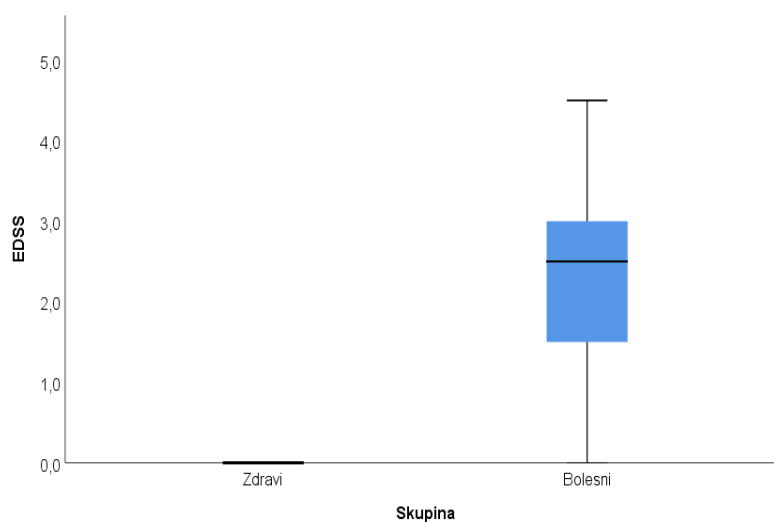
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima. Usporedbom neurološke onesposobljenosti prikazane EDSS skalom ispitanika s RRMS i zdravih kontrola je očekivano dobivena statistički značajna razlika ($P < 0,001$), jer su oboljeli imali veći stupanj neurološke onesposobljenosti (Tablica 5.)

Tablica 5. Usporedba ispitanika po testu EDSS

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			P*
						25.	Medijan	75.	
EDSS	Zdravi	66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,001
	Bolesni	60	2,32	1,12	0,00	4,50	1,50	2,50	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

Rezultati pokazuju statistički značajno više vrijednosti EDSS-a kod ispitanika s RRMS-om ($P < 0,001$) u odnosu na zdrave ispitanike, jer imaju određeni stupanj neurološkog deficita (Slika 14.).



Slika 14. Rezultati ispitivanja EDSS-a između zdravih i ispitanika s RRMS-om.

Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima. Kognitivne funkcije

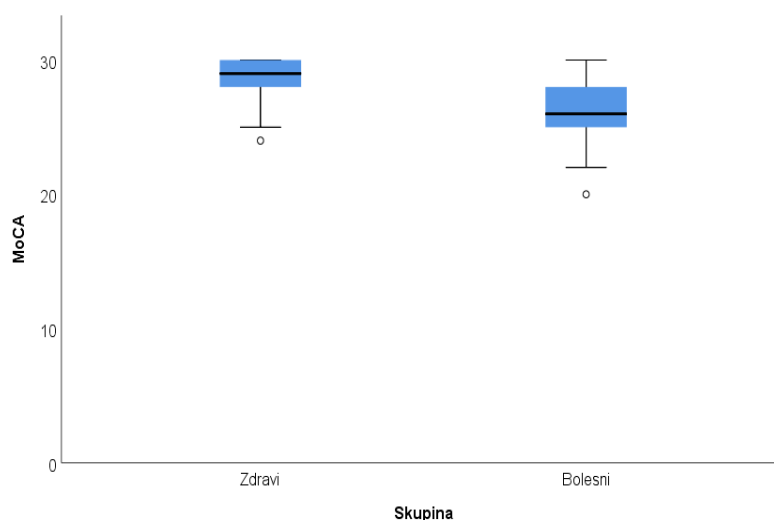
ispitane MoCA testom su se statistički značajno razlikovale ($P < 0,001$) između ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine, jer ispitanici s RRMS-om imaju kognitivna odstupanja i manje vrijednosti na MoCA testu (Tablica 6.)

Tablica 6. Usporedba ispitanika po testu MoCA

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			P*	
						25.	Medijan	75.		
MoCA	Zdravi	66	28,91	1,33	24,00	30,00	28,00	29,00	30,00	<0,001
	Bolesni	60	26,15	2,37	20,00	30,00	25,00	26,00	28,00	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

Statistička značajnost ($P < 0,001$) postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine. Zdravi ispitanici su imali više bodova što znači bolji rezultat na MoCA testu (Slika 15.).



Slika 15. Rezultati ispitivanja kognitivnih funkcija MoCA testom.

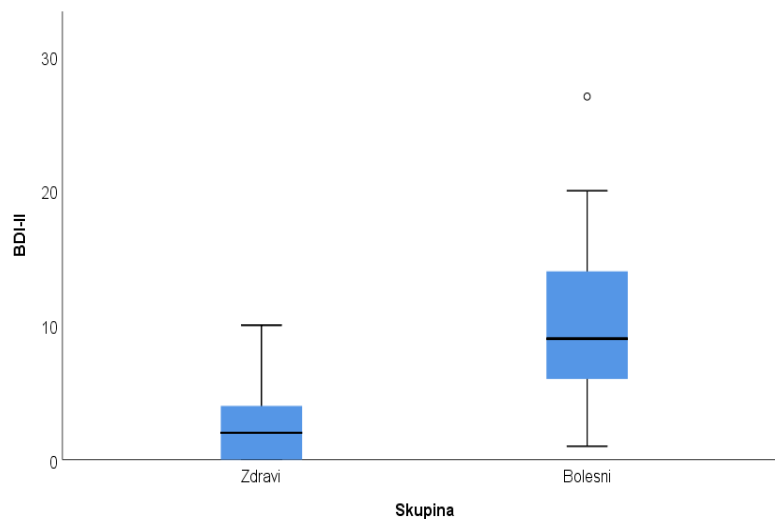
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima. BDI-II test kojim je ispitan razvoj depresije kod ispitanika s RRMS-om i zdravih kontrola je pokazao statistički značajnu razliku ($P < 0,001$), jer ispitanici s RRMS-om razvijaju depresiju i imaju više bodova na BDI-II testu (Tablica 7.)

Tablica 7. Usporedba ispitanika po testovima BDI-II

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			P*	
						25.	Medijan	75.		
BDI-II	Zdravi	66	2,29	2,15	0,00	10,00	0,00	2,00	4,00	<0,001
	Bolesni	60	10,22	4,95	1,00	27,00	6,00	9,00	14,00	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P<0,05$.

Statistička značajnost ($P<0,001$) postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine. BDI-II test je pokazao veće vrijednosti u ispitanika s MS-om u odnosu na zdrave, što ukazuje na razvoj depresije (Slika 16.).



Slika 16. Rezultati ispitivanja stupnja depresije BDI-II testom.

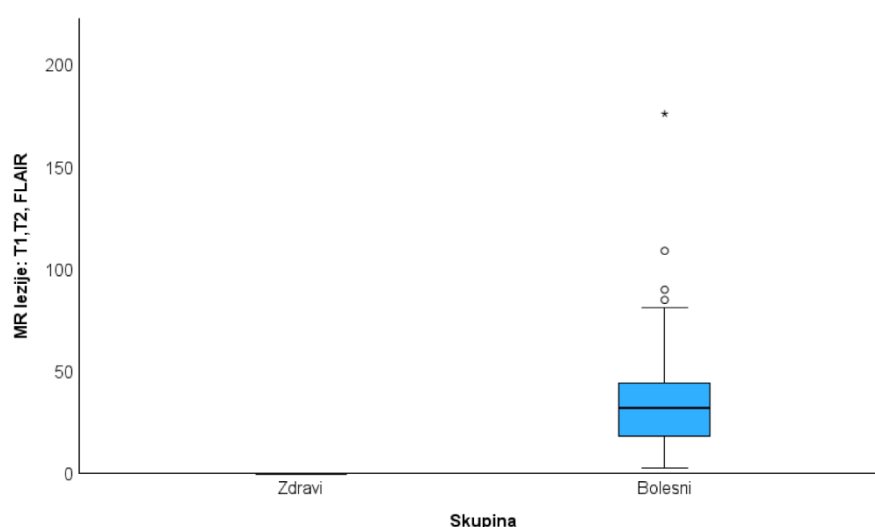
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima. Broj MR lezija; T1,T2 i FLAIR je veći kod oboljelih od RRMS u usporedbi sa zdravima, razlika je statistički značajna ($P<0,001$), jer ispitanici s RRMS-om imaju demijelinizacijske lezije od odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (Tablica 8.)

Tablica 8. Usporedba ispitanika po MR lezijama T1, T2, FLAIR

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			P*
						25.	Medijan	75.	
MR lezije: T1,T2, FLAIR	Zdravi	66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,001
	Bolesni	60	37,42	29,76	3,00	176,00	18,25	32,00	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P<0,05$.

Statistička značajnost ($P<0,001$) postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine (Slika 17.)

**Slika 17.** Rezultati ispitivanja broja MR lezija u sekvencama T1,T2, FLAIR.

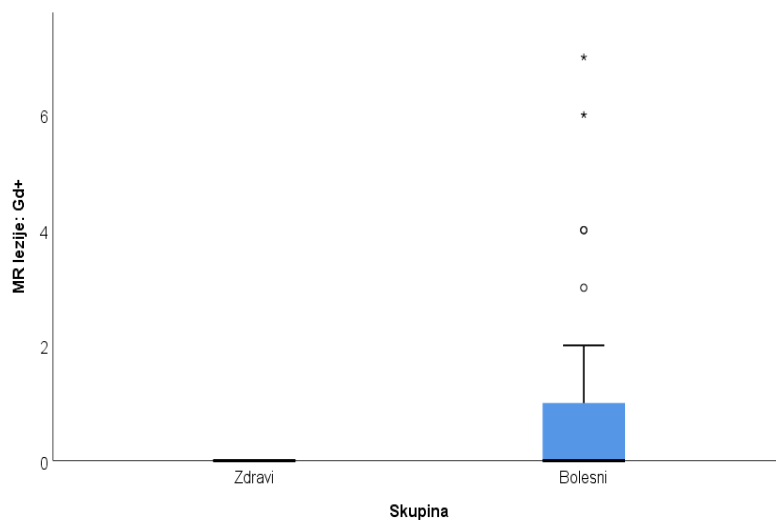
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima. Broj gadolinij imbibirajućih lezija kod ispitanika s RRMS-om i zdravih kontrola je pokazao statistički značajnu razliku ($P<0,001$), jer ispitanici s RRMS-om imaju veći broj lezija koje se imbibiraju gadolinijem u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 9.).

Tablica 9. Usporedba ispitanika po MR lezijama Gd+

Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile			P*
						25.	Medijan	75.	
MR lezije: Gd+	Zdravi	66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,001
	Bolesni	60	0,63	1,44	0,00	7,00	0,00	0,00	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P<0,05$.

Statistična značajnost ($P < 0,001$) postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine. Znatno više MR Gd+ imbibirajućih lezija je bilo kod ispitanika s MS-om u odnosu na zdrave (Slika 18.).



Slika 18. Rezultati ispitivanja MR Gd+ imbibirajućih lezija.

4.2. Molekularni biljezi neuropale u serumu

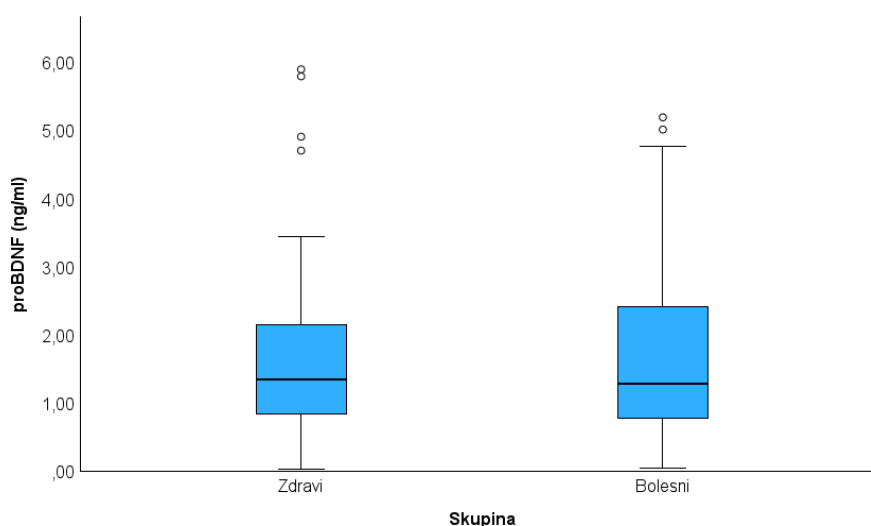
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima. Transkripcijski faktor proBDNF nije pokazao statistički značajno odstupanje ispitanika s MS-om u odnosu na zdrave (Tablica 10.).

Tablica 10. Rezultati ispitivanja proBDNF-a

Skupina	N	Medijan	Min	Max	Centile		<i>P</i> *	
					25.	75.		
proBDNF (ng/mL)	Zdravi	61	1,36	0,04	5,90	0,83	2,23	0,974
	Bolesni	44	1,29	0,05	5,20	0,78	2,44	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

U ovom istraživanju nema statističke značajnosti ($P > 0,05$) između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine (Slika 19.).



Slika 19. Vrijednosti proBDNF-a kod ispitanika s MS-om u odnosu na zdrave.

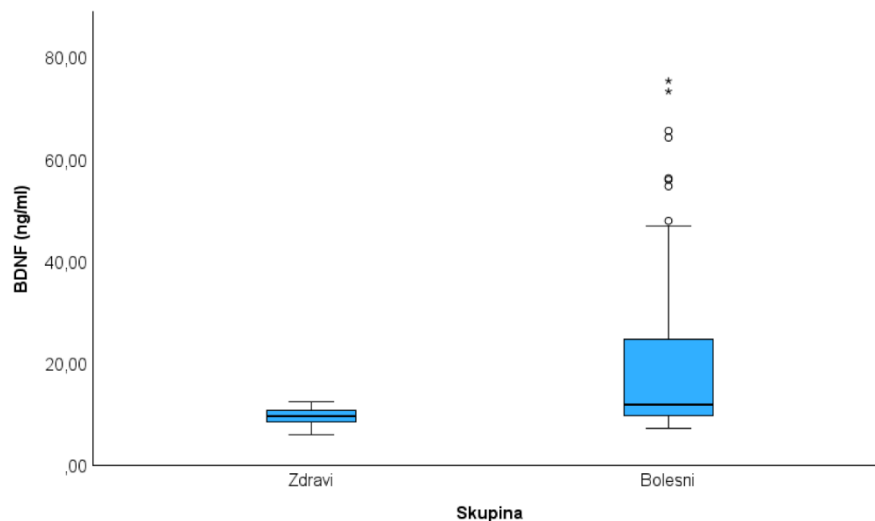
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike sam dodatno prikazao Box i Whiskerovim plotovima. U serumu zdravih i ispitanika s MS-om, BDNF je pokazao statistički značajnu razliku ($P<0,001$). Više vrijednosti BDNF-a su bile kod ispitanika s RRMS-om (Tablica 11.) što je obrazloženo u raspravi.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja BDNF-a

Skupina	N	Medijan	Min	Max	Centile		P^*	
					25.	75.		
BDNF (ng/mL)	Zdravi	66	9,84	6,13	12,58	8,55	10,91	<0,001
	Bolesni	60	12,02	7,44	75,44	9,77	24,89	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P<0,05$.

Statistička značajnost ($P<0,001$) postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine (Slika 20.).



Slika 20. Rezultati ispitivanja koncentracije BDNF-a u serumu ispitanika s RRMS-om i zdravih ispitanika.

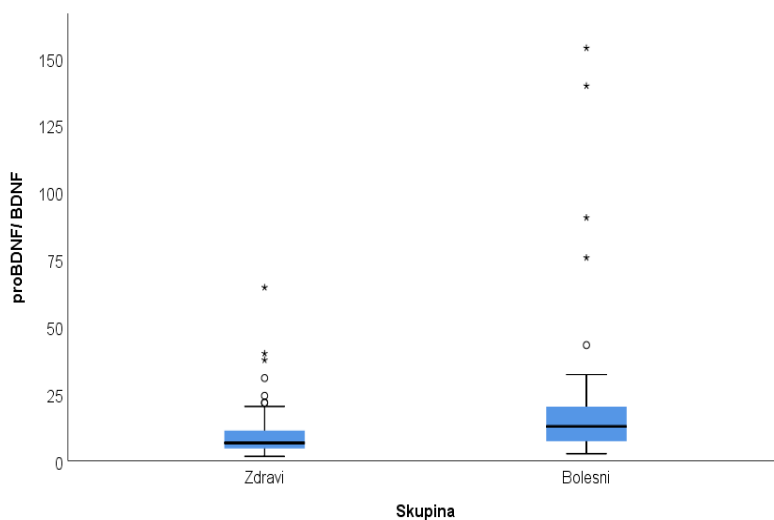
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima. Omjer proBDNF-a i BDNF-a kod zdravih i ispitanika s MS-om (Tablica 12.), je pokazao statistički značajnu razliku ($P<0,001$).

Tablica 12. Rezultati ispitivanja proBDNF/BDNF

Skupina	N	Medijan	Min	Max	Centile		<i>P</i> *	
					25.	75.		
proBDNF/ BDNF	Zdravi	60	6,65	1,65	64,57	4,59	11,78	<0,001
	Bolesni	43	12,82	2,63	153,74	7,12	21,47	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

Statistička značajnost ($P < 0,001$) postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine (Slika 21.).



Slika 21. Omjer proBDNF/BDNF kod ispitanika s RRMS-om i zdravih.

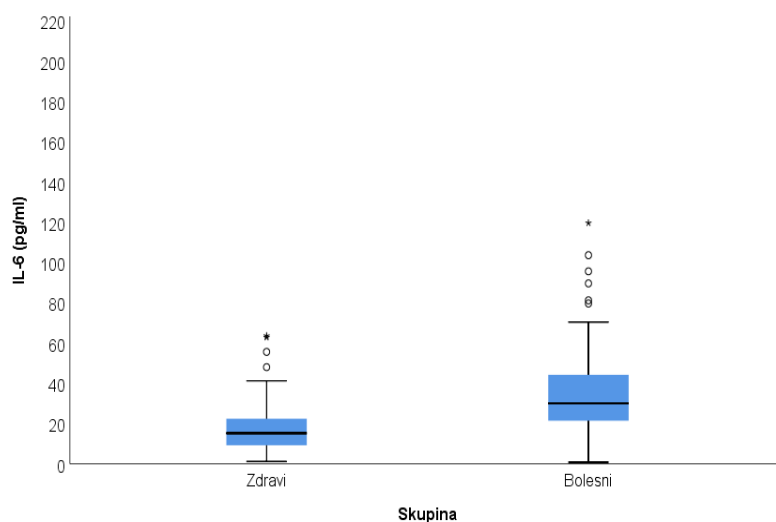
Proupalni interleukin IL-6 je pokazao statistički značajnu razliku u serumu zdravih i ispitanika s MS-om (Tablica 13.) Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima.

Tablica 13. Rezultati ispitivanja IL-6

Skupina	N	Medijan	Min	Max	Centile		<i>P</i> *	
					25.	75.		
IL-6 (pg/mL)	Zdravi	63	15,20	1,20	63,60	8,80	22,80	<0,001
	Bolesni	60	30,00	0,80	304,00	21,30	46,10	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

Statistička značajnost ($P < 0,001$) postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine (Slika 22.).



Slika 22. Koncentracije IL-6 kod ispitanika s MS-om i zdravih kontrola.

4.3. Biološki biljezi antioskidacijske obrane u serumu

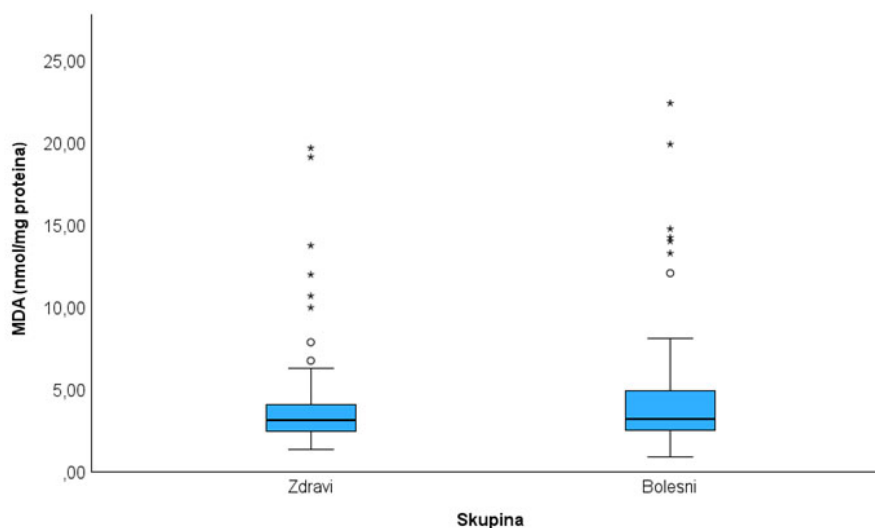
U ovom istraživanju MDA nije pokazao statistički značajnu razliku između ispitanika s RRMS i zdravih kontrola (Tablica 14.) Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike su dodatno prikazane Box i Whiskerovim plotovima.

Tablica 14. Rezultati ispitivanja malondialdehida (MDA)

Skupina	N	Medijan	SD	Min	Max	Centile		<i>P</i> *	
						25.	75.		
MDA (nmol/mg proteina)	Zdravi	66	3,16	3,58	1,36	19,72	2,49	4,17	0,636
	Bolesni	60	3,25	4,46	0,91	22,43	2,52	4,95	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

Statistička značajnost ($P > 0,05$) ne postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine (Slika 23.).



Slika 23. Koncentracija malondialdehida u zdravih i ispitanika s RRMS-om.

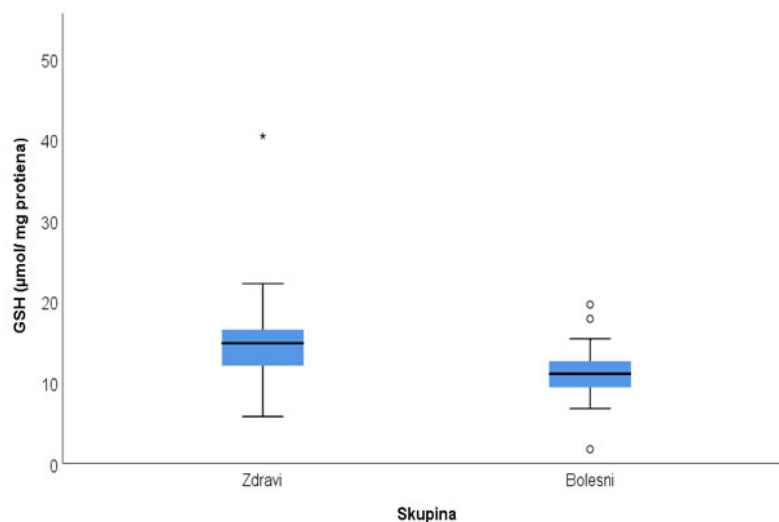
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike sam dodatno prikazao Box i Whiskerovim plotovima. U skupini bolesnih imamo značajno niže vrijednosti GSH (Tablica 15.).

Tablica 15. Rezultati ispitivanja glutaciona (GSH)

Skupina	N	Medijan	SD	Min	Max	Centile		<i>P</i> *	
						25.	75.		
GSH (μmol/mg protiena)	Zdravi	66	14,83	26,56	5,77	227,64	12,04	16,60	<0,001
	Bolesni	60	11,06	2,83	1,74	19,61	9,30	12,79	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

Analizom podataka zapaženo je statistički značajno ($P < 0,001$) smanjenje koncentracije GSH u skupini ispitanika s RRMS-om u odnosu na zdrave kontrole (Slika 24.).



Slika 24. Rezultati ispitivanja glutaciona (GSH) kod zdravih i ispitanika s RRMS-om.

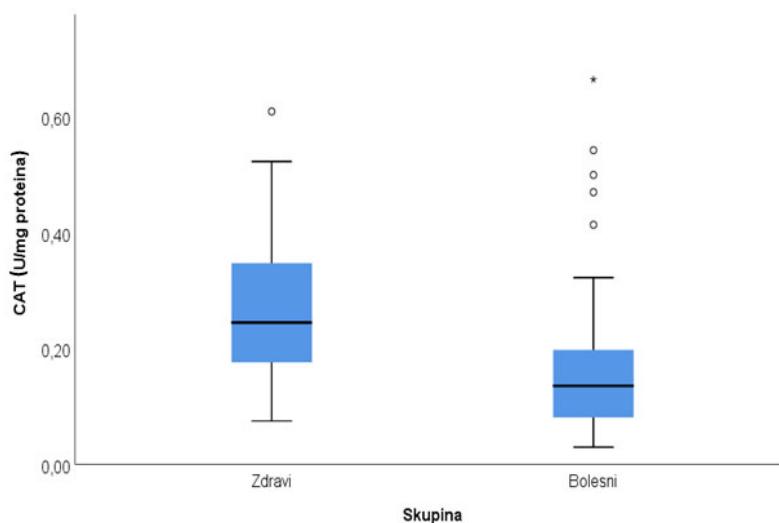
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike sam dodatno prikazao Box i Whiskerovim plotovima. U skupini bolesnih imamo značajno niže vrijednosti CAT (Tablica 16.)

Tablica 16. Rezultati ispitivanja katalaze (CAT)

Skupina	N	Medijan	SD	Min	Max	Centile		<i>P</i> *	
						25.	75.		
CAT (U/mg proteina)	Zdravi	66	0,25	0,12	0,07	0,61	0,18	0,35	<0,001
	Bolesni	60	0,14	0,13	0,03	0,67	0,08	0,20	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

Statistička značajnost ($P < 0,001$) postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine (Slika 25.).



Slika 25. Rezultati ispitivanja katalaze (CAT).

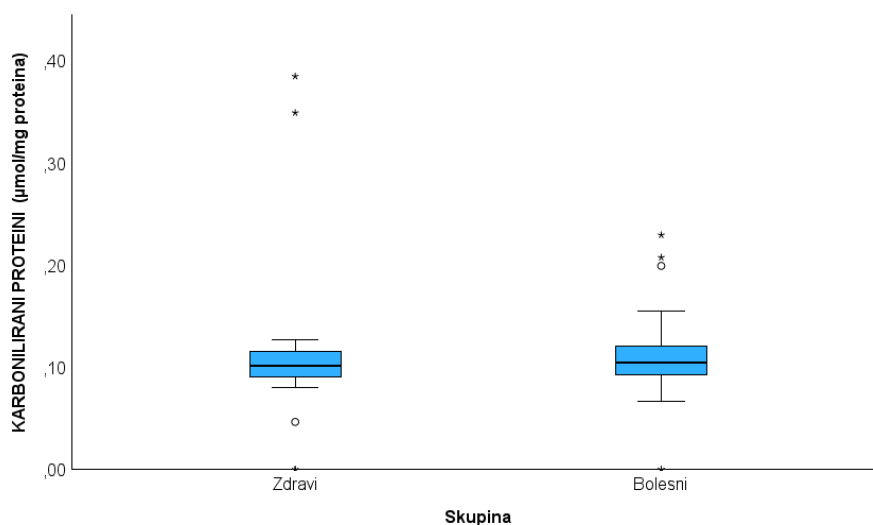
Uspoređene su kvantitativne vrijednosti između skupine zdravih i bolesnih - obzirom na raspodjelu korišten je Mann-Whitney U test, a značajne razlike su prikazane crvenom bojom. Sve značajne razlike sam dodatno prikazao Box i Whiskerovim plotovima. U ispitivanju karboniliranih proteina nije dokazana statistički značajna razlika između ispitivanih skupina (Tablica 17.).

Tablica 17. Rezultati ispitivanja karboniliranih proteina

Skupina	N	Medijan	SD	Min	Max	Centile		<i>P</i> *
						25.	75.	
KARBONILIRANI PROTEINI ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteina)	Zdravi 66	0,10	0,05	0,00	0,38	0,09	0,12	0,404
	Bolesni 60	0,10	0,04	0,00	0,23	0,09	0,12	

*Statistički značajna razlika između skupina postavljena je na razinu $P < 0,05$.

Statistička značajnost ($P > 0,05$) ne postoji između ispitivanih skupina ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine (Slika 26.).



Slika 26. Rezultati ispitivanja karboniliranih proteina u serumu zdravih i ispitanika s RRMS-om.

4.4. Korelacije između parametara kognicije, oštećenja SŽS i molekularnih biljega u serumu

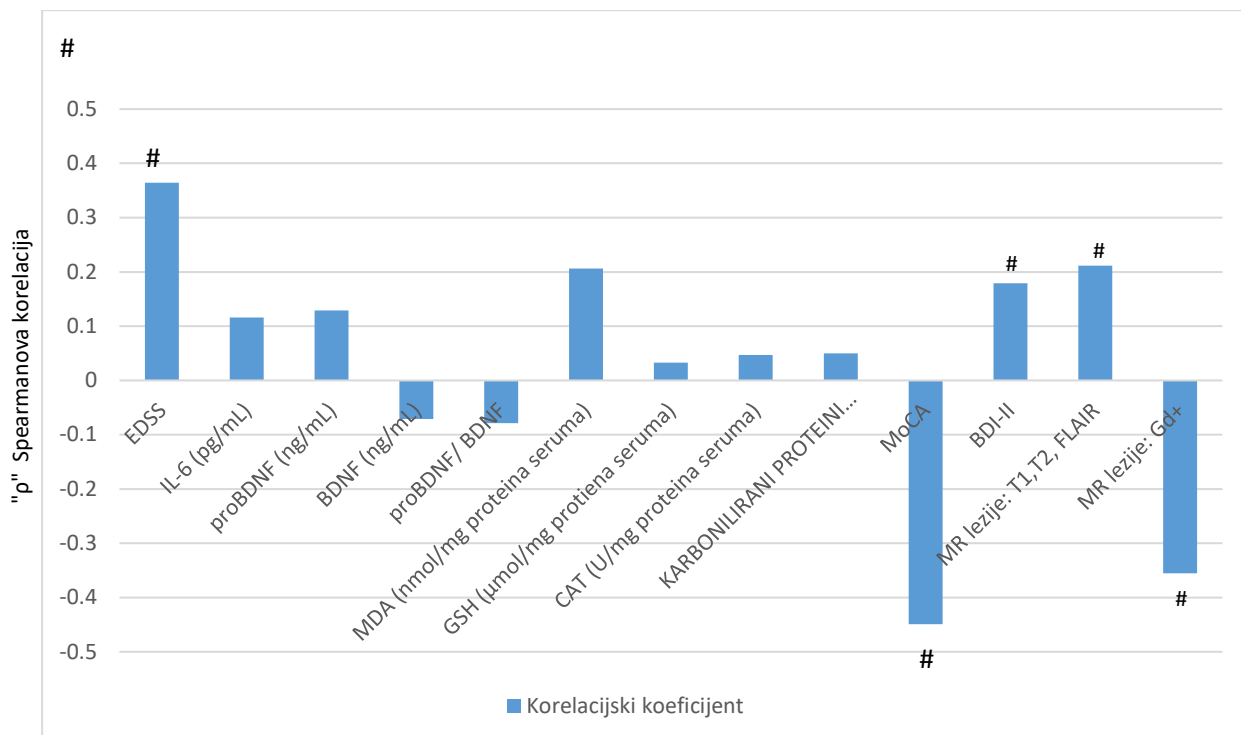
U ovom istraživanju je dob pozitivno statistički značajno korelirala s EDSS-om, što znači da su stariji ispitanici s MS-om imali više vrijednosti EDSS-a. Statistički značajna pozitivna korelacija je prikazana i sa BDI-II testom te brojem MR lezija; T1, T2 i FLAIR. Dob je negativno korelirala s MoCA testom, tako da su mlađi ispitanici imali više bodova na MoCA testu, kojim su ispitane kognitivne funkcije, a stariji manje bodova, znači razvili su kognitivni deficit (Tablica 18.).

Tablica 18. Korelacije dobi sa svim ispitivanim parametrima kod ispitanika s RRMS-om

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,364316651	0,004214018 *	60
IL-6 (pg/mL)	0,116172038	0,37673223	60
proBDNF (ng/mL)	0,12888441	0,404395754	44
BDNF (ng/mL)	-0,07091511	0,590280551	60
proBDNF/BDNF	-0,078760437	0,615647115	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	0,205931917	0,114437521	60
GSH (μmol/ mg protiena seruma)	0,032954669	0,8026153	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,047137691	0,720608939	60
KARBONILIRANI PROTEINI (μmol/mg proteina)	0,050009053	0,704348269	60
MoCA	-0,449401242	0,000315759 *	60
BDI-II	0,179251768	0,170562472	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	0,211634789	0,104530229	60
MR lezije: Gd+	-0,355244159	0,005347772 *	60

* označava statistički značajnu korelaciju

Statistički pozitivno značajna korelacija ($P \leq 0,05$) dobi s EDSS-om, BDI-II testom i MR lezijama: T1, T2, FLAIR, a negativna s MoCA testom je prikazana na Slici 27.



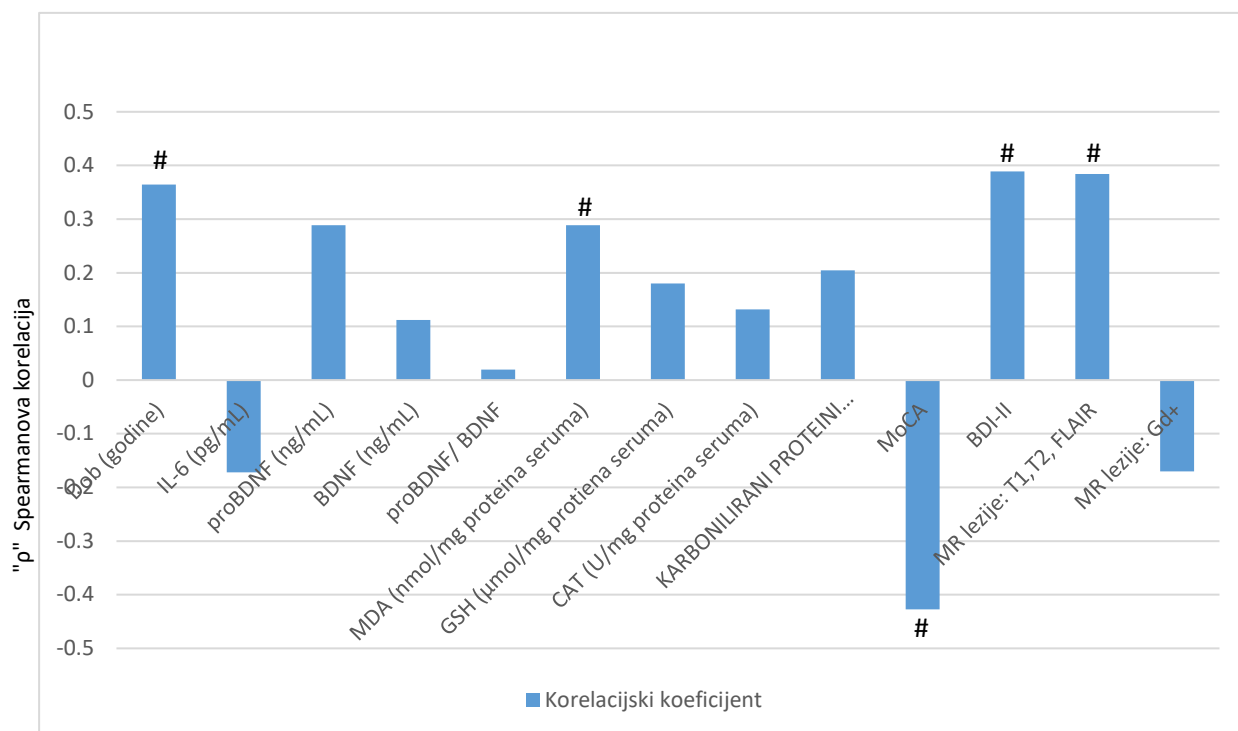
Slika 27. Korelacije dobi sa svim ispitivanim parametrima. # statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$)

EDSS je značajno pozitivno korelirao s dobi, BDI-II testom, brojem MR lezija: T1, T2, FLAIR i MDA (Slika 28.), što znači da su ispitanici s RRMS-om s većom onesposobljenošću bili stariji, imali više MR lezija, te su pokazali smetnje u smislu razvoja depresije. Negativna statistički značajna korelacija je dokazana između vrijednosti EDSS-a i MoCA testa, jer su ispitanici s većom onesposobljenošću imali lošije rezultate kognitivnog testiranja (Tablica 19.).

Tablica 19. Korelacije EDSS-a sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
Dob (godine)	0,364316651	0,004214018 *	60
IL-6 (pg/mL)	-0,172166961	0,188377958	60
proBDNF (ng/mL)	0,288853393	0,057219027	44
BDNF (ng/mL)	0,11181572	0,395006619	60
proBDNF/BDNF	0,019451068	0,901471822	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	0,288620993	0,025322467 *	60
GSH (µmol/ mg protiena seruma)	0,180174062	0,168336938	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,131579282	0,316278832	60
KARBONILIRANI PROTEINI (µmol/mg prot.ser.)	0,204598135	0,116855242	60
MoCA	-0,427345919	0,000660443 *	60
BDI-II	0,388672948	0,002148056 *	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	0,384182718	0,002441562 *	60
MR lezije: Gd+	-0,170259195	0,193395789	60

* označava statistički značajnu korelaciju



Slika 28. Korelacije EDSS-a sa svim ispitivanim parametrima.

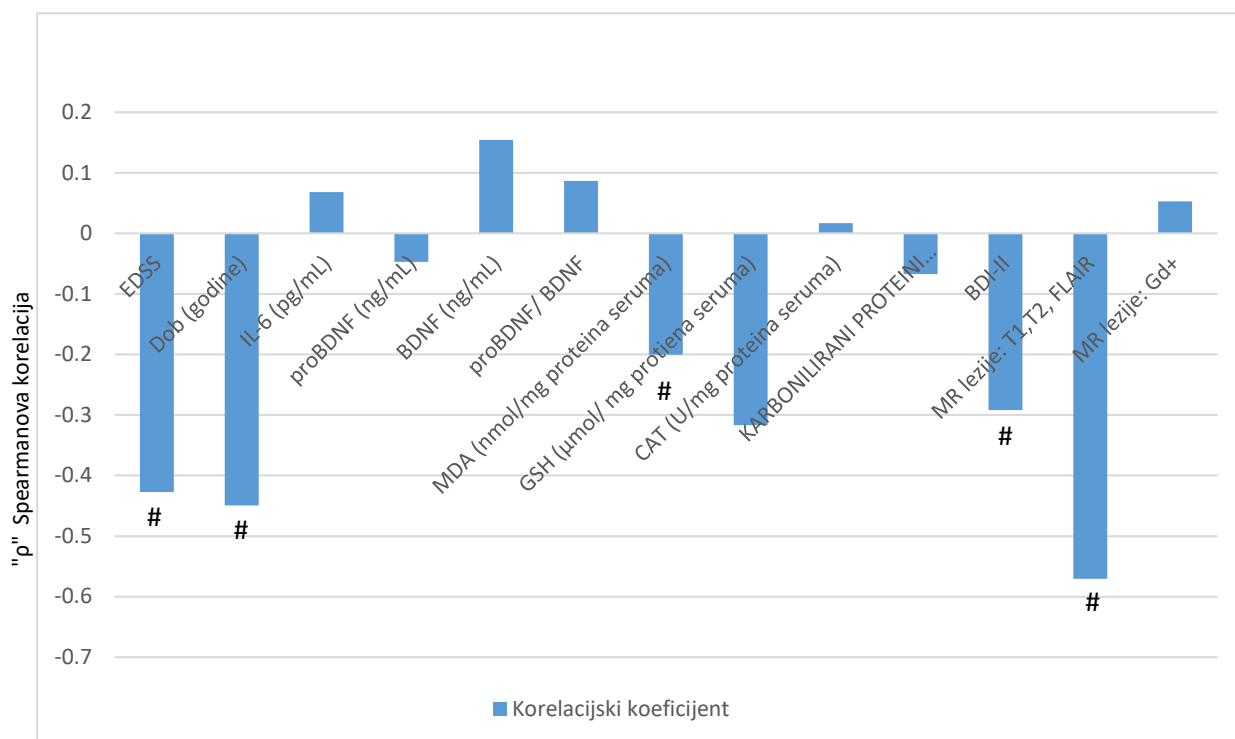
pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) EDSS-a s BDI-II testom, brojem MR lezija: T1, T2, FLAIR, MDA, a negativna s MoCA testom.

MoCA test kojim su ispitane kognitivne funkcije je statistički značajno ($P \leq 0,05$) korelirao s EDSS-om, dobi, BDI-II i MR lezijama: T1,T1, FLAIR i GSH (Tablica 20.). Ispitanici s višim vrijednostima MoCA testa su bili mlađi, imali manji stupanj neurološke onesposobljenosti, bili manje depresivni i imali su manje vrijednosti glutaciona i manje demijelinizacijskih lezija na MR-u (Slika 29.).

Tablica 20. Korelacije MoCA testa sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	-0,427345919	0,000660443 *	60
Dob (godine)	-0,449401242	0,000315759 *	60
IL-6 (pg/mL)	0,068132745	0,604978965	60
proBDNF (ng/mL)	-0,047353741	0,760185065	44
BDNF (ng/mL)	0,154402035	0,238831063	60
proBDNF/BDNF	0,086513376	0,581205111	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	-0,200290948	0,124929973	60
GSH (μ mol/ mg protiena seruma)	-0,316597057	0,013719709 *	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,016959555	0,897663175	60
KARBONILIRANI PROTEINI (μ mol/mg prot.ser.)	-0,067258888	0,609628044	60
BDI-II	-0,291691917	0,023738912 *	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	-0,570659701	1,93063E-06 *	60
MR lezije: Gd+	0,052730309	0,68905805	60

* označava statistički značajnu korelaciju



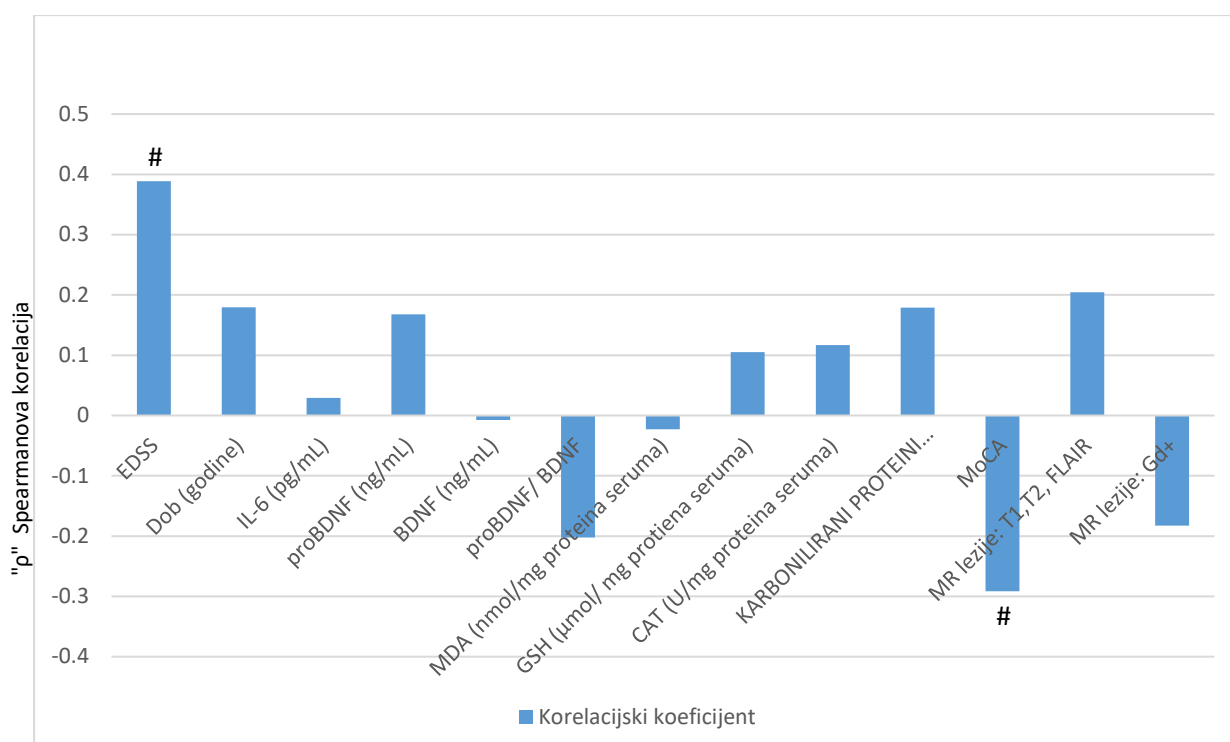
Slika 29. Korelacije MoCA testa sa svim ispitivanim parametrima # označava statistički značajne korelacije ($P \leq 0,05$)

Tablica 21. Korelacije BDI-II testa sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,388672948	0,002148056 *	60
Dob (godine)	0,179251768	0,170562472	60
IL-6 (pg/mL)	0,029364782	0,823752045	60
proBDNF (ng/mL)	0,167977026	0,275746738	44
BDNF (ng/mL)	-0,00747565	0,954793108	60
proBDNF/BDNF	-0,202094858	0,193727127	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	-0,023040622	0,861283388	60
GSH (μmol/ mg protiena seruma)	0,104938039	0,424897085	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,117072022	0,373021202	60
KARBONILIRANI PROTEINI (μmol/mg prot.ser.)	0,17907785	0,170984539	60
MoCA	-0,291691917	0,023738912 *	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	0,204672601	0,116719239	60
MR lezije: Gd+	-0,182820799	0,162068227	60

* označava statistički značajnu korelaciju

Test za otkrivanje i mjerenje ozbiljnosti prisustva depresije kod odraslih osoba (BDI-II) je pokazao pozitivnu korelaciju s EDSS-om i negativnu sa stupnjem kognitivnog oštećenja - MoCA (Tablica 21.), tako da su ispitanici s višim vrijednostima na BDI-II testu imali veći stupanj EDSS-a i manji rezultat MoCA testa (Slika 30.).



Slika 30. Korelacije BDI-II sa svim ispitivanim parametrima

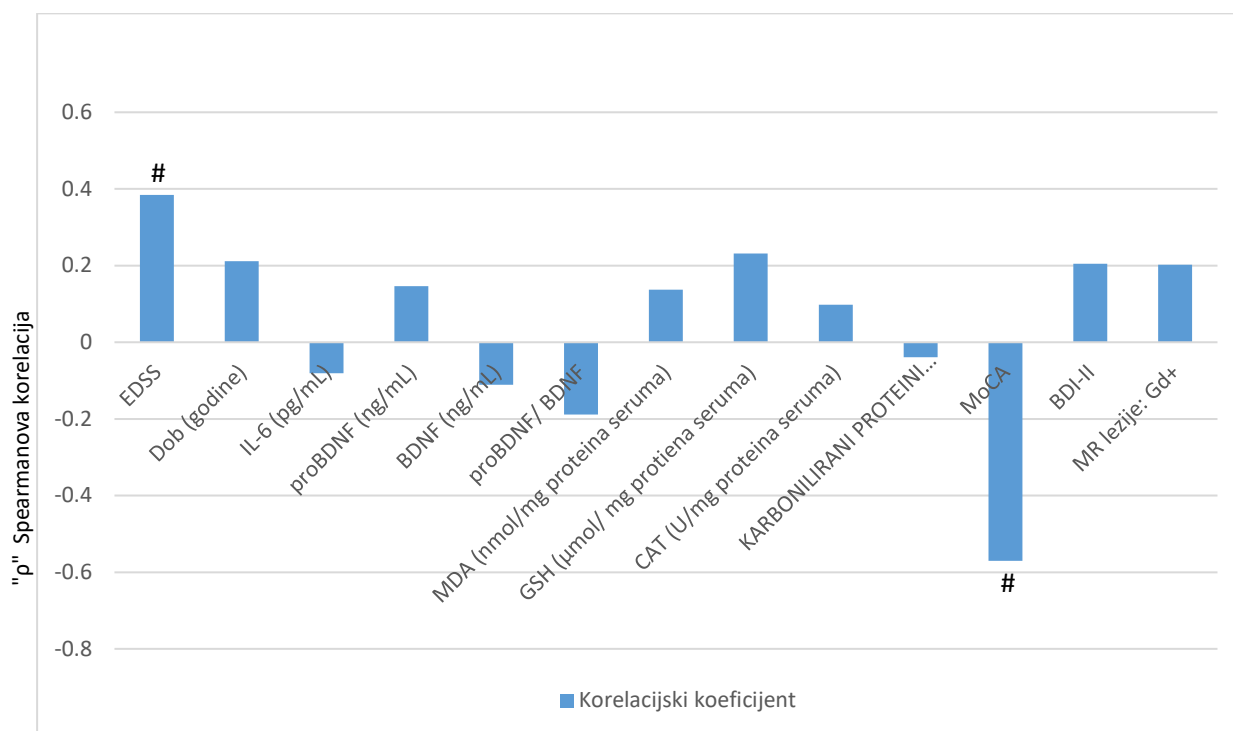
pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) BDI-II s EDSS-om i negativna s MoCA testom.

Broj demijelinizacijskih lezija prikazanih magnetnom rezonancijom u mjernim vremenima T1, T2 i FLAIR sekvenci je pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa stupnjem neurološke onesposobljenosti (EDSS) i MoCA testom (Tablica 22.). Ispitanici s većim brojem demijelinizacijskih lezija su imali veći EDSS i lošiji rezultat testa za procjenu kognitivnih funkcija (Slika 31.).

Tablica 22. Korelacije MR lezija: T1, T2, FLAIR sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,384182718	0,002441562 *	60
Dob (godine)	0,211634789	0,104530229	60
IL-6 (pg/mL)	-0,081183276	0,537476327	60
proBDNF (ng/mL)	0,146594298	0,34234298	44
BDNF (ng/mL)	-0,111297976	0,397212664	60
proBDNF/BDNF	-0,188720614	0,225518348	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	0,137121107	0,296144482	60
GSH (μmol/ mg protiena seruma)	0,231157334	0,075564216	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,097566407	0,458317424	60
KARBONILIRANI PROTEINI (μmol/mg prot. ser.)	-0,038879083	0,76804546	60
MoCA	-0,570659701	1,93063E-06 *	60
BDI-II	0,204672601	0,116719239	60
MR lezije: Gd+	0,202420087	0,120887069	60

* označava statistički značajnu korelaciju



Slika 31. Korelacije MR lezija: T1, T2, FLAIR sa svim ispitivanim parametrima.

pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) MR lezija: T1, T2, FLAIR s EDSS-om i negativna s MoCA testom.

Gadolinijum imbibirajuće lezije nisu pokazale značajnu korelaciju s istraživanim parametrima (Tablica 23.).

Tablica 23. Korelacije MR Gd + lezija sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	-0,170259195	0,193395789	60
Dob (godine)	-0,355244159	0,005347772	60
IL-6 (pg/mL)	0,14411037	0,27196944	60
proBDNF (ng/mL)	0,025549807	0,869238354	44
BDNF (ng/mL)	0,046756797	0,72277542	60
proBDNBDNF	-0,088214133	0,57376739	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	-0,125352575	0,339920375	60
GSH (µmol/ mg protiena seruma)	0,049654502	0,706349177	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,000143097	0,999134213	60
KARBONILIRANI PROTEINI (µmol/mg prot.ser.)	0,04492067	0,733249213	60
MoCA	0,052730309	0,68905805	60
BDI-II	-0,182820799	0,162068227	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	0,202420087	0,120887069	60

Interleukin-6 kod ispitanika s RRMS-om nije pokazao statistički značajnu povezanost ispitivanih parametara (Tablica 24.).

Tablica 24. Korelacije IL-6 sa svim ispitivanim parametrima

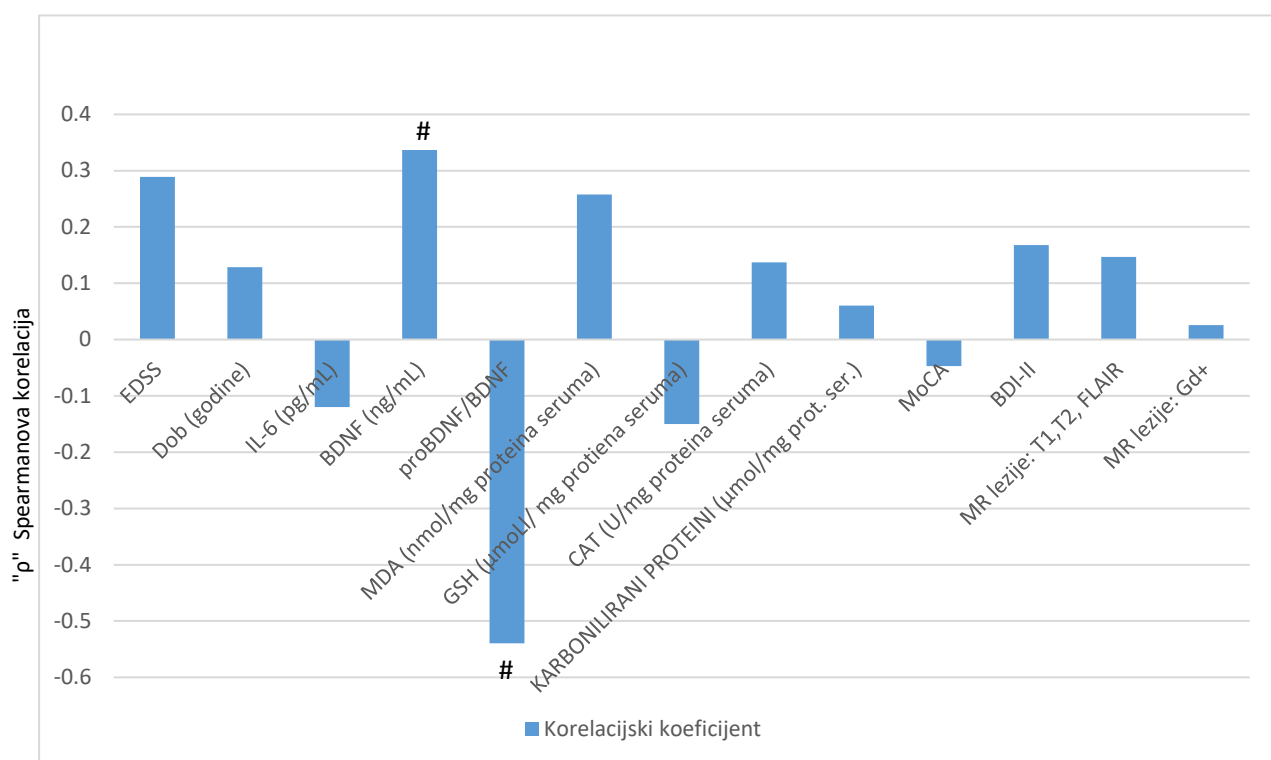
	IL-6 (pg/mL)		
	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	-0,172166961	0,188377958	60
Dob (godine)	0,116172038	0,37673223	60
proBDNF (ng/mL)	-0,120052172	0,437616504	44
BDNF (ng/mL)	-0,010894185	0,934159055	60
proBDNF/BDNF	0,03980062	0,799959244	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	0,009310081	0,943716067	60
GSH (µmol/ mg protiena seruma)	-0,070145211	0,594331654	60
CAT (U/mg proteina seruma)	-0,005252553	0,968228271	60
KARBONILIRANI PROTEINI (µmol/mg prot. ser.)	0,135640331	0,301440689	60
MoCA	0,068132745	0,604978965	60
BDI-II	0,029364782	0,823752045	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	-0,081183276	0,537476327	60
MR lezije: Gd+	0,14411037	0,27196944	60

Prekursor proBDNF je pokazao statistički značajnu ($P \leq 0,05$) pozitivnu korelaciju s BDNF-om (Slika 32.). Statistički značajna negativna korelacija je prikazana između proBDNF-a i omjera proBDNF/BDNF (Tablica 25.)

Tablica 25. Korelacije proBDNF-a sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,288853393	0,057219027	44
Dob (godine)	0,12888441	0,404395754	44
IL-6 (pg/mL)	-0,120052172	0,437616504	44
BDNF (ng/mL)	0,336575053	0,025487239 *	44
proBDNF/BDNF	-0,539414074	0,000189537 *	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	0,257928118	0,090954669	44
GSH (μ mol/ mg protiena seruma)	-0,150246653	0,330318283	44
CAT U/mg proteina	0,136856942	0,375698165	44
KARBONILIRANI PROTEINI (μ mol/mg prot. ser.)	0,060114874	0,698291116	44
MoCA	-0,047353741	0,760185065	44
BDI-II	0,167977026	0,275746738	44
MR lezije: T1,T2, FLAIR	0,146594298	0,34234298	44
MR lezije: Gd+	0,025549807	0,869238354	44

* označava statistički značajnu korelaciju



Slika 32. Korelacije proBDNF-a sa svim ispitivanim parametrima.

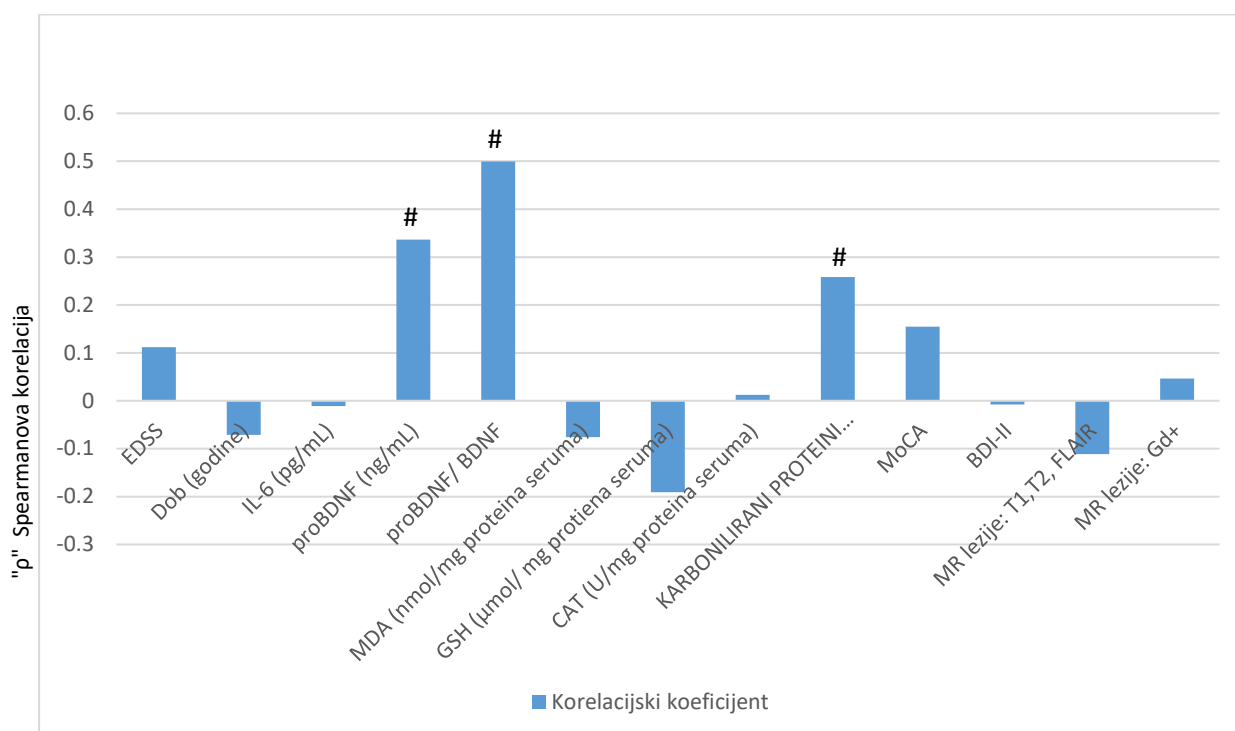
pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) proBDNF-a s BDNF-om i negativna između proBDNF-a i omjera proBDNF/BDNF.

BDNF je statistički značajno pozitivno korelirao s proBDNF-om (Slika 33.), omjerom proBDNF/BDNF i karboniliranim proteinima (Tablica 26.).

Tablica 26. Korelacije BDNF-a sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,11181572	0,395006619	60
Dob (godine)	-0,07091511	0,590280551	60
IL-6 (pg/mL)	-0,010894185	0,934159055	60
proBDNF (ng/mL)	0,336575053	0,025487239 *	44
proBDNF/BDNF	0,499546965	0,000648619 *	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	-0,076021117	0,563732578	60
GSH (μmol/ mg protiena seruma)	-0,190608502	0,144620005	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,012058905	0,927138026	60
KARBONILIRANI PROTEINI (μmol/mg prot. ser.)	0,258357652	0,046249289 *	60
MoCA	0,154402035	0,238831063	60
BDI-II	-0,00747565	0,954793108	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	-0,111297976	0,397212664	60
MR lezije: Gd+	0,046756797	0,72277542	60

* označava statistički značajnu korelaciju



Slika 33. Korelacije BDNF-a sa svim ispitivanim parametrima

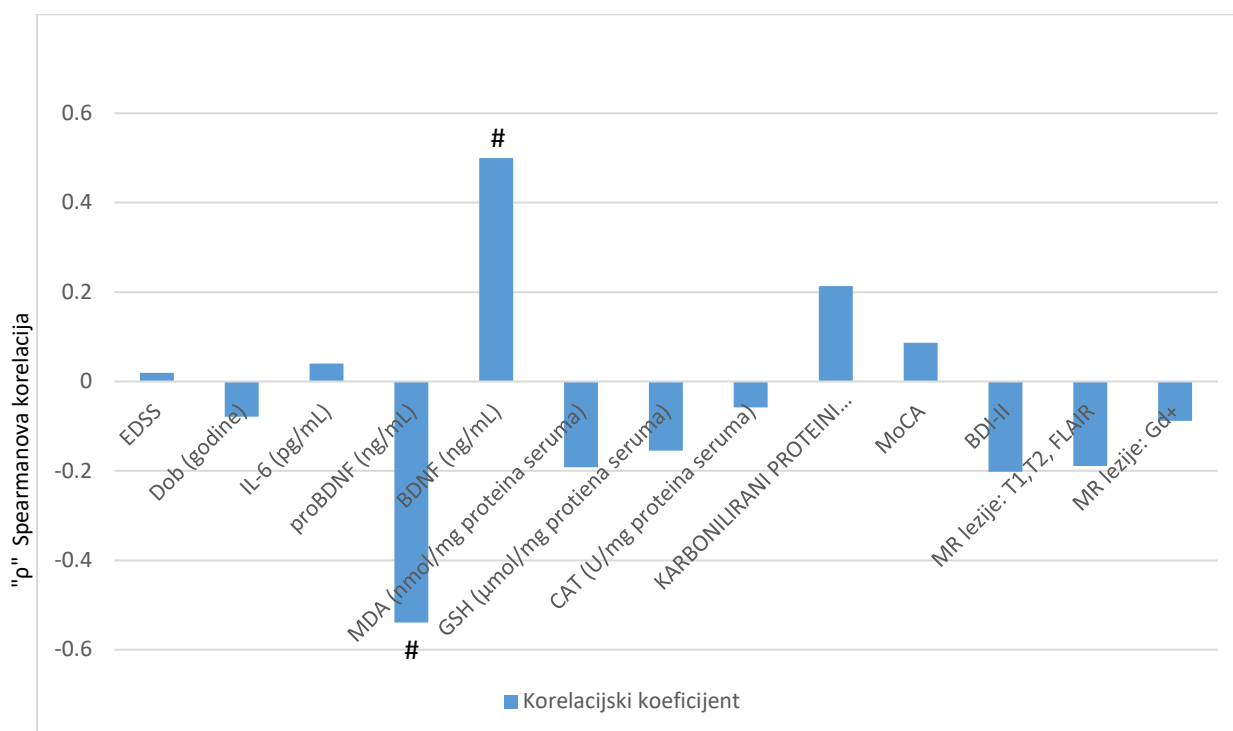
pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) BDNF-a s proBDNF-om i omjerom proBDNF/BDNF, te s MDA.

Omjer proBDNF/BDNF je pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju s BDNFom, te negativnu s proBDNF-om (Tablica 27.), što je također prikazano na Slici 34.

Tablica 27. Korelacije proBDNF/BDNF sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,019451068	0,901471822	43
Dob (godine)	-0,078760437	0,615647115	43
IL-6 (pg/mL)	0,03980062	0,799959244	43
proBDNF (ng/mL)	-0,539414074	0,000189537 *	43
BDNF (ng/mL)	0,499546965	0,000648619 *	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	-0,192237995	0,216830178	43
GSH (μmol/ mg protiena seruma)	-0,15448505	0,322599708	43
CAT (U/mg proteina seruma)	-0,058139535	0,711139808	43
KARBONILIRANI PROTEINI (μmol/mg prot. ser.)	0,213463209	0,169309424	43
MoCA	0,086513376	0,581205111	43
BDI-II	-0,202094858	0,193727127	43
MR lezije: T1,T2, FLAIR	-0,188720614	0,225518348	43
MR lezije: Gd+	-0,088214133	0,57376739	43

* označava statistički značajnu korelaciju



Slika 34. Korelacije BDNF-a sa svim ispitivanim parametrima

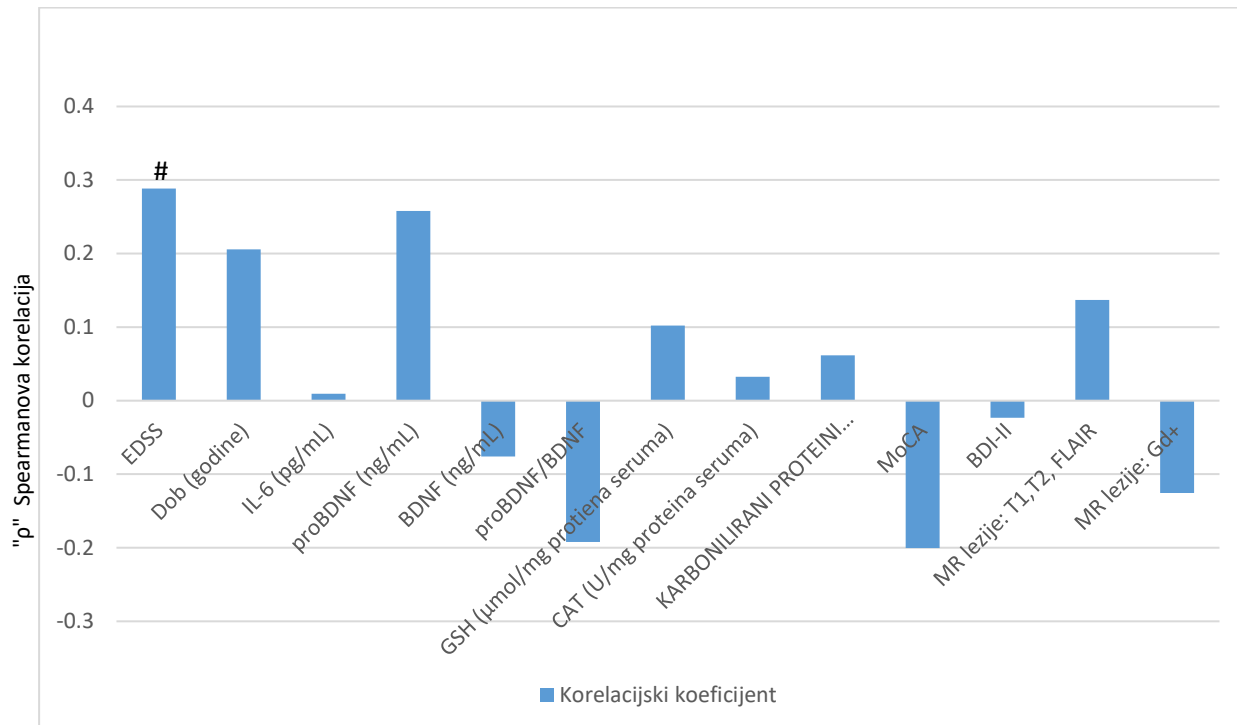
pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) omjeroa proBDNF/BDBF s BDNF-om.

Analizom podataka zapažena je statistički značajna pozitivna povezanost ($P \leq 0,05$) koncentracije MDA sa stupnjem onesposobljenosti - EDSS-om (Tablica 28), što znači da su ispitanici s višim koncentracijama MDA imali veći stupanj neurološke onesposobljenosti (Slika 35.).

Tablica 28. Korelacije MDA sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,288620993	0,025322467 *	60
Dob (godine)	0,205931917	0,114437521	60
IL-6 (pg/mL)	0,009310081	0,943716067	60
proBDNF (ng/mL)	0,257928118	0,090954669	44
BDNF (ng/mL)	-0,076021117	0,563732578	60
proBDNF/BDNF	-0,192237995	0,216830178	43
GSH ($\mu\text{mol/mg}$ proteina seruma)	0,10197277	0,438170712	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,032342317	0,80621125	60
KARBONILIRANI PROTEINI ($\mu\text{mol/mg}$ prot. ser.)	0,061553426	0,640353609	60
MoCA	-0,200290948	0,124929973	60
BDI-II	-0,023040622	0,861283388	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	0,137121107	0,296144482	60
MR lezije: Gd+	-0,125352575	0,339920375	60

* označava statistički značajnu korelaciju



Slika 35. Korelacije MDA sa svim ispitivanim parametrima

pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) MDA s EDSS-om.

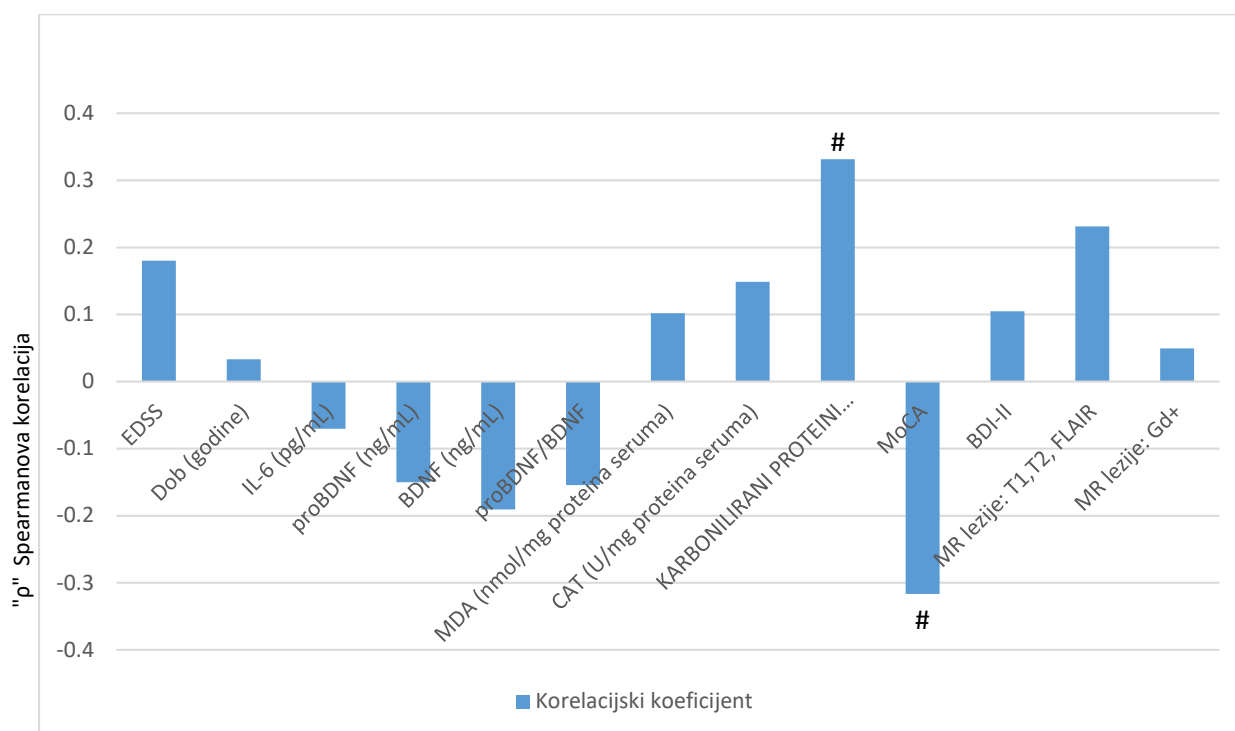
Enzim oksidacijskog stresa Glutation je statistički značajno ($P \leq 0,05$) pozitivno korelirao s karboniliranim proteinima i negativno s MoCA testom (Tablica 29.).

Tablica 29. Korelacije GSH sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,180174062	0,168336938	60
Dob (godine)	0,032954669	0,8026153	60
IL-6 (pg/mL)	-0,070145211	0,594331654	60
proBDNF (ng/mL)	-0,150246653	0,330318283	44
BDNF (ng/mL)	-0,190608502	0,144620005	60
proBDNF/BDNF	-0,15448505	0,322599708	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	0,10197277	0,438170712	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,148874687	0,256266291	60
KARBONILIRANI PROTEINI ($\mu\text{mol/mg prot.ser.}$)	0,331582607	0,009651624 *	60
MoCA	-0,316597057	0,013719709 *	60
BDI-II	0,104938039	0,424897085	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	0,231157334	0,075564216	60
MR lezije: Gd+	0,049654502	0,706349177	60

* označava statistički značajnu korelaciju

Ispitanici s višim koncentracijama GSH su imali više koncentracije karboniliranih proteina i lošije rezultate MoCA testa (Slika 36.).



Slika 36. Korelacije GSH sa svim ispitivanim parametrima

pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) GSH s s karboniliranim proteinima i negativna s MoCA testom.

U ovom istraživanju Katalaza (CAT) nije pokazala statistički značajnu korelaciju s navedenim istraživanim parametrima (Tablica 30.).

Tablica 30. Korelacije CAT sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,131579282	0,316278832	60
Dob (godine)	0,047137691	0,720608939	60
IL-6 (pg/mL)	-0,005252553	0,968228271	60
proBDNF (ng/mL)	0,136856942	0,375698165	44
BDNF (ng/mL)	0,012058905	0,927138026	60
proBDNF/BDNF	-0,058139535	0,711139808	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	0,032342317	0,80621125	60
GSH (μmol/ mg protiena seruma)	0,148874687	0,256266291	60
KARBONILIRANI PROTEINI (μmol/mg prot. ser.)	0,175934419	0,178744823	60
MoCA	0,016959555	0,897663175	60
BDI-II	0,117072022	0,373021202	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	0,097566407	0,458317424	60
MR lezije: Gd+	0,000143097	0,999134213	60

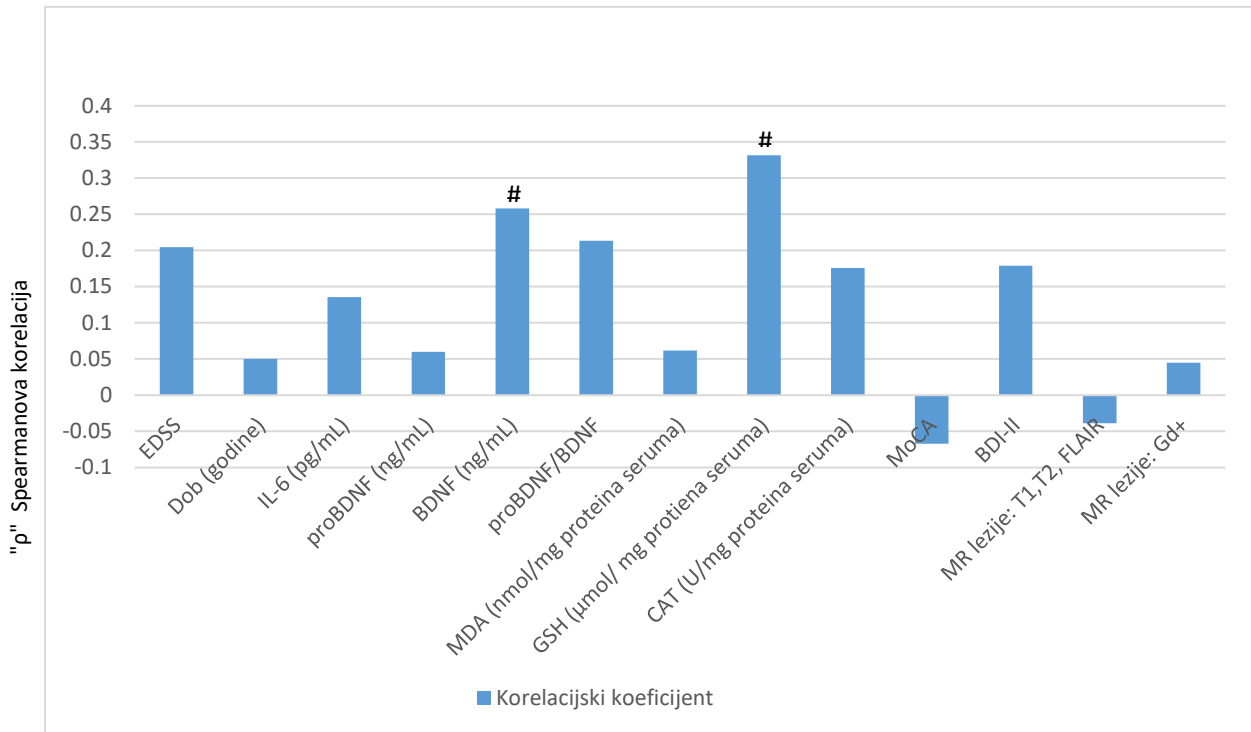
Karbonilirani proteini su u ovom istraživanju u pozitivnoj korelaciji ($P \leq 0,05$) s BDNF-om i Glutacionom (Tablica 31).

Tablica 31. Korelacije karboniliranih proteina sa svim ispitivanim parametrima

	Korelacijski koeficijent	P	N
EDSS	0,204598135	0,116855242	60
Dob (godine)	0,050009053	0,704348269	60
IL-6 (pg/mL)	0,135640331	0,301440689	60
proBDNF (ng/mL)	0,060114874	0,698291116	44
BDNF (ng/mL)	0,258357652	0,046249289 *	60
proBDNF/BDNF	0,213463209	0,169309424	43
MDA (nmol/mg proteina seruma)	0,061553426	0,640353609	60
GSH (μmol/ mg protiena seruma)	0,331582607	0,009651624 *	60
CAT (U/mg proteina seruma)	0,175934419	0,178744823	60
MoCA	-0,067258888	0,609628044	60
BDI-II	0,17907785	0,170984539	60
MR lezije: T1,T2, FLAIR	-0,038879083	0,76804546	60
MR lezije: Gd+	0,04492067	0,733249213	60

* označava statistički značajnu korelaciju

Analizom korelacije karboniliranih proteina sa svim ispitivanim parametrima vidljiva je statistički značajna povezanost ($P \leq 0,05$) s BDNF-om i GSH (Slika 37.). Ispitanici s višom koncentracijom karboniliranih proteina su imali više koncentracije BDNF-a i GSH.



Slika 37. Korelacije karboniranih proteina sa svim ispitivanim parametrima

[#] pozitivno statistički značajna korelacija ($P \leq 0,05$) karboniliranih proteina s BDNF-om i GSH.

4.5. Regresijska analiza

U multivarijatnom regresijskom modelu predikcije težeg tijeka bolesti (veći EDSS skor) kao prediktorske varijable su korištene one koje su bile značajne na bivarijatnoj razini (korelacijska analiza). Regresijski model je statistički značajan ($P < 0,001$) i objašnjava 40% varijance zavine varijable (EDSS) - $r^2 = 0,40$.

Od svih prediktorskih varijabli u regresijskom modelu kao jedina značajna se izdvaja BDI-II kod koje je standardizirani koeficijent $\beta = 0,240$, $P = 0,043$ (kontrolirano na utjecaj svih ostalih varijabli u modelu).

To znači da nam je u predikciji težine bolesti mjerene EDSS-om najvažniji (i jedini značajan) prediktor u multivarijatnoj analizi BDI-II koji je pozitivno povezan te su veće vrijednosti BDI-II utječu na veće vrijednosti EDSS (odnosno težu bolest).

Tablica 32. Regresijska analiza

Koeficijent^a

Model	Nestandardizirani Koeficijent		Standardizirani Koeficijent	t	95,0% CI		P
	B	Std. Pogreška	Beta		Donja Granica	Gornja Granica	
Dob (godine)	0,020	0,012	0,192	1,615	-0,005	0,045	0,112
MDA nmol/mg proteina	0,042	0,027	0,170	1,558	-0,012	0,097	0,125
MoCA	- 0,093	0,061	-0,197	- 1,518	-0,215	0,030	0,135
BDI-II	0,054	0,026	0,240	2,068	0,002	0,107	0,043
MR lezije: T1, T2, FLAIR	0,009	0,005	0,241	1,929	0,000	0,018	0,059

a. Ovisna Varijabla: EDSS

5. RASPRAVA

5.1. Klinička obilježja

5.1.1. MoCA u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Rezultati ispitivanja kognitivnih funkcija MoCA testom ukazuju na manje vrijednosti kod ispitanika s MS-om u odnosu na zdrave što znači da imaju kognitivna odstupanja (Slika 15.). Kognitivni deficit je bio prevalentniji i izraženiji u skupini ispitanika s RRMS-om, kao i u istraživanju koje su napravili Botchorishvili i sur. (2021.), koji su uključili 68 ispitanika s multiplom sklerozom i 69 zdravih kontrola. U njihovom istraživanju, pacijenti koji su kontinuirano bili na DMT-u pokazali su značajno bolje rezultate na kognitivnim testovima, što ukazuje na moguće povoljne učinke imunomodulatornih lijekova na kogniciju. Također su pokazali da je kognitivni deficit češći u bolesnika s višim BDI rezultatima, što ukazuje na potrebu praćenja kognitivnih funkcija kod oboljelih od MS-a. Al-Falaki i sur. su (2021.) napravili studiju na 50 ispitanika s MS-om i 50 zdravih kontrola. Za procjenu stupnja invaliditeta korišten je EDSS, a za procjenu kognitivnih funkcija bodovni sustav MoCA. Pokazali su niže vrijednosti MoCA testa kod oboljelih od MS-a u usporedbi sa zdravim kontrolama. Kognitivni deficit je bio viši u onih s duljim trajanjem bolesti i visokim EDSS-om, kao i u našoj istraživanju. MoCA je pozitivno korelirala s razinom obrazovanja, ali negativno s EDSS-om i trajanjem bolesti. Zaključili su da MoCA ljestvica ima optimalna psihometrijska svojstva za rutinsku kliničku primjenu u bolesnika s MS-om, čak i kod osoba s blažim kognitivnim oštećenjem. Kao i svaka, tako i navedena istraživanja imaju ograničenja, a to je mali broj ispitanika (50 bolesnih i 50 zdravih kontrola). Aksoy i sur. su u istraživanju iz 2013. godine pokazali da je ukupni MoCA rezultat pacijenata s multiplom sklerozom bio znatno niži od kontrolne skupine. Također je utvrđeno značajno pogoršanje u području jezika, pažnje, pamćenja i izvršnih funkcija. Trajanje bolesti i EDSS nisu se razlikovali u bolesnika sa i bez kognitivnog deficita, možda zbog malog broja ispitanika, 39 s multiplom sklerozom i 20 zdravih kontrola. Aksoy i sur. (2013) su zaključili da je MoCA jednostavan, samostalan test kognitivnog probira vrhunske osjetljivosti i sugeriraju da bi MoCA test mogao biti koristan za probir kognitivnih oštećenja u bolesnika s multiplom sklerozom u ranoj fazi bolesti. Isto sugeriraju Dagenais i sur. iz 2013. koji su zaključili da rezultati dobiveni u njihovom istraživanju, u kojem je uključen 41 ispitanik s MS-om, podržavaju vrijednost MoCA testa kao alata za probir prisutnosti kognitivne disfunkcije u bolesnika s multiplom sklerozom, čak i u bolesnika s blagim funkcionalnim nedostatkom (EDSS). Treba uzeti u obzir da imunomodulacijska terapija može utjecati na rezultate kognitivnih testova, što je zaključio i

Comi 2010. god. koji navodi da je nekoliko istraživanja pokazalo zaštitne učinke interferona, glatiramer acetata, fingolimoda i natalizumaba na kognitivni status MS pacijenata, jer pozitivno utječu na neke od patogenetskih mehanizama, te na taj način utječu na ukupni kognitivni status.

5.1.2. BDI-II u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Promjene raspoloženja su inducirane intratekalnom upalom, iako nisu klinički vidljive, i mogu predvidjeti upalne reaktivacije u RRMS. Upala je stoga biološki događaj, ne manje važan od tradicionalnih psihosocijalnih čimbenika, uključenih u poremećaje raspoloženja.

U ovom istraživanju je BDI-II test pokazao signifikantno veće vrijednosti u ispitanika s MS-om u odnosu na zdrave ($P < 0,001$), što ukazuje na razvoj depresije prikazano na Slici 16. Statistički značajno ($P < 0,001$) viši stupanj depresije ispitan BDI-II testom su pokazali Riccardi i sur. (2021.) koji su uključili dvije kohorte od 30 i 120 pacijenata s RRMS-om, te isto toliko zdravih kontrola, s ciljem dizajniranja kognitivnog upitnika samopercepcije za talijanske pacijente s multiplom sklerozom. Lazzaroto i sur. su 2020. godine dobili također slične rezultate na uzorku od 61 ispitanika s multiplom sklerozom i 50 zdravih kontrola. Njihov cilj je bio analizirati povezanost između cerebelarne atrofije, depresije i umora u ranim fazama recidiva multiple skleroze (RRMS). Zaključili su da je od samog početka bolesti, atrofija specifičnih cerebelarnih lobula povezana s važnim kliničkim aspektima RRMS-a, te posljedično cerebelarna patologija može biti jedna od determinanti umora i depresije koje pridonose pogoršanju onesposobljenosti kod RRMS-a. U Brazilskom istraživanju Tauil i sur. iz 2018. godine, koja je uključila 132 pacijenta s RRMS-om pomoću BDI-II testa za otkrivanje depresije je potvrđena visoka prevalencija simptoma depresije u bolesnika s MS-om u odnosu na zdravu populaciju. Saadat i sur. (2014.) su radili istraživanje na Iranskoj populaciji, da bi utvrdili prevalenciju i povezane čimbenike depresije BDI-II testom, te status uzimanja antidepresiva u iranskih MS pacijenata. Uključeno je 160 bolesnika s definitivnom multiplom sklerozom, te je zaključeno da je prevalencija depresije bila je 59,4 %, a teške depresije 18,1 %. Dvogodišnje longitudinalno švedsko istraživanje Johanssona i sur. (2016.) napravljeno na 219 bolesnika s RRMS-om i isto toliko zdravih kontrola istražilo je varijacije i prediktore pojave simptoma depresije u multiploj sklerozi. Pokazali su da je gotovo polovica ispitanika s RRMS-om barem jednom tijekom istraživanja imala simptome depresije, na testu koji se radio u 0, 12 i 24 mjesecu istraživanja. Navedeno upućuje na potrebu češćeg popunjavanja samoocjenskog BDI-II upitnika s ciljem prepoznavanja osoba s multiplom sklerozom koje su depresivne ili koje razvijaju simptome depresije.

5.1.3. EDSS, MoCA i BDI-II u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Ovo istraživanje je pokazalo statistički značajnu pozitivnu korelaciju testa za otkrivanje i mjerenje ozbiljnosti prisustva depresije kod odraslih osoba (BDI-II) s EDSS-om i negativnu sa stupnjem kognitivnog oštećenja (MoCA), tako da su ispitanici s višim vrijednostima na BDI-II testu imali veći stupanj EDSS-a i manji rezultat MoCA testa (Slika 30.) Slični rezultati su dobiveni u istraživanju Maier i sur. koja je rađena 2016. godine na 351 ispitaniku koji boluje od multiple skleroze, a pokazalo je značajnu pozitivnu korelaciju između BDI-II skora i EDSS-a i dobi bolesnika. Pokazali su da su glavne fizičke i psiho-socio-ekonomske determinante depresije kod bolesnika s multiplom sklerozom tjelesna invalidnost, trajanje bolesti, broj recidiva, bračni status, razina obrazovanja, radni status i prisutnost djece, a međudnos i relativni doprinos ovih čimbenika iziskuje daljnja istraživanja. Prema njihovom istraživanju imunomodulacijska terapija nije značajno utjecala na razinu depresije.

Botchorishvili i sur. su 2021. uključili 68 ispitanika s multiplom sklerozom i 69 zdravih kontrola u istraživanje kognitivnog deficita u Gruzijskoj populaciji, te su pokazali da je kognitivni deficit češći u bolesnika s višim BDI rezultatima, što ukazuje na potrebu praćenja kognitivnih funkcija kod oboljelih od MS-a. Također su utvrdili da pacijenti s višim statusom invaliditeta ili nižim stupnjem obrazovanja imaju veći rizik od kognitivnog propadanja.

Bilo je nekoliko longitudinalnih istraživanja koji su ispitali povezanost između depresije i kasnijih ishoda invaliditeta kod MS-a mjerenih EDSS ljestvicom. Nizozemska istraživanja Koch i sur. iz 2008. god. u koja je uključila 228 oboljelih od multiple skleroze nije otkrila povezanost između depresije na početku i naknadnog pogoršanja invaliditeta, dok su veća i novija istraživanja provedena u Kanadi (McKay i sur., 2018.) i Švedskoj (Binzer i sur., 2019.) otkrila da je veća vjerojatnost da će osobe s multiplom sklerozom i depresijom brže doći do invaliditeta od onih bez depresije. Kanadsko istraživanje je retrospektivno kohortno koje je prospektivno prikupilo informacije iz povezanih kliničkih i populacijskih zdravstvenih administrativnih baza podataka u kanadskim provincijama British Columbia i Nova Scotia gdje je obuhvaćeno 2312 pacijenta s multiplom sklerozom. Prisutnost psihijatrijskih komorbiditeta, koji su bili česti u ovoj kohorti pacijenata s MS-om povećala je progresiju neurološke invalidnosti. Švedsko retrospektivno kohortno istraživanje je koristilo povezane podatke iz 3 švedska nacionalna registra: MS registar, Nacionalni registar pacijenata i Registar propisanih lijekova. Iz navedenih registara su formirane dvije kohorte, u prvoj je bilo 5875 slučajeva, a u drugoj 3817 pacijenata s MS-om.

Razjašnjavanje prirode ove povezanosti ima implikacije za što ranijim liječenjem komorbidnih depresivnih simptoma kod oboljelih od multiple skleroze. Istraživanje koje je rađeno 2023. Jacobs i sur. na osnovi UK MS registra na 862 ispitanika su potvrdili povezanost između simptoma depresije i naknadne progresije invaliditeta, kao i u prethodno navedenim longitudinalnim istraživanjima. Navedeni rezultati pobuđuju sumnju da depresija nije uzročni faktor rizika za buduće napredovanje bolesti, već odraz prethodne aktivnosti bolesti i sadašnje ozbiljnosti. Iako ovi podaci ne podupiru uzročnu ulogu depresije u utjecanju na naknadne ishode invaliditeta, visoka prevalencija depresivnih bolesti u ovoj UK kohorti naglašava važnost prepoznavanja i liječenja depresije kod osoba s multiplom sklerozom. Zaključno, psihijatrijska bolest može biti potaknuta tjelesnim deficitom, može proizaći iz zajedničkog uzročnog podrijetla (tj. veće opterećenje moždanih lezija može izazvati predispoziciju za depresiju/anksioznost i fizički invaliditet) ili može nastati neovisno, ali pridonijeti ukupnom invaliditetu na osnovi zasebnog procesa.

EDSS je pozitivno korelirao s dobi ispitanika, MoCA i BDI-II testom, brojem MR lezija (T1,T2,FLAIR), te koncentracijom malondialdehida (Slika 28.).

Na razvoj kognitivnih promjena u ovom istraživanju je statistički značajno utjecao broj MR lezija (T1,T2,FLAIR) stupanj depresije, EDSS, dob, te vrijednosti GSH (Slika 29.).

Kognitivne promjene su značajno negativno korelirale s EDSS-om u kanadskom istraživanju koje je napravio Charest i sur. iz 2020. godine u koju je uključeno 98 ispitanika s multiplom sklerozom. Cilj ovog istraživanja je bio ispitati pouzdanost MoCA testa za otkrivanje prisutnosti objektivnih kognitivnih nedostataka među pacijentima s multiplom sklerozom bez subjektivnih smetnji koristeći minimalnu procjenu kognitivne funkcije u multiploj sklerozi kao zlatni standard i MoCA test. 23,5% pacijenata bez subjektivnih kognitivnih tegoba imalo je dokaze o objektivnom kognitivnom oštećenju na testu za minimalnu procjenu kognitivne funkcije u multiploj sklerozi, MoCA test je imao osjetljivost od 87% i specifičnost od 68% za otkrivanje objektivnog kognitivnog oštećenja u ovoj populaciji pacijenata koristeći granični rezultat od 27. Iz navedenog proizlazi da značajan udio pacijenata bez samoprijavljenog kognitivnog oštećenja ima kognitivne poremećaje na iscrpnijoj kognitivnoj procjeni. Stoga je MoCA brzi test probira koji bi se mogao koristiti za ciljane pacijente za koje bi se preporučila detaljnija neuropsihološka procjena.

Elmaaty i sur., 2019. godine su u istraživanju na 50 ispitanika s MS-om i 25 zdravih kontrola otkrili da bolesnici s MS-om s kognitivnim oštećenjem, ispitanim MoCA testom, imaju viši

EDSS nego bolesnici s MS-om s normalnom kognicijom sa statistički značajnim razlikama između EDSS-a obje skupine. U istom istraživanju su pokazali negativnu korelaciju totalnog broja MR demijelinizacijskih lezija s koncentracijom i apstrakcijom prema MoCA testu. Mnogi čimbenici kao što su kognitivna rezerva, dob i razina obrazovanja mogu imati učinak na kognitivne sposobnosti i uzrokovati izraženu varijabilnost kognitivnog oštećenja. Botchorishvili i sur. su 2021. godine u Gruzijском istraživanju pronašli značajnu negativnu korelaciju između svih kognitivnih testova uključujući MoCA test i EDSS. Izražena povezanost između kognitivnog deficita i neurološke onesposobljenosti (mjerene EDSS-om) je prikazana u istraživanju Al-Falaki i sur. iz 2021., koji su pokazali negativnu korelaciju EDSS-a i rezultata MoCA testa. Slični rezultati su dobiveni u istraživanju Carotenuto i sur. iz 2019. koji su ispitali povezanosti između kognitivnog oštećenja na početku bolesti i nakupljanja neurološkog deficita kod 51 mladog ispitanika s multiplom sklerozom u multicentričnom retrospektivnom istraživanju koje uključuje novodijagnosticirane subjekte s ranim početkom RRMS (≤ 25 godina), s kognitivnom procjenom pri postavljanju dijagnoze, koji su praćeni do 7 godina. Autori su zaključili da bi oštećenje u odabranim kognitivnim domenama moglo predvidjeti rizik od recidiva i napredovanja onesposobljenosti u multiploj sklerozi s ranim početkom.

Važno istraživanje je napravio Migliore i sur. iz 2017. kojeg su proveli na 92 bolesnika s relapsno-remitentnom multiplom sklerozom čiji su EDSS rezultati bili $\leq 2,5$, a imali su oštećene kognitivne funkcije, što sugerira da se kognitivna disfunkcija može pojaviti u ranoj fazi bolesti, i treba je što ranije početi evaluirati s ciljem dijagnosticiranja i što ranijeg početka liječenja. Kognitivni deficit u bolesnika s MS-om bi mogao doprinosti usporavanju obrade informacija koja ima za posljedicu intelektualno usporavanje (usporavanje pažnje, oštećenje apstraktnog zaključivanja, rješavanja problema, te usporenja pamćenja kao razlikovna obilježja subkortikalne demencije). Uzrok bi mogao biti prekid neuronskih veza kortikalnih asocijativnih područja te između kortikalnih i subkortikalnih struktura kao posljedica demijelinizacije i degeneracija aksona.

MoCA test je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju s BDI-II testom (Tablica 20.), kao i u istraživanju Botchorishvili i sur. iz 2021. godine, što upućuje na potrebu adekvatnog liječenja poremećaja raspoloženja, koje može ublažiti kognitivne simptome. U navedenom istraživanju je postotak bolesnika s klinički značajnom depresijom veći u skupini koja prethodno nije bila liječena, što je također moglo utjecati na rezultat kognitivnog testa. Istraživanja iz 2021. godine, Kopchak i sur. u kojem je uključeno 106 pacijenata s RRMS-om je pokazana signifikantna

pozitivna korelacija MoCA i BDI testa. Nagasili su da se vrlo često takve tegobe ne pregledaju na odgovarajući način i zanemaruju. Istodobno, depresija može utjecati na kognitivno oštećenje, osobito u slučaju bolesnika mlađih od 40 godina. Rezultati njihovog istraživanja naglašavaju da svi pacijenti s multiplom sklerozom zahtijevaju obavezni temeljiti pregled kognitivnih funkcija i depresije u ranim fazama bolesti, s ciljem sprječavanja daljnjeg invaliditeta takvih pacijenata.

Istraživanja Borkowske i sur. iz 2021. godine koje je rađeno na malom broju ispitanika, 22 kojima je dijagnosticirana RRMS u fazi remisije i 22 zdrave kontrola je također pokazalo signifikantnu pozitivnu korelaciju MoCA i BDI testa. U navedenom istraživanju su svi pacijenti s RRMS-om u fazi remisije pokazali barem jedan kognitivni deficit, opažen u općem kognitivnom funkcioniranju, apstraktnom zaključivanju ili drugim izvršnim funkcijama, tj. fluentnosti, planiranju ili sposobnosti modificiranja aktivnosti kao odgovor na povratnu informaciju.

Dob je statistički značajno korelirala sa stupnjem onesposobljenosti (EDSS), brojem Gd+ lezija i kognitivnim odstupanjem (Tablica 18.). Rezultati su pokazali da ispitanici s većom onesposobljenošću (EDSS) imaju više vrijednosti malondialdehida (MDA), te viši stupanj kognitivnog i depresivnog odstupanja, te broja MR lezija: T1,T2,FLAIR (Tablica 19.).

5.1.4. Broj MR lezija (T1,T2, FLAIR) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Broj MR lezija (T1,T2,FLAIR) je pokazao značajnu negativnu korelaciju sa stupnjem kognitivnog odstupanja analiziranog MoCA testom (Tablica 22). Isti zaključak su imali Shaaban i sur. 2021. godine koji su pokazali značajnu inverznu korelaciju MoCA testa s ukupnim brojem lezija. Cilj njihovog istraživanja je bio procijeniti korelaciju kortikalnih lezija kod 30 ispitanika oboljelih od multiple skleroze (MS) uz DIR sekvencu (dvostruku inverziju, engl. *double inversion recovery*) s rezultatima kognitivnog probira. Svi su bili podvrgnuti magnetskoj rezonanci i kliničkoj procjeni s izračunom Proširene ljestvice statusa invaliditeta (EDSS), Montrealske kognitivne procjene (MoCA) i testa modaliteta znakova simbola (SDMT).

Elmaaty i sur. su u istraživanju iz 2019. koje je ispitivalo povezanost između MR-a mozga, MoCa i EDSS testova na 50 MS pacijenata i 25 zdravih kontrola, zaključili da bolesnici s MS-om s kognitivnim oštećenjem imaju viši EDSS nego bolesnici s MS-om s normalnom kognicijom sa statistički značajnim razlikama između EDSS-a obje skupine. U njihovom

istraživanju ukupan broj demijeliniziracijskih lezija nije pokazao statistički značajne razlike između kognitivno abnormalnih i kognitivno normalnih MS pacijenata. Zaključili su, iako su konvencionalne MRI tehnike ključne u dijagnostičkoj obradi MS-a, njihova je točnost u procjeni i predviđanju kognitivne disfunkcije manje relevantna. MoCA test bi pružio kratku provjeru kognitivne disfunkcije u MS-u.

Ashrafi i sur. su 2016. god. napravili istraživanje na 46 pacijenata s multiplom sklerozom. Iako nisu uspoređivali ukupni broj MR lezija s MoCA testom, pokazali su da kognitivni poremećaji koje detektira MoCA mogu biti povezani s nekim patološkim promjenama uključujući atrofiju, volumen treće klijetke i jukstakortikalne lezije, ali nisu našli korelaciju MoCA testa s volumenom moždanih lezija kod MS pacijenata.

Ne smijemo zaboraviti da smanjenjem upale i broja demijelinizacijskih lezija T1 i T2, terapije koje modificiraju bolest mogu imati korisne učinke na kogniciju (Niccolai i sur., 2017.).

5.2. Molekularni biomarkeri upale, neuralni i bološki biljezi antioksidacijske obrane u serumu

Koncept da je upala središnjeg živčanog sustava uvijek štetna kod EAE/MS-a osporavan je u posljednjem desetljeću, a sada postoje snažni dokazi koji podupiru zaštitni protumehanizam induciran upalom koji ima za cilj ponovno uspostavljanje imuno-privilegiranog statusa središnjeg živčanog sustava ubrzo nakon patogenog događaja. Neurotrofini se sada smatraju ključnim igračima u patogenetskom scenariju imunosne upale SŽS-a. BDNF se posebno čini ključnim regulatorom neuropalnih mehanizama i popravka mijelina nakon oštećenja uzrokovanog imunosnim sustavom (Lai i sur., 2018.). Unatoč tome, ne postoji potpuno razumijevanje točne uloge proBDNF-a i BDNF-a u multiploj sklerozi.

5.2.1. BDNF u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

U serumu zdravih i ispitanika s MS-om, BDNF je pokazao statistički značajnu razliku ($P < 0,001$). U ovom istraživanju su vrijednosti BDNF-a značajno više u skupini ispitanika s MS-om (Tablica 11.), što je u suprotnosti s istraživanjem Naegelina i sur. iz 2020. godine, koje je rađeno na 259 oboljelih od multiple skleroze i 259 zdravih kontrola, ali se može objasniti aktivnošću bolesti te podržavanjem hipoteze o neuroprotektivnom učinku BDNF-a koji proizvode upalne stanice za promicanje preživljavanja i remijelinizacije prema istraživanju iz

2002. Sarchielli i sur. napravljeno na 35 ispitanika s multiplom sklerozom (20 RRMS, 15 SPMS) i 20 zdravih kontrola. Sedam RRMS pacijenata procijenjeno je tijekom relapsa, u kasnijoj fazi oporavka, te 3 mjeseca nakon relapsa. Na temelju ovoga, može se pretpostaviti neuroprotektivni učinak BDNF-a koji proizvode upalne stanice tijekom relapsa MS-a, što može pogodovati remijelinizaciji.

Weinstock-Guttman i sur. su 2007. napravili istraživanje na 52 pacijenta s RRMS-om, kojem je cilj bio istražiti odnos između izlučivanja BDNF-a iz imunskih stanica s kliničkim i MRI varijablama u bolesnika s multiplom sklerozom (MS). Otkrili su da je proizvodnja BDNF-a iz imunskih stanica povezana s povećanom upalnom aktivnošću u bijeloj tvari i s mikroskopskim oštećenjima kod pacijenata s MS-om, i sugerirali su da izlučivanje BDNF-a iz imunskih stanica može biti uključeno u početne faze patogeneze MS-a.

Također su moguće povišene razine BDNF-a radi pojačane fizičke aktivnosti ispitanika s MS-om, u odnosu na sjedilački način života zdravih kontrola. U prilog navedenom govori Belgijsko istraživanje Wens i sur. iz 2016., koje je pokazalo povišene razine BDNF-a kod grupe koja se bavila fizičkom aktivnosti. Cilj istraživanja je bio usporediti BDNF profil u mirovanju zdravih osoba i osoba s relapsno-remitentnom multiplom sklerozom, te istražiti utjecaj 24-tjednog vježbanja na oslobađanje BDNF-a u serumu kod ispitanika s multiplom sklerozom. Nedostatak istraživanja je mali broj ispitanika, 22 s relapsno remitentnom multiplom sklerozom od kojih je bilo 15 ispitanika koji su vježbali i 7 koji nisu vježbali, te 19 zdravih kontrola. Pokazali su nižu koncentraciju BDNF-a kod osoba s RRMS-om u usporedbi sa zdravim kontrolama i povećanu nakon 24 tjedna vježbanja kod osoba s MS-om, u usporedbi s kontrolnom grupom MS-a koja nije vježbala.

Shobeiri i sur. su 2022. godine napravili meta-analizu 13 istraživanja koja je uključila 271 ispitanika, a proučavali su utjecaj vježbanja na razine BDNF-a i definiranje komponenti koje ih moduliraju kroz klinička ispitivanja vježbanja u odraslih osoba koje žive s multiplom sklerozom. Zaključeno je da su koncentracije BDNF-a signifikantno više nakon vježbanja.

Petereit je u istraživanju iz 2003. pokazao da je razina BDNF-a viša u bolesnika s RRMS-om u usporedbi s kontrolnom skupinom zbog efekta imunomodulacijske terapije, što bi se moglo povezati i s ovim istraživanjem u kojem je 80% ispitanika s RRMS-om na terapiji, a 20% bez terapije. Istraživanja iz 2015., godine (Damasceno i sur.) nije pokazalo značanju razliku u razinama BDNF-a kod ispitanika s MS-om u odnosu na zdrave kontrole, n.vj. jer je rađena na

samo 21 ispitaniku s RRMS i 9 zdravih kontrola. Možda bi veći broj ispitanika pokazao signifikantne razlike između ispitivanih skupina.

Upalne i neurodegenerativne promjene vidljive u mozgu bolesnika s MS-om mogu dovesti do progresivne invalidnosti i povećanja atrofije mozga. Stoga bi terapije koje promiču urođenu sposobnost središnjeg živčanog sustava da kompenzira disfunkciju uzrokovanu ozljedom mozga mogle biti vrlo korisne kod MS-a. Međutim, kao preduvjet, razvoj takvih strategija zahtijeva dobro utemeljeno znanje o tome u kojoj je mjeri središnja plastičnost netaknuta i dostupna kod pacijenata s multiplom sklerozom, te je li uopće funkcionalno relevantna, u čemu nam može pomoći analiza razine BDNF-a. Točno mjerenje razine BDNF-a u krvi moglo bi poslužiti kao potencijalni biomarker MS-a, s obzirom na njegovu prisutnost u cirkulaciji, pa čak i ako je visoko koncentriran u moždanom tkivu. Od dalje bi važnosti bila kvantifikacija pojedinačnih cirkulirajućih razina prekursora i zrelog BDNF-a, s obzirom na različite posredovane učinke. Međutim, moguće je potvrditi da do sada ne postoje učinkoviti tretmani MS-a, a veliko poznavanje mehanizama i putova koji su uključeni u disfunkciju BDNF-a neophodno je za razvoj prikladnih strategija za patološki scenarij MS-a, kao i za sugeriranje disfunkcije BDNF-a kao potencijalni MS biomarker koristan u ranoj dijagnozi i prognozi.

Budući da se BDNF koji proizvode neuroni može transportirati u anterogradnom smjeru, njegovo oslobađanje na mjestima lezija u MS-u može pružiti dodatnu pomoć potpornom djelovanju koje već provodi BDNF koji lokalno oslobađaju imunostanice (makrofagi i limfociti T). Nadalje, anterogradni transport BDNF-a povećava se nakon oštećenja aksona. Nasuprot tome, u progresivnim stadijima bolesti, karakteriziranim nedostatkom anterogradnog aksonskog transporta zbog smanjene ekspresije proteina koji pripadaju obitelji kinezina, učinkovitost zaštitnih funkcija BDNF-a može biti izgubljena ili smanjena (Schiro i sur., 2022.).

5.2.2. Interleukin-6 (IL-6) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Vrijednosti interleukina-6 su se statistički značajno razlikovale između ispitivane i kontrolne skupine (Tablica 13.), dobivene su više vrijednosti Interleukina-6 kod ispitanika s MS-om u usporedbi sa zdravima (Slika 21.). Slični rezultati su objavljeni u istraživanju iz 2020. godine autora Eslami i sur., koji su zaključili da bi IL-6 mogao biti biljeg progresije bolesti. Uključeno je 103 pacijenta s multiplom sklerozom, od kojih 51 s RRMS, 25 SPMS, 27 PPMS, te 80 zdravih kontrola. MS pacijenti sa SPMS-om imali su izraženije razine IL-6 od RRMS-a ili PPMS-a ($P=0,008$). Zaključuju da povećana razina IL-6 u serumu u uznapredovaloj multiploj

sklerozi, sekundarno progresivnoj multiploj sklerozi, sugerira da bi IL-6, mogao biti prognostički biljeg za pogoršanje bolesti.

Istraživanje Petržalka i sur. iz 2022. koje je ispitivalo postoji li mogućnost boljeg predviđanja težine bolesti kod bolesnika s tek dijagnosticiranom multiplom sklerozom. Uključeno je 58 bolesnika nakon prve manifestacije multiple skleroze, s ciljem procjene prognostičke vrijednosti intratekalne sinteze IgM, te serumskih i likvorskih razina IL-2, IL-6, IL-10, teških lanaca neurofilamenta dobivenih rano nakon početka bolesti. Zaključeno je da razine IL-2 i IL-6 iz cerebrospinalne tekućine mogu predvidjeti ranu relapsnu aktivnost bolesti.

Stelmasiak i sur. su u istraživanju iz 2000. god. istražili koncentracije pleotropnog citokina IL-6 u serumu i likvoru oboljelih od MS-a, s obzirom na kliničke okolnosti. Uključeno je 27 oboljelih od multiple skleroze, te isti broj zdravih kontrola. Najveće srednje vrijednosti koncentracija IL-6 u serumu i likvoru utvrđene su u bolesnika s duljim trajanjem bolesti, iako nisu bile statistički značajne. Autori su zaključili da sudjelovanje IL-6 u osnovnim imunskim procesima MS-a potvrđuje njegova povišena koncentracija u serumu i likvoru, njegov odnos prema težini bolesti s izraženijim porastom u cerebrospinalnoj tekućini.

Stampanoni Basi i sur. su u istraživanju iz 2020. god. ispitivali IL-6 kao mogući biomarker MS-a u likvoru istražujući njegovu detektabilnost u velikoj kohorti od 534 bolesnika s MS-om i u 103 osobe s drugim neupalnim neurološkim bolestima. Kod ovih novodijagnosticiranih pacijenata, također su istražili korelacije između detektabilnosti IL-6, MS fenotipova i karakteristika bolesti. Njihova otkrića sugeriraju da bi neke proupalne molekule iz likvora mogle biti korisne za identifikaciju onih pacijenata s multiplom sklerozom koji su skloni povećanoj aktivnosti bolesti. IL-6 bi mogao predstavljati prognostički biomarker, iako nije specifičan, budući da su povećane koncentracije IL-6 u likvoru povezane s težinom bolesti i kod neuroloških upalnih stanja osim MS-a (Wang i sur., 2015.).

Zbignev i sur. su 2000. godine utvrdili povišenu koncentraciju IL-6 u serumu i likvoru, što ukazuje na sudjelovanje u osnovnim imunskim procesima u MS-u, te njegov odnos prema težini bolesti.

5.2.3. Glutation (GSH) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Vrijednosti glutaciona (GSH) su statistički značajno više kod zdravih ($P < 0,001$) u odnosu na ispitanike s MS-om (Slika 24.), kao što je objavljeno u istraživanju Lubisavljevića i sur. 2014. godine. Uključili su 50 bolesnika s klinički izoliranim sindromom (CIS) i 57 bolesnika s relapsno remitentnom multiplom sklerozom (RRMS). Dobivene su značajno snižene vrijednosti GSH u obje ispitivane skupine u usporedbi s kontrolnim vrijednostima. Deplecije su bile izraženije u RRMS nego u CIS pacijenata ($P = 0,009$ za GSH). Rezultati pokazuju da GSH može imati veliku važnost u razvoju neuroinflamacije, te poslužiti kao biljeg koji je usko povezan s neurološkim i radiološkim znacima akutne upale SŽS-a.

U istraživanju Choi i sur. iz 2018. godine su također nađene niže vrijednosti GSH kod 21 ispitanika sa RRMS, 20 sa SPMS, te 20 s PPMS u usporedbi sa 28 zdravih kontrola. Rezultati su pokazali izrazito niži GSH u progresivnoj MS nego u RRMS, što ukazuje na izraženiju uključenost oksidativnog stresa u progresivnom stadiju MS nego u upalnom stadiju. Povezanost između GSH i atrofije mozga ukazuje na važnu ulogu oksidativnog stresa koji pridonosi neurodegeneraciji kod progresivne MS.

Calabrese i sur. su 2002. godine pokazali značajno niže vrijednosti GSH u likvoru bolesnika s MS-om, u usporedbi s kontrolama, što vjerojatno odražava niži GSH u CNS-u.

Istraživanja Van Horssena i sur iz 2011. god. pokazuje da oligodendrociti imaju posebno niske razine GSH, čineći ih osjetljivijima na oksidacijski stres, te na taj način također pridonose smanjenoj mogućnosti obnavljanja mijelinske ovojnice.

Krotenko i sur. su (2009.) godine analizirali perifernu krv 79 bolesnika s MS i 75 zdravih kontrola. Dobili su niže razine glutaciona u RRMS bolesnika u usporedbi s kontrolama, a također je utvrđena vrlo niska GR aktivnost eritrocita. Autori navode nižu razinu glutaciona u fazi remisije i u fazi egzacerbacije, kako u relapsno-remitentnoj (RRMS), tako i u sekundarno progresivnoj MS. U istom istraživanju su primjetili kompenzacijsku aktivaciju katalaze samo u bolesnika s RRMS-om.

Di Giuseppe i sur. su 2010. god. mjerili glutacion u plazmi visokom tekućinskom kromatografijom, te zaključili da nije bilo bitnih razlika u koncentraciji glutaciona između zdravih i bolesnika s MS-om. Tasset i sur. su 2012. napravili istraživanje na 24 RRMS pacijenata i 15 zdravih kontrola, te zaključili da su razine GSH u krvi oboljelih od MS-a povećane, što bi djelomično moglo biti objašnjeno porastom aktivnosti glutacion reduktaze koja regenerira GSH iz oksidacijskog oblika glutaciona. Obzirom na varijacije u mjerenjima GSH i

enzima povezanih s GSH u krvi i likvoru u različitim istraživanjima, slikovne metode koje omogućuju ne-invazivnu kvantifikaciju GSH u mozgu su korisne u pružanju točnih mjerenja u stvarnom vremenu. Choi i sur. su 2011. godine pokazali da su razine GSH u frontalno-parijetalnim dijelovima mozga pacijenata sa SPMS-om niže, u usporedbi s kontrolama, mjereno MR spektroskopijom pri jakosti polja od 3T, što ukazuje na prisutnost oksidacijskog stresa u SPMS. U drugom istraživanju koje je koristilo MRS shemu, Srinivasani sur. su 2011. godine uspjeli su generirati *in vivo* detekciju i kvantifikaciju GSH na 7T, te pokazali niske koncentracije GSH u ljudskom mozgu. Autori pokazuju da su razine GSH znatno više u sivoj nego u bijeloj tvari kod zdravih ispitanika, a kod ispitanima s RRMS-om je signifikantno snižen u sivoj tvari u odnosu na zdrave. Jasno je da ne postoji konsenzus u znanstvenoj zajednici o ulozi glutaciona u MS-u. Nema korelacije između dobi, spola, težine bolesti i biljega oksidacijskog stresa iako koncentracija GSH u frontoparijetalnoj regiji u MS-u pokazuje tendenciju smanjenja kod pacijenata s većim invaliditetom, prema procjeni EDSS-a. Međutim, korelacija nije značajna i smanjenje GSH je neizravno proporcionalano stadiju bolesti (Choi i sur., 2011.). Sukladno tome, očekuje se da je antioksidacijska aktivnost u ovih pacijenata smanjena, bez obzira na oblik MS-a (tj. RRMS ili PPMS) i stadij bolesti (tj. remisija ili recidiv); međutim, povećanje GSH i enzima uključenih u zaštitu od oksidacijskog stresa je kompenzacijski mehanizam koji štiti stanice od naknadnog oksidacijskog oštećenja (Krotenko i sur., 2009.). Jedan od uzroka povećanog GSH pokazan je stimulacijom izvanstaničnog glutamata, što ukazuje da GSH može imati neuroprotektivnu ulogu za smanjenje toksičnosti glutamata i tako utjecati na neurodegeneraciju (Srinivasan i sur., 2010.). Također, smanjenu razinu GSH u mozgu, prvenstveno u bijeloj tvari, treba uzeti u obzir, jer može poslužiti za identifikaciju pacijenata koji imaju veći rizik od progresije bolesti, i treba istražiti u smislu kako ovo smanjenje utječe na funkcionalnu i kognitivnu aktivnost (Srinivasan i sur., 2010., Choi i sur., 2011.). Očigledna proturječja mogu biti posljedica prirode pregledanih uzoraka (npr. tkivo mozga, cerebrospinalna tekućina, plazma, eritrociti), razlike u metodologiji istraživanja, i intrinzične karakteristike svakog pacijenta (npr. endogeni antioksidansi, egzogeni antioksidansi u hrani, psihička vježba). Međutim, povećanje antioksidansa podupire hipotezu da će se kao odgovor na oksidacijsko oštećenje, u pokušaju zaštite stanica, vjerojatno ranije započeti upalni odgovor, a kada je ovaj odgovor nedovoljan tada dolazi do recidiva u RRMS-u (Tasset i sur., 2012.).

5.2.4. Katalaza (CAT) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

U serumu zdravih i ispitanika s RRMS-om katalaza (CAT) je pokazala statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina, više su vrijednosti ($P < 0,001$) kod zdravih ispitanika (Tablica 16.)

Polachi i sur. su u istraživanju iz 2016. godine pokazali značajno povišene ($P < 0,05$). vrijednosti katalaze u serumu ispitanika s RRMS-om, u usporedbi sa zdravim kontrolama. Istraživanje je rađeno na 29 pacijenata s RRMS-om i 29 zdravih ispitanika. Zaključuju da promjene u ravnoteži oksidansa/antioksidansa i niže razine vitamina D, koji je također istraživani u istraživanju, mogu pridonijeti patofiziologiji MS-a.

Neka su istraživanja o aktivnosti katalaze u uzorcima periferne krvi dala dvosmislene rezultate kod MS-a. Ljubisavljević i sur. su u istraživanju iz 2013. god. utvrdili da su aktivnosti katalaze u likvoru i plazmi signifikantno povećane ($P < 0,05$) u bolesnika s RRMS-om u usporedbi sa zdravim kontrolama, a pacijenti s multiplom sklerozom s nižim EDSS-om, su imali višu aktivnost katalaze u plazmi i likvoru. Katalaza katalizira pretvorbu dvije molekule vodikovog peroksida (H_2O_2) u vodu (H_2O) u prisutnosti veće količine hidrogen peroksida. Nalazi se u peroksisomu, citosolu eritrocita i mitohondrija, uklanja štetni vodikove peroksid, te sprječava oštećenja stanica i tkiva. Utvrđeno je da je aktivnost katalaze lizata granulocita niža u bolesnika s multiplom sklerozom u usporedbi s kontrolnom skupinom.

5.3. Korelacije seroloških biomarkera sa sociodemografskim i kliničkim parametrima

5.3.1. Glutation (GSH) i MoCA u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

U ovom istraživanju GSH (glutation) je značajno pozitivno korelirao s karboniliranim proteinima i negativno sa stupnjem kognitivnog oštećenja ispitanog MoCA testom (Slika 36.). Ovo je prvo istraživanje ispitanika s RRMS-om koje je napravilo navedeno istraživanje. Vjerojatno je da promjene u regionalnim razinama GSH u mozgu mogu utjecati na kognitivnu i senzomotoričku funkciju, iako je nejasno bi li taj odnos bio vidljiv u normalnom starenju ili samo u patološkim stanjima. U istraživanju Hupfelda i sur. iz 2020. koji su testirali povezanost između razina GSH u mozgu i kognitivnih performansi na 37 mladih (prosjeak godina 21,8) i 37 starijih (prosjeak godina 72,8) zdravih osoba, su predvidjeli regionalno specifične odnose u kojima bi frontalne razine GSH bile povezane s kognitivnom izvedbom, a senzomotorne razine GSH bile bi povezane s motoričkom izvedbom. Zaključili su da nije bilo povezanosti između razine GSH i kognitivnog učinka utvrđenog MoCA testom, iako su rezultati MoCA testa

dovoljno osjetljivi da identificiraju povezanost između neurometabolita mjerenih MRS-om i kognitivnog statusa. Na osnovu ovoga istraživanja bi se moglo reći da se korelacije GSH i kognitivnog deficita pojavljuju samo u slučajevima ozbiljnijeg kognitivnog pada, kada su moždani resursi (kao što je dostupnost antioksidansa) značajno opali, znači u patološkim stanjima SŽS-a. Negativna korelacija razina glutaciona i rezultata MoCA testa u ovom istraživanju (Tablica 12.) bi mogla ukazivati na kompenzacijski odgovor GSH na oksidacijski stres i povezano oštećenje tkiva u mozgu (Hupfeld i sur., 2020.).

5.3.2. Malondialdehid (MDA) i EDSS u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

MDA je značajno pozitivno korelirao ($P < 0.025$) s EDSS-om (Slika 35.), kao i u istraživanju koje su napravili Ghonimi i sur. iz 2021. godine, u koju je uključen veći broj ispitanika (120 RRMS i 120 zdravih kontrola). Cilj ovog istraživanja je bio procijeniti serumske razine malondialdehida (MDA) kao mjere peroksidacije lipida u bolesnika s multiplom sklerozom i njezinu povezanost s karakteristikama bolesti. Pokazali su značajno više razine MDA u bolesnika s multiplom sklerozom nego u kontrolnoj skupini ($P < 0,001$), osobito tijekom relapsa, te značajnu korelaciju MDA s proširenom skalom statusa invaliditeta (EDSS) ($P < 0,001$). Rezultati navedenog istraživanja pružaju dokaze o inkriminaciji oksidacijskog stresa u patogenezi MS-a i onesposobljenosti bolesti te podržavaju upotrebu antioksidansa kao novog cilja liječenja koji se fokusira na neutralizaciju slobodnih radikala i povećava antioksidacijski kapacitet. Istraživanje Lubisaljevića i sur. iz 2013. godine je također pokazalo pozitivnu korelaciju između MDA i EDSS-a, analizirajući serum i likvor bolesnika s različitim kliničkim fenotipovima neuroupage, definirane kao klinički izolirani sindrom (CIS), i one definirane kao relapsno remitentna multipla skleroza (RRMS). Testirali su intenzitet perifernog i CNS oksidativnog stresa u ovim neuroupage akutnim atakama. Sve dobivene promjene vrijednosti procijenjene su s obzirom na kliničke i radiološke značajke upale SŽS-a. Dobiveni rezultati otkrili su povećanje razine malondialdehida u serumu i likvoru u bolesnika s CIS i RRMS u usporedbi s kontrolnim vrijednostima ($P < 0,05$). U zaključku navode da bi ova otkrića mogla biti korisna u pružanju najranijeg antioksidativnog liječenja neuroupage s ciljem očuvanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta i kapaciteta CNS-a paralelno s odgađanjem ireverzibilnih, kasnijih neuroloških poremećaja.

Slične rezultate su pokazali Eldeen i sur. u istraživanju iz 2019. godine na 40 ispitanika s RRMS i 20 zdravih u kontrolnoj skupini. Serumske razine MDA bile su značajno više u bolesnika s

relapsno-remitentnom MS nego u kontrolnoj skupini, te su bile u korelaciji sa stupnjem invaliditeta procijenjenim proširenom skalom statusa invaliditeta (EDSS). U zaključku se navodi MDA kao pouzdan biljezi oksidacijskog stresa i mogao bi se koristiti kao biljeg progresije bolesti i odgovora na liječenje u bolesnika s MS-om.

5.3.3. BDNF i broj T2/FLAIR MR lezija u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Nismo dokazali povezanost serumskih razina neurotrofina s brojem MR lezija, kao što je objavljeno u Brazilskom istraživanju u kojem je ispitivana povezanost serumskih razina BDNF-a i broja T2/FLAIR MR lezija (Comini-Frota i sur., 2012). Dokazali su negativnu korelaciju razina BDNF-a s brojem MR lezija, ali je istraživanje rađeno na malom broju od 28 ispitanika s MS-om i 28 zdravih kontrola. Neka moguća objašnjenja za ove proturječne rezultate mogle bi biti razlike u tehnikama koje se koriste za mjerenje razine BDNF-a u bolesnika s MS-om u različitim istraživanjima. Ove se metode mogu razlikovati u svojoj osjetljivosti, specifičnosti i točnosti, što utječe na preciznost i pouzdanost mjerenja. Nadalje, odabir ispitivane populacije, stadij i ozbiljnost bolesti te prisutnost komorbiditeta također mogu utjecati na mjerenja BDNF-a. Slično tome, korištenje različitih tretmana također može utjecati na razine BDNF-a kod MS pacijenata. Stoga, varijacije u mjerenjima BDNF-a u različitim istraživanjima mogu odražavati razlike u dizajnu istraživanja i odabiru uzorka. Buduća istraživanja bi trebala težiti standardizaciji metoda za mjerenje razine BDNF-a u bolesnika s MS-om kako bi se poboljšala dosljednost i usporedivost rezultata.

5.3.4. Izoforme BDNF-a, dob i EDSS u u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Nismo dolazali korelaciju izoformi BDNF-a s kliničkim ili demografskim obilježjima bolesnika s RRMS-om, kao što su dob i EDSS. Navedeno je u skladu s talijanskim istraživanjem Tongiorgi i sur. iz 2012. godine, koji su ispitali ulogu BDNF izoformi, ali na malom broju ispitanika (20 RRMS i 20 kontrola) koji nisu uzimali imunomodulacijsku terapiju.

proBDNF je pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju s BDNF-om i omjerom proBDNF/BDNF (Slika 32.).

BDNF je statistički značajno pozitivno korelirao s proBDNF-om, omjerom proBDNF/BDNF i karboniliranim proteinima (Slika 33.).

5.3.5. Karbonilirani proteini i glutation (GSH) u relapsno remitentnoj multiploj sklerozi

Karbonilirani proteini su značajno pozitivno korelirali s vrijednostima BDNF-a i glutaciona (Slika 37.). O navedenim korelacijama nema istraživanja serumskih razina ispitivanih parametara. Bizzozero i sur. su 2006. godine napravili istraživanje na rezovima mozga štakora koje je imalo za cilj utvrditi je li oksidacijski stres izazvan akutnim smanjenjem glutaciona (GSH) u mozgu dovoljan za stvaranje karboniliranih proteina. Njihovi rezultati su pokazali da se znatno povećavaju karbonilirani proteini u mozgu štakora. Iako istraživani štakori nisu bili modeli EAE, njihovi rezultati mogu biti važni u kontekstu multiple skleroze, gdje su zabilježene smanjene vrijednosti GSH, mitohondrijska disfunkcija, te progresija proizvodnje ROS-a i povećana karbonilacija proteina kao najčešća modifikacija proteina koja se odvija kao posljedica jakog oksidacijskog stresa. Karbonilacija može promijeniti funkciju proteina ili dovesti do štetnih međumolekularnih poprečnih veza i agregata koji sprječavaju njihovu razgradnju unutarstaničnim proteazama. Nakupljanje karboniliranih proteina povezano je s etiologijom i/ili progresijom nekoliko kroničnih poremećaja središnjeg živčanog sustava (SŽS), uključujući multiplu sklerozu (Bizzozero, 2009). Slično istraživanje na štakorima su napravili Zheng i sur. 2018. godine koristeći *in vitro* sustav oksidacijskog stresa, pokazali su da postoji značajan odmak između pojave karboniliranih proteina i smanjenja GSH. Prema njihovom istraživanju, nakon akutnog smanjenja GSH, proteinski karbonili nakupljaju se većinom u mitohondrijima i u manjoj mjeri u drugim substaničnim frakcijama koje također sadrže visoke razine polinezasićenih lipida. Ovaj rezultat je u skladu s njihovim prethodnim rezultatima koji sugeriraju da lipidni hidroperoksidi posreduju u oksidaciji proteina u ovom sustavu. Ova otkrića su važna u kontekstu neuroloških poremećaja koji pokazuju povećanu peroksidaciju lipida i karbonilaciju proteina kao što je u multiploj sklerozi.

Potaknuti *in vitro* istraživanjem, koje su prikazale da je nakupljanje karboniliranih proteina potaknuto nedostatkom glutaciona, dovodi do agregacije proteina i smrti neurona, Dasgupta i sur. su 2013. godine napravili istraživanje navedene povezanosti *in vivo*. Rezultati pokazuju da se karbonilirani proteini nakupljaju tijekom bolesti, iako različitim mehanizmima: povećan oksidacijski stres u akutnom EAE i smanjena proteasomalna aktivnost u kroničnom EAE. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju vezu između oksidacije proteina i smrti neuronskih/glijalnih stanica *in vivo*, te također pokazuju oslabljenu proteostazu u ovom široko korištenom mišjem modelu MS-a.

6. ZAKLJUČCI

- U ovom istraživanju je dokazan statistički značajan utjecaj serumskih razina biljega oksidacijskog stresa glutationa (GSH) na razvoj kognitivnih promjena ispitanika. Značajno negativno je korelirao sa stupnjem kognitivnog oštećenja (MoCA test).
- Na razvoj kognitivnih promjena u ovom istraživanju verificiranih MoCA testom, je statistički pozitivno značajno utjecao broj MR lezija (T1, T2, FLAIR) stupanj depresije, EDSS, dob, te vrijednosti GSH. Ispitanici s višim vrijednostima MoCA testa su bili mlađi, imali manji stupanj neurološke onesposobljenosti, bili manje depresivni i imali su manje vrijednosti glutationa i manje demijelinizacijskih lezija na MR-u.
- Broj demijelinizacijskih lezija prikazanih magnetnom rezonancijom u mjernim vremenima T1, T2 i FLAIR sekvenci je pokazao statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa stupnjem neurološke onesposobljenosti (EDSS) i testom za procjenu depresije (BDI-II). Ispitanici s većim brojem demijelinizacijskih lezija su imali veći EDSS i lošiji rezultat testa za procjenu depresije.
- U skupini ispitanika s RRMS-om dobivene su značajno statistički više vrijednosti serumskih razina IL-6, BDNF, proBDF/BDNF, dok su niže vrijednosti, glutationa (GSH) i katalaza (CAT).
- Dob je pozitivno statistički značajno korelirala s EDSS-om, što znači da su stariji ispitanici s MS-om imali više vrijednosti EDSS-a. Statistički značajna pozitivna korelacija je prikazana i sa BDI-II testom te brojem MR lezija; T1, T2 i FLAIR. Dob je negativno korelirala s MoCA testom, tako da su mlađi ispitanici imali više bodova na MoCA testu, kojim su ispitane kognitivne funkcije, a stariji manje bodova, znači razvili su kognitivni deficit.
- Nisu nađene značajne razlike u vrijednostima proBDNF-a, malondialdehida (MDA) i karboniliranih proteina između skupine ispitanika s RRMS-om i kontrolne skupine.
- Nisam dokazala korelaciju izoformi BDNF-a s kliničkim ili demografskim obilježjima bolesnika s RRMS-om, kao što su dob i EDSS, niti povezanost serumskih razina neurotrofina s brojem MR lezija.
- Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da je potrebno rano praćenje kognitivnog statusa u oboljelih od RRMS, pogotovo kod onih s većim brojem demijelinizacijskih lezija, višim stupnjem EDSS-a i kod starijih ispitanika. Također je serumska razina

glutathiona potencijalni biomarker progresije bolesti, koja bi se mogla koristiti u široj primjeni kod RRMS-a.

7. CITIRANA LITERATURA

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.

Al-Falaki TA, Hamdan FB. & Sheaaheed NM. Assessment of cognitive functions in patients with multiple sclerosis. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg.* 2021; 57:127.

Amin M, Ontaneda D. Thalamic Injury and Cognition in Multiple Sclerosis. *Front. Neurol.* 2020; 11, 623914.

Ascherio A, Munger KL. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010;5(3):271-7.

Aksoy S, Timer E, Mumcu S, Akgün M, Kırak E, Örken D. Screening for Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis with MOCA Test. *Turk J Neurol.* 2013; 19(2): 52-55

Ashrafi F, Behnam B, Arab Ahmadi M, Sanei Taheri M, Haghhighatkah HR, Pakdaman H, Kharrazi SM. Correlation of MRI findings and cognitive function in multiple sclerosis patients using montreal cognitive assessment test. *Med J Islam Repub Iran.* 2016; 17;30:357.

Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miler A, Karni A. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: Reversal by glatiramer acetate. *J. Neuroimmunol.* 2005;167:215–218.

Balta V. Bioraspoloživost, metabolizam i antioksidacijska sposobnost polifenola u organima miša C57BL/6. Disertacija. Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilište u Zagrebu 2018.

Bašić Kes V i sur. Multipla Skleroza. *Medicinska naklada,* 2021; 10-12.

Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 1994;25:1386–1403.

Beauchemin P and Carruthers R. MS arising during Tocilizumab therapy for rheumatoid arthritis. *Mult Scler* 2016; 22: 254–256.

Benedict R.H.B, Amato M.P, DeLuca J, Geurts J.J.G. Cognitive impairment in multiple sclerosis: Clinical management, MRI, and therapeutic avenues. *Lancet Neurol.* 2020; 19, 860–871.

Binzer S, McKay KA, Brenner P, Hillert J, Manouchehrinia A. Disability worsening among persons with multiple sclerosis and depression: A Swedish cohort study. *Neurology.* 2019 10;93(24):e2216-e2223.

Bizzozero OA, Reyes S, Ziegler J, Smerjac S. Lipid peroxidation scavengers prevent the carbonylation of cytoskeletal brain proteins induced by glutathione depletion. *Neurochem Res.* 2007;32(12):2114-22.

Borkowska AR, Daniluk B, Adamczyk K. Significance of the Diagnosis of Executive Functions in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;7;18(19):10527.

Boskovic Z, Alfonsi F, Rumballe B.A, Fonseka S, Windels F, Coulson E.J. The role of p75NTR in cholinergic basal forebrain structure and function. *J Neuriscience.* 2014;34:13033–13038.

Botchorishvili N, Shiukashvili N, Mikeladze N, Dzagnidze A, Mikava N, Tighashvili M, Janelidze M. Screening of Cognitive Impairment in Patients with Multiple Sclerosis: A Cross-Sectional Study in Georgia. *Neurol Res Int.* 2021;27;2021:5591078.

Brinar V i sur. *Neurologija za medicinare. Medicinska naklada.* 2009; 304-311

Brinar V i sur. *Neurologija za medicinare, 2. izdanje, Medicinska naklada.* 2019; 137-138; 324-331.

Burbach GJ, Hellweg R, Haas CA, Del Turco D, Deicke U, et al. Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice. *J Neurosci.* 2004;24: 2421-2430

Cagol A, Schaedelin S, Barakovic M, et al. Association of Brain Atrophy With Disease Progression Independent of Relapse Activity in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2022;79(7):682–692.

Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, et al. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *J Neurosci Res.* 2002;70:580–587

Castellano V, White L.J. Serum brain-derived neurotrophic factor response to aerobic exercise in multiple sclerosis. *J Neurological Sci.* 2008;269:85–91.

Cao L, Lin EJ, Cahill MC, Wang C, Liu X, During MJ. Molecular therapy of obesity and diabetes by a physiological autoregulatory approach. *Nat Med.* 2009;15(4):447-54.

Carotenuto A, Moccia M, Costabile T, Signoriello E, Paolicelli D, Simone M, et al. Associations between cognitive impairment at onset and disability accrual in young people with multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2019;9:18074.

Cathomas F, Vogler C, Euler-Sigmund JC, de Quervain DJ, Papassotiropoulos A. Fine-mapping of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene supports an association of the Val66Met polymorphism with episodic memory. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010;13(8):975-80.

Charest K, Tremblay A, Langlois R, Roger É, Duquette P, Rouleau I. Detecting Subtle Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis with the Montreal Cognitive Assessment. *Can J Neurol Sci.* 2020;47(5):620-626.

Chen J, Chia N, Kalari KR, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* 2016;6:28484.

Choi I-Y, Lee P, Adany P, et al. In vivo evidence of oxidative stress in brains of patients with progressive multiple sclerosis. *MS Journal.* 2018;24(8):1029-1038.

Comi G. Effects of disease modifying treatments on cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2010;(2):S261-4.

Comini-Frota ER, Rodrigues DH, Miranda EC, Brum DG, Kaimen-Maciel DR, Donadi EA, Teixeira AL. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with the number of T2 MRI lesions in multiple sclerosis. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(1):68-71.

Dagenais E, Rouleau I, Demers M, Jobin C, Roger E, Chamelian L, Duquette P. Value of the MoCA test as a screening instrument in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 2013;40(3):410-5.

Damasceno A., Damasceno B.P., Cendes F., Damasceno A., Moraes A.S., Farias A., dos Santos L.M.B. Serum BDNF levels are not reliable correlates of neurodegeneration in MS patients. *Mult Scler Relat Disord.* 2015;4:65–66.

Dasgupta A, Zheng J, Perrone-Bizzozero NI, Bizzozero OA. Increased Carbonylation, Protein Aggregation and Apoptosis in the Spinal Cord of Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *ASN Neuro.* 2013;5(2).

Davis DH, Creavin ST, Yip JL, Noel-Storr AH, Brayne C, Cullum S et al. Montreal Cognitive Assessment for the diagnosis of Alzheimer's disease and other dementias. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;CD010775.

Dempster E, Toulopoulou T, McDonald C, Bramon E, Walshe M, Filbey F, Wickham H, Sham PC, Murray RM, Collier DA. Association between BDNF val66 met genotype and episodic memory. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;134B(1):73-5.

Di Giuseppe D, Ulivelli M, Bartalini S, Battistini S, Cerase A, Passero S, et al. Regulation of redox forms of plasma thiols by albumin in multiple sclerosis after fasting and methionine loading test. *Amino Acids.* 2010; 38 (5): 1461–71.

Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis—A review. *Eur. J. Neurol.* 2019; 26, 27–40.

Dringen R, Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. *Biologic Chem.* 2003; 384: 505–516.

Dyment DA, Herrera BM, Cader MZ, et al. Complex interactions among MCH haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(14):2019-26.

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell.* 2003;112(2):257-69.

Eldeen E, El Sharkawy RE, Abd El Azim GS, Mohamed NA, Abd Elmajed MZ. Role of nitric oxide and malondialdehyde biomarkers in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Scientific J of AL-Azhar Med Faculty.* 2019;544-549.

Elmaaty A.A, Flifel M.E, Zarad C.A. Correlation between brain magnetic resonance imaging, cognitive dysfunction and physical disability in multiple sclerosis. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg.* 2019;54-55.

Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin SA, Vieira VJ, Woods JA, McAuley E, Kramer AF. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J Neurosci.* 2010;14;30(15):5368-75.

Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T. & Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature;* 1996; 381, 706–709.

Fischer MT, Sharma R, Lim JL, et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 2012; 135: 886–899.

Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti C.F., Rauschka H., Schmidbauer M., Laursen H., Sorensen P.S., Lassmann H. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;132:1175–1189.

Frota ER., Rodrigues DH, Donadi EA, Brum DG, Maciel DR, Teixeira AL. Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) after multiple sclerosis relapse. *Neurosci. Lett.* 2009;460:130–132.

Graber JJ, Dhib-Jalbut S. Protective autoimmunity in the nervous system. *Pharmacol.Ther.* 2009;121:147–159.

Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci.* 2009;29(41):12764-7.

Göbel, K, Ruck T, Meuth SG. Cytokine signaling in multiple sclerosis: Lost in translation. *Mult. Scler. J.* 2018; 24, 432–439.

Habek M, Borovecki F, Brinar VV. Genomics in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010;112(7):621-4.

Hafler DA, Compston A. Risk alleles for multiple sclerosis indentified by a genome wide study. *N Engl J Med.* 2007;357(09):851-62.

Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, Weinberger DR. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci.* 2003; 30;23(17):6690-4.

Hernan MA, Olek MJ, Ascherio A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol.* 2001;154:69-74. 2010;5(3):217-7.

Höftberger R, Lassmann H, Berger T. Pathogenic autoantibodies in multiple sclerosis — from a simple idea to a complex concept. *Nat Rev Neurol*;2020;18, 681–688.

Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: Implications for the therapy of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2000;107:161–166.

Horch HW. & Katz LC. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nature Neurosci.* 2002;5,1177–1184.

Hu ZL, Luo C, Hurtado PR, Li H, Wang S, Hu B, Xu JM, Liu Y, Feng SQ, Hurtado-Perez E, et al. Brain-derived neurotrophic factor precursor in the immune system is a novel target for treating multiple sclerosis. *Theranostics.* 2021;11:715–730.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677–736.

Hupfeld KE, Hyatt HW, Alvarez Jerez P, Mikkelsen M, Hass CJ, Edden RAE, Seidler RD, Porges EC. In Vivo Brain Glutathione is Higher in Older Age and Correlates with Mobility. *Cereb Cortex.* 2021;31(10):4576-4594.

Johansson S, Gottberg K, Kierkegaard M, Ytterberg C. Variations in and predictors of the occurrence of depressive symptoms and mood symptoms in multiple sclerosis: a longitudinal two-year study. 2016;BMC Neurol 16, 32.

Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients* 2012; 4: 1399–1440.

Kalinowska-Lyszczarz A, Losy J. The role of neurotrophins in multiple sclerosis-pathological and clinical implications. *Int J Mol Sci.* 2012;13:13713.

Kang H. & Schuman, E. M. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science.* 1995;267, 1658–1662.

Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med.* 1999;189: 865-870

Kishi T, Yoshimura R, Ikuta T, Iwata N. Brain-derived neurotrophic factor and major depressive disorder: evidence from meta-analyses. *Front Psychiatry.* 2018;8:308.

Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Etrrup A, Rios M, Knudsen GM, Aznar S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2011;14:347–353.

Kleiter I, Ayzenberg I, Araki M, Yamamura T, Gold R, Tocilizumab MS and NMOSD. *Mult Scler J.* 2016;22;1891–1892.

Koch M, Uyttenboogaart M, van Harten A, Heerings M, De Keyser J. Fatigue, depression and progression in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008;14(6):815-22.

Krotenko NV, Alifirova VM, Ivanova SA. Parameters of antioxidant protection in multiple sclerosis (in Russian). *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2009; 109 (7 Suppl 2): 53–6.

Ksiazek-Winiarek DJ, Szpakowski P, Glabinski A. Neural Plasticity in Multiple Sclerosis: The Functional and Molecular Background. *Neural Plast.* 2015; 2015:307175.

Kopchak OO, Odintsova TA. Cognitive impairment and depression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis depending on age and neuroimaging findings. *Egypt J Neurol Psychiatr Neurosurg.* 2021;57(1):119.

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 1983;33:1444–52.

Lai SW, Chen JH, Lin HY, Liu YS, Tsai CF, Chang PC, Lu DY, Lin C. Regulatory Effects of Neuroinflammatory Responses Through Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Microglial Cells. *Mol Neurobiol.* 2018;55(9):7487-7499.

Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;1;8(3).

Lazzarotto A, Margoni M, Franciotta S, Zywicki S, Riccardi A, Poggiali D, Anglani M, Gallo P. Selective Cerebellar Atrophy Associates with Depression and Fatigue in the Early Phases of Relapse-Onset Multiple Sclerosis. *Cerebellum.* 2020;19(2):192-200.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994;233: 346–357

Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:289-317.

Linker RA, Lee DH, Demir S, Wiese S, Kruse N, Siglienti I, Gerhardt E, Neumann H, Sendtner M, Lühder F, Gold R. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain.* 2010;133(Pt 8):2248-63.

Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):603-14.

Luo C, Jian C, Liao Y, et al. The role of microglia in multiple sclerosis, *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017;13;1661-7.

Louapre C., Lubetzki C. Neurodegeneration in multiple sclerosis is a process separate from inflammation: *Yes Mult Scler.* 2015;21:1626–1628.

Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Kocic G, Savic D, Cvetkovic T, Pavlovic D. Cerebrospinal fluid and plasma oxidative stress biomarkers in different clinical phenotypes of neuroinflammatory acute attacks. *Conceptual accession: From fundamental to clinic. Cell Mol Neurobiol.* 2013; 33, 767–777.

Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Cvetkovic T, et al. Glutathione homeostasis disruption of erythrocytes, but not glutathione peroxidase activity change, is closely accompanied with neurological and radiological scoring of acute CNS inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2014; 21: 13–20.

Maier S, Buruian M, Maier A, Moțățăianu A, Voidăzan S, Bajkó Z, Bălașa R. The determinants of depression in a Romanian cohort of multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Belg.* 2016;116(2):135-43.

Marrie RA, Horwitz RI. Emerging effects of comorbidities on multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;9(8):820-828

McKay KA, Tremlett H, Fisk JD, Zhang T, Patten SB, Kastrukoff L, Campbell T, Marrie RA; CIHR Team in the Epidemiology and Impact of Comorbidity on Multiple Sclerosis. Psychiatric comorbidity is associated with disability progression in multiple sclerosis. *Neurology.* 2018;10;90(15):e1316-e1323.

McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci.* 1998 Jul 15;18(14):5354-65.

Mesaroš S, Rocca MA, Kacar K, Kostić J, Copetti M, Stošić-Opincal T, Preziosa P, Sala S, Riccitelli G, Horsfield MA, Drulović J, Comi G, Filippi M. Diffusion tensor MRI tractography and cognitive impairment in multiple sclerosis. *Neurology.* 2012; 78(13):969-975.

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.

Migliore S, Ghazaryan A, Simonelli I, Pasqualetti P, Squitieri F, Curcio G, Landi D, Palmieri MG, Moffa F, Filippi MM, Vernieri F. Cognitive Impairment in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients with Very Mild Clinical Disability. *Behav Neurol.* 2017;2017:7404289.

Miller E, Morel A, Redlicka J, Millet I, Saluk J. Pharmacological and non pharmacological therapies of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Curr Neuropharmacol* 2018; 16(4): 475-483.

Mizoguchi Y, Nabekura J. Sustained intracellular Ca^{2+} elevation induced by a brief BDNF application in rat visual cortex neurons. *Neuroreport*. 2003;14(11):1481-3.

Mokry LE, Ross S, Timpson NJ, Sawcer S, Davey Smith G, Richards JB. Obesity and multiple sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *PloS Med*. 2016;13(6).

Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;62(1):60-5.

Naegelin Y, Saeuberli K, Schaedelin S, Dingsdale H, Magon S, Baranzini S, Amann M, Parmar K, Tsagkas C, Calabrese P, et al. Levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7:2251–2261.

Naegelin Y, Dingsdale H, Säuberli K, Schädelin S, Kappos L, Barde YA. Measuring and Validating the Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Human Serum. *eNeuro*. 2018;5(2)

Naegelin Y, Saeuberli K, Schaedelin S, Dingsdale H, Magon S, Baranzini S, Amann M, Parmar K, Tsagkas C, Calabrese P. Levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7:2251–2261.

Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(2):83-9.

Niccolai C, Goretti B, and Amato MP. Disease modifying treatments and symptomatic drugs for cognitive impairment in multiple sclerosis: where do we stand? *Mult Scler and Demyelinating Disord*, 2017;2;8

Nociti V. What is the role of Brain derived neurotrophic factor in Multiple Sclerosis neuroinflammation? *Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7:291–299.

Nociti V; Romozzi M. The Role of BDNF in Multiple Sclerosis Neuroinflammation. *Int. J Mol Sci*. 2023, 24, 8447.

Ohl K, Tenbrock K, Kipp M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp Neurol*. 2016;277:58-67.

Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet.* 2008;9(7):516-26.

Oraby MI, El Masry HA, Abd El Shafy SS, Abdul Galil EM. Serum level of brain-derived neurotrophic factor in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: A potential biomarker for disease activity. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg.* 2021;57:40.

Patanella AK1, Zinno M. Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients *J. Neurosci Res.* 2010;88(5):1106-12.

Petereit HF, Lindemann H, Schoppe S. Effect of immunomodulatory drugs on in vitro production of brain-derived neurotrophic factor. *Mult Scler.* 2003 Feb;9(1):16-20.

Petržalka M, Meluzínová E, Libertínová J, Mojžišová H, Hanzalová J, Ročková P, Elišák M, Kmetonyová S, Šanda J, Sobek O, Marusič P. IL-2, IL-6 and chitinase 3-like 2 might predict early relapse activity in multiple sclerosis. *PLoS One.* 2022;17(6):e0270607.

Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS, Callicott JH, Kolachana BS, Straub RE, Egan MF, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci.* 2004;10;24(45):10099-102.

Rajda C, Pukoli D, Bende Z, et al. Excitotoxins, Mitochondrial and Redox Disturbances in Multiple sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):353.

Reich D, Lucchinetti C, Calabresi A, Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2018; 378:169-180.

Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules.* 2018;23(2):509.

Riise T, Nortvedt MW, Ascherio A. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology* 2003; 61(8):1122-4.

Rosca EC, Simu M. Montreal cognitive assessment for evaluating cognitive impairment in multiple sclerosis: a systematic review. *Acta Neurol Belg.* 2020;120(6):1307-1321.

Rossetti HC, Lacritz LH, Cullum CM, Weiner MF. Normative data for the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) in a population – based sample. *Neurology* 2011;77: 1272-5.

Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(6 Pt A):1218-27.

Saadat S, Hosseini-zhad M, Bakhshayesh B, Seyed Saadat SN, Nabizadeh SP. Prevalence and predictors of depression in Iranian patients with multiple sclerosis: a population-based study. *Neurol Sci.* 2014;35,735–740.

Sarchielli P, Greco L, Stipa A, Floridi A, Gallai V. Brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002;132(1-2):180-8.

Schirò G, Iacono S, Ragonese P, Aridon P, Salemi G, Balistreri CR. A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System: A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis? *Front Neurol.* 2022;13:917527.

Schreibelt G, Musters RJ, Reijerkerk A, et al. Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J Immunol* 2006; 177: 2630–2637

Shaaban SM, Elmongui AE, Razek AAK.A. Correlation of cortical lesions of multiple sclerosis at double inversion recovery with cognition screening scores. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg.* 2021;57, 32.

Shobeiri P, Karimi A, Momtazmanesh S, Teixeira AL, Teunissen CE, van Wegen EEH, Hirsch MA, Yekaninejad MS, Rezaei N. Exercise-induced increase in blood-based brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in people with multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis of exercise intervention trials. *PLoS One.* 2022;17(3):e0264557.

Shimizu, E., Hashimoto, K. & Iyo, M. Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val166met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004;126B, 122–123.

Sies, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr. Opin. Toxicol.* 2018,7,122–126.

Srinivasan R, Ratiney H, Hammond-Rosenbluth KE, et al. MR spectroscopic imaging of glutathione in the white and gray matter at 7 T with an application to multiple sclerosis. *Magnet Res Imag* 2010; 28:163–170.

Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Brück W, Hohlfeld R, et al. (2002) BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 125: 75-85.

Stampanoni Bassi M, Iezzi E, Drulovic J, Pekmezovic T, Gilio L, Furlan R, Finardi A, Marfia GA, Sica F, Centonze D, Buttari F. IL-6 in the Cerebrospinal Fluid Signals Disease Activity in Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:120.

Stelmasiak Z, Koziół-Montewka M, Dobosz B, et al. Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research.* 2000;6(6):1104-1108.

Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science.* 2008;319(5870):1683-7.

Tasset I, Aguera E, Sanchez-Lopez F, et al. Peripheral oxidative stress in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem* 2012; 45: 440–444.

Tauil CB, Grippe TC, Dias RM, Dias-Carneiro RPC, Carneiro NM, Aguilar ACR, Silva FMD, Bezerra F, Almeida LK, Massarente VL, Giovannelli EC, Tilbery CP, Brandão CO, Santos LMB, Santos-Neto LD. Suicidal ideation, anxiety, and depression in patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2018;76(5):296-301.

The Montreal Cognitive Assessment MoCA. Dostupno na stranici: <http://www.mocatest.org>
Datum pristupa: 30. 12. 2013.

Thompson AJ, Banwel BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2)162-73.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969;(3):502-22.

Tongiorgi E, Sartori A, Baj G, Bratina A, Di Cola F, Zorzon M, Pizzolato G. Altered serum content of brain-derived neurotrophic factor isoforms in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2012;320(1-2):161-5.

Van Horssen J, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(2):141-50.

Vogel SJ, Banks SJ, Cummings JL, Miller JB. Concordance of the Montreal cognitive assessment with standard neuropsychological measures. *Alzheimer's Dementia: Diagn Assess Dis Monit.* 2015;1:289–94.

Wang JB, Li H, Wang LL, Liang HD, Zhao L, Dong J. Role of IL-1 β , IL-6, IL-8 and IFN- γ in pathogenesis of central nervous system neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):16658-63.

Wang AK, Miller BJ. Meta-analysis of cerebrospinal fluid cytokine and tryptophan catabolite alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Schizophr Bull*. 2018;44(1):75–83. doi: 10.1093/schbul/sbx035

Wens I, Keytsman C, Deckx N, Cools N, Dalgas U, Eijnde B.O. Brain derived neurotrophic factor in multiple sclerosis: Effect of 24 weeks endurance and resistance training. *Eur J Neurol*. 2016;23:1028–1035.

Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Tamaño-Blanco M, Abdelrahman N, Badgett D, Durfee J, Hussein S, Feichter J, Patrick K, Benedict R, et al. Immune cell BDNF secretion is associated with white matter volume in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007;188:167–174.

Witte ME, Mahad DJ, Lassmann H, et al. Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis. *Trends Molec Med*. 2014; 20: 179–187.

Xu, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neurosci*. 6, 736–742 (2003).

Yamada, K., Mizuno, M. & Nabeshima, T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci*. 2002;70, 735–744.

Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev. Neurobiol*. 2010;70, 304–322.

Zadro I. Čimbenici rizika i patogeneza multiple skleroze. *Medix*. 2020; 54-58.

Zheng J, Hu CL, Shanley KL, Bizzozero OA. Mechanism of Protein Carbonylation in Glutathione-Depleted Rat Brain Slices. *Neurochem Res*. 2018;43(3):609-618.

8. POPIS KRATICA

BBB	krvno moždana barijera (engl. <i>blood-brain barrier</i> , BBB)
BDI-II	Beckov upitnik za depresiju II (engl. <i>Beck depression inventory II</i> , BDI-II)
BDNF	moždani neurotrofni čimbenik (engl. <i>brain derived neurotrophic factor</i> , BDNF)
CAT	katalaza (engl. <i>catalase</i> , CAT)
CIS	klinički izolirani sindrom (eng. <i>clinically isolated syndrome</i> , CIS)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , DNA)
EAE	eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (engl. <i>experimental Autoimmune encephalomyelitis</i> , EAE)
EBNA	Epstein-Barr nuklearni antigen (engl. <i>Epstein-Barr nuclear antygen</i> , EBNA)
EBV	Epstein Bar virus (engl. <i>Epstein-Barr virus</i> , EBV)
EDSS	proširena skala stanja invaliditeta u MS (engl. <i>expanded disability status scale</i> , EDSS)
ELISA	enzimski povezani imunosorbentni test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , ELISA)
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
fMRI	funkcionalna magnetna rezonancija (engl. <i>functional magnetic resonance imaging</i> , fMRI)
MAGNIMS	magnetic resonance imaging in MS
MoCA	Montrealska ljestvica kognitivne procjene (engl. <i>Montreal cognitive assessment scale</i> , MoCA)
Gd	gadolinijski kontrast
GSH	glutation
H ₂ O ₂	vodikov peroksid (engl. <i>hydrogen peroxide</i> , H ₂ O ₂)
HLA	sustav tkivne podudarnosti (engl. <i>human leukocyte antigens</i> , HLA)
IL-6	interleukin 6
MCH	glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. <i>major hystocompatibility complex</i> , MCH)
MS	multipla skleroza
MAD	malondialdehid
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza
m-BDNF	zrela BDNF izoforma (engl. <i>mature brain derived neurotrophic factor</i> , m-BDNF)

MPO	mijeloperoksidaza
MR	magnetna rezonancija
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAWM	lezije bijele tvari normalnog izgleda (engl. <i>normal appearing white matter</i> , NAWM)
NO	dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i> , NO)
OPC	stanica oligodendrocitnog prekursora (engl. <i>oligodendrocyte progenitor cell</i> , OPC)
PC	karbonilirani proteini (engl. <i>protein carbonylated</i> , PC)
proBDNF	prekursor moždanog neurotrofnog čimbenika
p75NTR	p75 neurotrofinski receptor
T1	vrijeme uzdužne relaksacije (engl. <i>longitudinal relaxation time</i> , T1)
T2	vrijeme poprečne relaksacije (engl. <i>transverse relaxation time</i> , T2)
TrkB	tirozin kinaza B receptor
ROS	reaktivne vrste kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> , ROS)
RRMS	relapsno remitentna multipla skleroza
SPSS	statistički softverski paket (engl. <i>statistical product and service solutions</i> , SPSS)
TCA	trikloroocetna kiselina (engl. <i>trichloroacetic acid</i> , TCA)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (engl. <i>tumor necrosis factor</i> , TNF)
SABC	radna otopina HRP-Streptavidin Conjugata (engl. <i>streptavidin antibody conjugate</i> , SABC)
SŽS	središnji živčani sustav

9. PRILOZI

INFORMIRANI PRISTANAK NA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

NASLOV ISTRAŽIVANJA: „Međuodnos BDNF, IL-6 i pokazatelja oksidacijskog stresa pri demijelinizacijskim oštećenjima“

MJESTO ISTRAŽIVANJA: OB Dubrovnik, R. Mišetića 2, 20000 Dubrovnik, Hrvatska

IME I PREZIME VODITELJA ISTRAŽIVANJA: Andrijana Bogoje Raspopović, dr.med.

Kontakt: abogoje@gmail.com, 091 486 4999

Poštovani,

pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem se ispituje utjecaj BDNF, IL-6 i pokazatelja oksidacijskog stresa pri demijelinizacijskim oštećenjima. Želimo da sudjelujete zato što bolujete od relapsno-remitirajuće multiple skleroze ili sindroma kroničnog umora. Voditelj istraživanja je Andrijana Bogoje Raspopović. Istraživanje će se provesti u Dubrovniku, a financira ga Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, razred medicina u sklopu projekta: “Metabolizam kolesterola i oksidacijski stres-MetCholOx 2015“. Istraživanje je otvoreno i provodi se u svrhu izrade doktorata. Molimo Vas pažljivo pročitajte ovaj Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju u kojem se objašnjava zašto se ispitivanje provodi i koji bi mogli biti rizici za Vaše zdravlje ukoliko pristanete sudjelovati.

U slučaju da ne razumijete bilo koji dio Informiranog pristanka molimo Vas da se za objašnjenje obratite ispitivaču u istraživanju. Vaše sudjelovanje u ovom ispitivanju je dobrovoljno i možete se u bilo kojem trenutku povući. Ukoliko odlučite sudjelovati u ovom istraživanju od Vas će se tražiti da potpišete Informirani pristanak uz naznaku datuma. Informirani pristanak potpisuje i istraživač, a potpisan preslik Informiranog pristanka dobit ćete osobno prije početka navedenog istraživanja. Original Informiranog pristanka nalazi se kod istraživača ovog ispitivanja.

Liječnik - istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu. U slučaju isplaćivanja naknade potrebno je navesti izvor i iznos financiranja.

PODACI O ISTRAŽIVANJU

Pretpostavlja se da BDNF, IL-6 i biljezi (biljezi) oksidacijskog stresa imaju utjecaj na demijelinizacijski proces u multiploj sklerozi, ali mehanizmi djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni. Cilj istraživanja je spoznati ulogu navedenih parametara na oštećenja središnjeg živčanog sustava pri demijelinizacijskom procesu, te utvrditi da li su te vrijednosti u krvi povezane s brojem demijelinizacijskih lezija evidentiranih MR-om, te stupnjem onesposobljenosti, poremećajem pamćenja i raspoloženja u različitim fazama bolesti. Ispitivanje će se provesti na ispitanicima kojima je dijagnosticirana multipla skleroza, a kao kontrola skupina će biti zdrave kontrole kod kojih je isključena organsku ili psihička patologija. Istraživanje je zamišljeno na način da ćete se sa liječnikom-istraživačem susresti jednom, prilikom redovnog pregleda ili kada dođete zbog pogoršanja. Tada ćete biti upoznati s ispitivanjem i svim postupcima koji će se raditi. Po uključanju u istraživanje biti će uzeta Vaša rutinski vađena krv za dodatne analize, a liječnik-istraživač će napraviti test procjene kognitivnih sposobnosti (potrebno oko 10 minuta), te ćete ispuniti upitnik o depresiji (samoocjenska ljestvica koju samostalno popunite za 10 min. u čekaonici neurološke ambulatne). Vaša rutinski napravljena MRI (magnetna rezonanca) SŽS-a (središnjeg živčanog sustava) će biti upotrijebljena u svrhu utvrđivanja broja demijelinizacijskih lezija. Ukupno trajanje istraživanja bit će do godine dana od trenutka uključivanja u studiju. Po isteku godine dana moguće je da ćete biti telefonski kontaktirani glede Vašega zdravstvenog stanja.

MOGUĆI RIZICI I NEUGODNOSTI!

Ovo istraživanje ne uključuje nikakav rizik osim uobičajenog svakodnevnog rizika. Istraživanje ne uključuje dodatne postupke koji bi odudarali od uobičajenih dijagnostičkih postupaka.

MOGUĆE KORISTI: možete i ne morate imati izravnu medicinsku korist od sudjelovanja u ispitivanju. Moguće je da će se analizom krvi dobiti podaci koji će ukazivati na tijek bolesti, kao i pravovremeno utvrđivanje kognitivnih i promjena raspoloženja koje mogu zahtijevati dalje liječenje.

SLUČAJNI NALAZI

U slučaju da rezultati istraživanja ukažu na čimbenike koji uzrokuju ili značajno doprinose riziku za nastanak bolesti ispitanik će o tome biti obaviješten. Ispitanik također može biti obaviješten o rezultatima istraživanja na vlastiti zahtjev.

NOVI REZULTATI: ukoliko se dobiju tijekom ispitivanja, ispitanik će o njima biti obaviješten

POVJERLJIVOST I ZAŠTITA OSOBNIH PODATAKA: Osobni podaci i biološki materijal (krv) će biti korišteni samo u predloženom istraživanju. Nakon završetka istraživanja će biti uništen. Rezultati svih testova bit će čuvani u tajnosti, na način da će file-ovi biti zaštićeni visoko kompleksnom zaporkom, kao i server na kojem se file-ovi nalaze. Podaci koji će biti u tiskanom obliku čuvat će se u uredskom sefu OB Dubrovnik. Pristup medicinskoj dokumentaciji će imati samo liječnik voditelj istraživanja i mentori koji sudjeluju u istraživanju, te Etičko povjerenstvo OB Dubrovnik i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta. Podaci će biti obrađivani elektronski, uz proceduru za zaštitu osobnih podataka. Vaše ime nikada neće biti otkriveno. Druge osobe neće imati pristupa podacima osim u slučaju zakonske obveze.

KORIST ZA ISTRAŽIVAČA

Rezultati istraživanja biti će korišteni u svrhu objave znanstveni radova i kongresnih priopćenja, izrade odgovarajućih terapijskih smjernica. U svakom slučaju Vaš identitet će biti zadržan u tajnosti.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE

Ovo istraživanje je odobriolo Etičko povjerenstvo OB Dubrovnik i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu, koje je nakon uvida u određenu dokumentaciju odobriolo istraživanje. Ispitivanje se provodi sukladno svim primjenjivim smjernicama, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju. Presliku dokumenta koji ćete potpisati ako želite sudjelovati u istraživanju, dobit ćete Vi i Glavni istraživač.

DOBROVOLJNO SUDJELOVANJE

Sudjelovanje u ovome istraživanju je u potpunosti dobrovoljno. Vaša odluka o tome da li želite ili ne želite sudjelovati u ovom istraživanju ni na koji način neće utjecati na način, postupke i tijek Vašeg liječenja. Ukoliko se odlučite sudjelovati u istraživanju, možete u bilo kojem trenutku prekinuti svoje sudjelovanje u njemu. O Vašoj odluci obavijestit ćete istraživača u pisanom obliku (adresa navedena u ovom ispitivanju). Odluka o prekidanju sudjelovanja u istraživanju ni na koji način neće utjecati na način, postupke i tijek Vašeg liječenja.

PITANJA O ISPITIVANJU I KONTAKT PODACI

Za dodatna pitanja o samom istraživanju možete se obratiti istraživaču Andrijani Bogoje Raspopović na mob. broj 091486 4999.

Ako se razbolite ili pretrpite ozljedu tijekom ovog ispitivanja obratite se istraživaču Andrijani Bogoje Raspopović na mob. broj 091486 4999.

Ovaj tekst pročitajte zajedno sa istraživačem i/ili članovima obitelji.

Svojim potpisom potvrđujem da sam informiran/a o ciljevima, prednostima i rizicima ovog istraživanja i pristajem u njemu sudjelovati.

U Dubrovniku, _____ (Datum).

Potpis sudionika ili njegovog

Andrijana Bogoje Raspopović, dr. med. spec. neurologije

Zakonskog zastupnika

Potpis voditelja istraživanja

OB Dubrovnik

Ja, liječnik istraživač potvrđujem da sam usmeno pružio/pružila potrebne informacije o ovom ispitivanju i dao/dala preslik Informiranog pristanka potpisanog od strane ispitanika i istraživača

Potpis voditelja istraživanja

Andrijana Bogoje Raspopović, dr. med. spec. neurologije

OB Dubrovnik

10. ŽIVOTOPIS

Andrijana Bogoje Raspopović je rođena je 27. veljače 1973.g. u Dubrovniku, gdje je završila srednju školu. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu je diplomirala 1998. g. Nakon stažiranja je radila u ambulantama Doma zdravlja Dubrovnik. 2003. godine je započela specijalizaciju iz neurologije, a 2008. godine je položila specijalistički ispit, nakon čega radi kao specijalist neurologije u OB Dubrovnik. Educirana je za ekstrakranijski i transkranijalni ultrazvuk. Od 2018. g. je subspecijalist neuroimunologije. Od 2012. je zamjenica voditeljica Odjela neurologije, a od 2021. voditeljica odjela. Tijekom specijalističkoga usavršavanja, a i kasnije, stručni interes dr. Andrijane Bogoje Raspopović je usmjeren na područje neuroimunologije, što ju je i usmjerilo prema znanstvenim istraživanjima, te izradi doktorske disertacije na temu „Međuodnos BDNF, IL-6 i pokazatelja oksidacijskog stresa pri demijelinizacijskim oštećenjima“.

10.1. Popis objavljenih radova

Bogoje Raspopović A, Balta V, Vodopić M, Drobac M, Boroš A, Đikić D, Demarin V. The possible role of oxidative stress marker glutathione in the assessment of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Open Medicine*. 2024;19(1): 20240952.

Bogoje Raspopović A, Vodopić M, Čupković I, Drobac M, Čerimagić D. Anti-MOG pozitivni LETM: prikaz slučaja 7. hrvatski neurološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem - zbirka sažetaka Bašić Kes V. (ur.). Zagreb. 2017; 11-11

Bogoje Raspopović A, Vodopić M, Čupković I, Čerimagić D, Martinović Mamić D, Drobac M. Foix-Alajouanine syndrome as a cause of paraplegia - a case report. *Neurologia Croatica Supplement – abstracts*. Lušić I, Bilić I, Džamonja G.(ur.). Zagreb. 2013;64-64

Habek M, Adamec I, Barun B, Bašić Kes V, **Bogoje Raspopović A**, Duka Glavor K, Gabelić T, Grzinčić T, Jukić M, Jurašić MJ, Kiđemet-Piskač S, Komšo M, Rimac J, Lazibat I, Lukić B, Marčinko A, Matijaca M, Ratković M, Šapina L, Vuletić V, Mirošević Zubonja T, Krbot Skorić M. Treatment of relapsing multiple sclerosis - recommendations of the Croatian Neurological Society. *Croat Med J*. 2022;63(4):379-388.

Drobac M, Ljevak J, **Bogoje Raspopović A**, Vodopić M, Čupković I, Čerimagić D. Tromboza venskih sinusa mozga u ranoj trudnoći. 7. hrvatski neurološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem - zbirka sažetaka. Bašić Kes V.(ur.). Zagreb, 2017; 11-11

Vodopić M, Čupković I, **Bogoje Raspopović A**, Drobac M, Čerimagić D. Idarucizumab u konverziji dabigatran eteksilata i primjena trombolize kod pacijenta s akutnim moždanim udarom - prikaz slučaja. 7. hrvatski neurološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem - zbirka sažetaka. Bašić Kes V.(ur.). Zagreb, 2017;11-11

Vodopić M, **Bogoje Raspopović A**, Čupković I, Čerimagić D, Martinović Mamić D, Drobac M. Atypical presentation of multiple sclerosis with late onset - a case report. Neurologia Croatica Supplement – abstracts. Lušić I, Bilić I, Džamonja G. (ur.). Zagreb, 2013;102-103

Vodopić M, **Bogoje Raspopović A**, Čupković I, Čerimagić D, Martinović Mamić D, Drobac M. Successful thrombolysis in special circumstances - a case report. Neurologia Croatica Supplement – abstracts. Lušić I, Bilić I, Džamonja G. (ur.). Zagreb. 2013;102-102

Čupković I, Čerimagić D, **Bogoje Raspopović A**, Vodopić M, Martinović Mamić D, Drobac M. Late-onset post-partum eclampsia with the posterior reversible encephalopathy syndrome - a case report. Neurologia Croatica Supplement – abstracts. Lušić I, Bilić I, Džamonja G.(ur.). Zagreb. 2013; 6-6

Čupković I, Čerimagić D, **Bogoje Raspopović A**, Vodopić M, Martinović Mamić D, Drobac M. Bilateral occipital lobe infarction with transient cortical blindness - a case report. Neurologia Croatica Supplement – abstracts. Lušić I, Bilić I, Džamonja G. (ur.). Zagreb, 2013. str. 69-70

Čerimagić D, Čupković I, **Bogoje Raspopović A**, Vodopić M, Martinović Mamić D, Drobac M. 10+2 complications of a "routine" surgery. How to survive in spite of the treatment? - a case report. Neurologia Croatica Supplement – abstract. Lušić I, Bilić I, Džamonja G. (ur.). Zagreb, 2013. str. 68-68

Martinović Mamić D, Čerimagić D, Ivanković M, Drobac M, Čupković I, **Bogoje Raspopović A**, Vodopić M. Distinctiveness of hypertriglyceridemia as a prognostic risk factor in ischemic

and hemorrhagic stroke in correlation with ESR inflammatory parameters. Neurologia Croatica Supplement – abstracts. Lušić I, Bilić I, Džamonja G.(ur.). Zagreb, 2013. str. 87-87

Čerimagić D, Bilić, E, Čupković I, **Bogoje Raspopović A**, Vodopić M, Martinović Mamić D, Drobac M. Stiff person syndrome manifesting for the first time during the pregnancy - a case report. Neurologia Croatica Supplement - abstracts. Lušić I, Bilić I, Džamonja G.(ur.). Zagreb, 2013. str. 67-67

Seferovic Saric M, Jurasic MJ, Sovic S, Kranjcec B, Kovacic S, **Bogoje Raspopović A**, Demarin V (2017) Dyslipidemia in subclinical hypothyroidism requires assessment of small dense low density lipoprotein cholesterol (sdLDL-C). MIND & BRAIN – 57th International Neuropsychiatric Congress. Pula. Abstr. book (Intern. Neuropsychiatr. Congr., Online) 1:99–100.

Ivanković M, **Bogoje-Raspopović A**, Drobac M, Mamić-Martinović D, Vodopić M. Benign angiopathy of the central nervous system or reversible cerebral vasoconstriction syndrome. Acta Clin Croat. 2011;50(2):253-5.

Seferović Šarić M, Lovrenčić-Huzjan A, Vuković V, Kovačić S, **Bogoje A**, Jurašić MJ, Dežmalj Grbelja L, Planinc D, Demarin V. Detection of embolic signals and changes of haemodynamic spectres in transcranial doppler imaging as one of the indicators of complications of cardiological disease in stroke patient. Liječ Vjesn.2008;130 (6): 53–53.

Lisak M, Vodopić M, **Bogoje A**, Trkanjec Z, Demarin V. Evaluation of brain activation by complex activation paradigm: functional TCD study in cross-validation with SPECT. European Journal of Neurology, Vol.15, Suppl.3. Lenzi G., Gil-Nagel A. (ur.). Oxford: Wiley-Blackwell; 2008; 294-294

Jurašić MJ, Vargek Solter V, Morović S, Supanc V, Jergović K, **Bogoje A**, Lovrenčić Huzjan A, Demarin V. Late Pregnancy Associated With Immunological Depression Causing Acute Myelitis And Death. European journal of neurology. 2006; str.280 - x.

Čerimagić D, Relja M, Telarović S, Glavić J, Ivanković M, **Bogoje A**, Vodopić M, Džamonja
The Treatment of Moersch-Woltman Syndrome. European Journal of Neurology. 2005;
12(2):110–11.

Čerimagić D, Relja M, Telarović S, Glavić J, Ivanković M, **Bogoje A**. Stiff person
syndrome. Neurologica Croatica. 2005;54(1-2), 37-44.

Relja M, Čerimagić D, Telarović S, Glavić J, Ivanković M, **Bogoje A**, Vodopić M.
Liječenje anti-glutamat dekarobksilaza negativnog sindroma ukočene osobe. Neurologica
Croatica, 2005; 54,4.