



UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija A.Vasić

**ZNAČAJ OKSIDATIVNOG STRESA I
KINURENINSKOG PUTA METABOLIZMA
TRIPTOFANA U NASTANKU I RAZVOJU
MULTIPLE SKLEROZE U POPULACIJI SRBIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2023.



UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Marija A.Vasić

**THE IMPORTANCE OF OXIDATIVE STRESS AND
KYNURENINE PATHWAY OF TRYPTOPHAN
METABOLISM IN THE ONSET AND
DEVELOPMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS IN
THE POPULATION OF SERBIA**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2023.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, Laboratoriji za medicinsko biohemijske analize Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, Katedri za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, Institutu za medicinsku biohemiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu i Institutu za nuklearne nauke Vinča, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju u Beogradu.

Mentori:

Prof. dr Aleksandra Topić

Redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Prof. dr Evica Dinčić

Redovni profesor

Univerzitet odbrane u Beogradu-Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Neda Milinković

Docent, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Snežana Jovičić

Docent, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Maja Živković

Naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke Vinča,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju-Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

“Budi uporan bez obzira koliko se sporo morao kretati.

Sa upornošću će doći i uspeh.”

Napoleon Hil

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem mentorki, prof. dr Aleksandri Topić koja je bila moj kompas u šumi nauke. Hvala joj na bezgraničnoj podršci i energiji, nesebično pruženoj pomoći, čeličnim živcima i upornosti, razumevanju i strpljenju tokom svih faza izrade doktorske disertacije. Svojim dobronamernim i korisnim savetima doprinela je da ova teza ugleda svetlost dana.

Zahvaljujem se komentoru prof. dr Evici Dinčić na divnoj saradnji, korisnim savetima i podršci svih ovih godina.

Zahvaljujem se docentima Nedi Milinković i Snežani Jovičić na podršci i pomoći, na svim prećicama u rešavanju problema, na prijateljskim savetima kada je bilo teško.

Zahvaljujem se naučnom saradniku Maji Živković na saradnji, pomoći u eksperimentalnom delu izrade disertacije i na tome što je bila putokaz na stazi genetike.

Zahvaljujem se prof. dr Bojanu Markoviću na pomoći pri izradi eksperimentalnog dela disertacije.

Za nesebično pruženu pomoć tokom eksperimentalnog dela doktorske disertacije zahvaljujem se: profesorima i asistentima katedre za Biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Laboratoriji za medicinsko - biohemijske analize Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, katedri za Farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, kolektivu Klinike za neurologiju i Institutu za medicinu rada Vojnomedicinske akademije.

Zahvaljujem se mom kolektivu Institutu za medicinsku biohemiju Vojnomedicinske akademije na podršci i toleranciji, razumevanju, pomoći i divnoj saradnji tokom svih ovih godina.

Veliku zahvalnost dugujem načelniku Instituta za medicinsku biohemiju, pukovniku dr sc med. Dejanović Bratislavu, na podršci, dragocenim savetima, pomoći, toleranciji i razumevanju.

Zahvaljujem se pacijentima Klinike za neurologiju Vojnomedicinske akademije i svim zdravim ispitanicima koji su učestvovali u ovom istraživanju, jer bez njih ova disertacija ne bi postojala.

Beskrajno hvala mojim roditeljima, Aleksandru i Ljubinki, bratu Goranu i mojoj Milanki za bezgraničnu ljubav, podršku, razumevanje i snagu; za krčenje svih trnovitih puteva, za bistrenje mutnih voda i ispunjenje duše radošću i srećom.

Hvala mojim ćerkama Nađi i Leni za svaki osmeh i zagrljaj onda kada je bilo najteže, za bezgraničnu ljubav i sreću, za razumevanje i strpljenje. Hvala im što daju smisao mom životu i čine ga lepšim.

Hvala svima koji su mi ulivali optimizam i snagu, koji su me ojačali, koji su ćutali kada je trebalo i koji su svojim razumevanjem, korisnim savetima uspeali da podignu moju odlučnost i upornost.

Beskrajno hvala svima.

*U znak zahvalnosti za podršku, ljubav i razumevanje,
ovaj rad posvećujem svojim roditeljima, bratu i ćerkama*

Značaj oksidativnog stresa i kinureninskog puta metabolizma triptofana u nastanku i razvoju multiple skleroze u populaciji Srbije

Sažetak

Multipla skleroza (MS) je autoimunska bolest, nepredvidivog toka, sa zonama inflamacije i demijelinizacije u centralnom nervnom sistemu. Cilj istraživanja je bio da se utvrdi klinički značaj oksidativnog stresa (OS) i kinureninskog puta (KP) metabolizma triptofana u nastanku i razvoju relapsno-remitentne multiple skleroze (RRMS) u populaciji Srbije, kao i efekti terapije koja menja prirodni tok bolesti (DMT). Dodatno, cilj je bio da se ispita uticaj sredinskih faktora (duvanski dim, izlaganje suncu i konzumiranje kravljeg mleka) na nastanak i razvoj MS.

Istraživanje je obuhvatilo 175 RRMS pacijenata (76 muškaraca i 99 žena) i 254 zdravih osoba (81 muškarac i 173 žene). Za procenu progresije bolesti korišćen je Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). OS je procenjen na osnovu ukupnog antioksidativnog i oksidativnog statusa i oksidativnog indeksa u serumu (TAS, TOS, OSI) i 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oksodG/kreatinin) u urinu. Analiziran je polimorfizam gena za enzim 8-oksoguanin-glikozilazu 1, OGG1 rs1052133 (Ser326Cys). U serumu pacijenata su praćeni laki lanci neurofilamenata (sNfL), sfingozin-1-fosfat (S1P), kinureninska (KA) i hinolinska (QA) kiselina.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da OS utiče na nastanak i razvoj MS u populaciji Srbije. Porast OSI, porast 8-oksodG/kreatinina i pasivno pušenje su identifikovani kao nezavisni prediktori za nastanak MS. Dodatno, kod pacijenata sa težim oblikom MS, nivo OS povezanog sa pušenjem bio je veći kod žena, što ukazuje na veće potrebe uključivanja antioksidativne terapije kod žena koje su već obolele od MS, kako bi se prevenirao dalji nepovoljan tok bolesti. Primena TAS, TOS, OSI i 8-oksodG/kreatinina ima potencijalni značaj u proceni rizika od razvoja OS i praćenju efikasnosti antioksidativne terapije. Viši 8-oksodG/kreatinin kod nosilaca C alela rs1052133 u odnosu na GG homozigote bio je povezan sa pojavom MS, što ukazuje na povećanu izloženost sistemskim efektima OS kod nosioca određenog alela genetičke varijante OGG1 rs1052133, ali i na efikasnost sistema reparacije oksidativno modifikovane dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). S druge strane, prisustvo C alela kod pacijenata-pušača je bilo povezano sa višim 8-oksodG/kreatinin indeksom u odnosu na nepušače, što ukazuje na moguću genotip-fenotip interakciju u razvoju OS. Dalje, rezultati ove studije ukazuju na zaštitni efekat DMT terapije od pojave OS, međutim, kod žena efekti terapije na prevenciju OS i pojavu teškog oblika MS su bili ograničeni, što ukazuje na neophodnost uvođenja antioksidativne terapije kod žena. Osim toga što su žene, generalno imale viši nivo sNfL, ova studija je pokazala da žene-nosioci G alela rs1052133 imaju viši sNfL u odnosu na žene-homozigote CC, kao i u odnosu na muškarce-nosioce G alela. Dodatno, žene su nakon šestomesečne DMT terapije imale značajno veći porast sNfL u odnosu na muškarce, što može ukazati da njihova veća osetljivost na oštećenje aksona zahteva duži vremenski period za postizanje pozitivnih efekata terapije. Povećana produkcija hinolinske kiseline bila je povezana sa rizikom od progresije MS kod žena, što ukazuje da hronična aktivacija KP povećava rizik od neurodegeneracije. Nakon šestomesečne DMT terapije, kod oba pola uočen je značajan pad indeksa QA/KA, što ukazuje na njen zaštitni efekat od nakupljanja neurotoksičnih metabolita i ovaj indeks bi mogao da bude koristan za procenu rizika od progresije MS. Šestomesečna terapija S1PR-modulatorima kod žena dovela je do porasta S1P i sNfL, dok je

kod muškaraca došlo do njihovog opadanja, što ukazuje na to da su ovi lekovi efikasniji kod muškaraca. S obzirom da je uočena visoka pozitivna korelacija između S1P i sNfL kod težeg oblika bolesti, može se pretpostaviti da su žene osjetljivije na porast S1P, povezanog sa većim oštećenjem aksona. U ovoj studiji pokazano je da nedovoljno izlaganje suncu predstavlja faktor rizika za pojavu OS, kao i da je konzumiranje mleka kod MS-pacijenata značajan faktor rizika za progresiju bolesti. Poznavanje faktora rizika za MS i uvođenje laboratorijskih biomarkera ispitanih u ovoj studiji, može unaprediti prevenciju i omogućiti razvoj novih terapijskih pristupa, kako bi se sprečila progresija MS i poboljšao kvalitet života obolelih.

Ključne reči: multipla skleroza, oksidativni stres, OGG1 rs1052133, kinureninska kiselina, hinolinska kiselina, laki lanci neurofilamenta, sfingozin-1-fosfat

Naučna oblast: Medicinske nauke-Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

The importance of oxidative stress and the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in the onset and development of multiple sclerosis in the population of Serbia

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease with an unpredictable course, with zones of inflammation and demyelination in the central nervous system. The aim of the research was to determine the clinical significance of oxidative stress (OS) and the kynurenine pathway (KP) of tryptophan metabolism in the onset and development of relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) in the population of Serbia, as well as the effects of therapy that changes the natural course of the disease (DMT). Additionally, the aim was to examine the influence of environmental factors (tobacco smoke, sun exposure and consumption of cow's milk) on the onset and development of MS.

The research included 175 RRMS patients (76 men and 99 women) and 254 healthy individuals (81 men and 173 women). The Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) was used to assess the severity of the disease. OS was evaluated based on total antioxidant and oxidative status and oxidative index in serum (TAS, TOS, OSI), and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG/creatinine) in urine. The gene polymorphism of the enzyme 8-oxoguanine-glycosylase 1, OGG1 rs1052133 (Ser326Cys) was analyzed. Neurofilament light chains (sNfL), sphingosine-1-phosphate (S1P), kynurenic (KA) and quinolinic (QA) acid were monitored in the patients' serum.

The results of this research showed that OS affects the onset and development of MS in the population of Serbia. Increase in OSI, increase in 8-oxodG/creatinine and passive smoking were identified as independent predictors for the development of MS. Additionally, in patients with a more severe form of MS, the level of OS-related to smoking was higher in women, which indicates a greater need to include antioxidant therapy in women already suffering from MS, in order to prevent further adverse course of the disease. The application of TAS, TOS, OSI and 8-oxodG/creatinine has potential importance in assessing the risk of developing OS and monitoring the effectiveness of antioxidant therapy. Higher 8-oxodG/creatinine in rs1052133 C allele carriers compared to GG homozygotes was associated with the occurrence of MS, which indicates increased exposure to systemic effects of OS related to certain allele of genetic variant OGG1 rs1052133, but also the efficiency of the repair system of oxidatively modified DNA. On the other hand, the presence of the rs1052133 C allele in smoking patients was associated with higher 8-oxodG/creatinine compared to non-smokers, indicating a possible genotype-phenotype interaction in the development of OS. Furthermore, the results of this study indicate a protective effect of DMT therapy against the occurrence of OS, however, in women, the effects of the therapy on the prevention of OS and the occurrence of severe MS were limited, which indicates the necessity of introducing antioxidant therapy in women. In addition to women generally having higher sNfL, this study showed that female carriers of the rs1052133 G allele have higher sNfL compared to homozygous CC women, as well as compared to male carriers of the G allele. After six months of DMT therapy, women had a significantly greater increase in sNfL compared to men, which may indicate that their greater sensitivity to axonal damage requires a longer period of time to achieve positive effects of therapy. Increased production of quinolinic acid was associated with the risk of MS progression in women, indicating that chronic KP

activation increases the risk of neurodegeneration. After six months of DMT therapy, a significant decrease in the QA/KA index was observed in both sexes, indicating its protective effect against the accumulation of neurotoxic metabolites, and this index could be useful for assessing the risk of MS progression. Six-month therapy with S1PR-modulators in women led to an increase in S1P and sNfL, while in men they decreased, which indicates that these drugs are more effective in men. Given that a high positive correlation between S1P and sNfL was observed in a more severe form of the disease, it can be assumed that women are more sensitive to an increase in S1P, associated with greater axonal damage. In this study, it was shown that insufficient sun exposure is a risk factor for the occurrence of OS, as well as that milk consumption in MS patients is a significant risk factor for disease progression. Knowledge of the risk factors for MS and the introduction of laboratory biomarkers examined in this study can improve prevention and enable the development of new therapeutic approaches, in order to prevent the progression of MS and improve the quality of RRMS patients.

Key words: multiple sclerosis, oxidative stress, OGG1 rs1052133, kynurenic acid, quinolinic acid, neurofilament light chains, sphingosine-1-phosphate

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Medical biochemistry

Lista skraćenica korišćenih u tekstu

ANOVA	Analiza varijanse (eng. <i>analysis of variance</i>)
BBB	Krvno moždana barijera (eng. <i>blood brain barrier</i>)
CNS	Centralni nervni sistem
DMT	Terapija koja menja prirodni tok bolesti (eng. <i>disease modifying therapy</i>)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EDSS	Proširena skala statusa invaliditeta (eng. <i>expanded disability status scale</i>)
FDA	Agencija za hranu i lekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i>)
KA	Kinureninska kiselina (eng. <i>kynurenic acid</i>)
MS	Multipla skleroza (eng. <i>multiple sclerosis</i>)
MSSS	Procena težine MS (eng. <i>multiple sclerosis severity score</i>)
nFL	Laki lanci neurofilamenta (eng. <i>neurofilament light chain</i>)
OS	Oksidativni stres
OSI	Oksidativni indeks (eng. <i>oxidative stress index</i>)
OGG1	8-oksoguanin DNK glikozilaza-1 (eng. <i>8-oxoguanine DNA glycosylase-1</i>)
8-oksodG	8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (eng. <i>8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine</i>)
PCR	Reakcija lančane polimerizacije (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
QA	Hinolinska kiselina (eng. <i>quinolinic acid</i>)
RNS	Reaktivne vrste azota (eng. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Reaktivne vrste kiseonika (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
RRMS	Relapsno-remitentna multipla skleroza (eng. <i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i>)
S1P	Sfingozin 1-fosfat
TAS	Ukupni antioksidativni status (eng. <i>total antioxidant status</i>)
TOS	Ukupni oksidativni status (eng. <i>total oxidant status</i>)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Multipla skleroza	1
1.1.1. Epidemiologija i etiologija multiple skleroze	1
1.1.2. Klinička slika, dijagnostika i procena progresije multiple skleroze	3
1.1.3. Terapija multiple skleroze	4
1.2. Značaj oksidativnog stresa u multiploj sklerozi	6
1.2.1. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi multiple skleroze	6
1.2.2. Značaj biomarkera za procenu oksidativnog stresa u multiploj sklerozi.....	9
1.2.3. Značaj 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oksodG) i polimorfizma gena enzima 8-oksoguanin DNK glikozilaze 1 (OGG1 rs 1052133) u multiploj sklerozi.....	9
1.3. Značaj kinureninskog puta metabolizma triptofana u multiploj sklerozi	11
1.4. Značaj lakih lanaca neurofilamenata u dijagnostici i praćenju multiple skleroze	13
1.5. Značaj sfingozin-1-fosfata u multiploj sklerozi	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1. Ispitanici	17
3.1.1. Podaci o ispitanicima	17
3.1.2. Kriterijumi za uključivanje ispitanika u istraživanje	18
3.1.3. Uzorci ispitanika	18
3.2. Metodologija određivanja izabranih biomarkera	18
3.2.1. Analiza parametara oksidativnog stresa	19
3.2.2. Određivanje koncentracije lakih lanaca neurofilamenata (sNfL)	25
3.2.3. Određivanje koncentracije sfingozin-1-fosfata (S1P).....	27
3.2.4. Određivanje koncentracije hinolinske kiseline (QA)	29
3.2.5. Određivanje koncentracije kinureninske kiseline (KA).....	30
3.3. Analiza genetičke varijante 8-oksoguanin DNK glikozilaze 1 (OGG1 rs1052133)	31
3.3.1. Ekstrakcija DNK, merenje koncentracije i procena kvaliteta ekstrahovane DNK.....	31
3.3.2. Genotipizacija OGG1 rs1052133	32
3.4. Statistička analiza	32
4. REZULTATI	33
4.1. Povezanost oksidativnog stresa i multiple skleroze	33
4.1.1. Deskriptivna statistička analiza biomarkera oksidativnog stresa kod svih ispitanika i u odnosu na pol.....	33
4.1.2. Udruženi uticaj pola i prisustva/odsustva MS na biomarkere oksidativnog stresa	35
4.1.3. Uticaj pušačkog statusa na biomarkere oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa multiplom sklerozom.....	36
4.1.4. Uticaj izlaganja suncu na biomarkere oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa multiplom sklerozom.....	42
4.1.5. Analiza prediktora za nastanak multiple skleroze vezani za oksidativni stres	45
4.1.6. Korelacije između biomarkera oksidativnog stresa, godina starosti i indeksa telesne mase u kontrolnoj grupi ispitanika i kod pacijenata sa multiplom sklerozom	45
4.2. Povezanost između genetičke varijante 8-oksoguanin DNK glikozilaze-1 (OGG1) rs1052133 i multiple skleroze	46
4.2.1. Distribucija genotipova genetičke varijante OGG1 rs1052133 i odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa multiplom sklerozom	46
4.2.2. Povezanost genetičke varijante OGG1 rs1052133 i nivoa urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata	48
4.2.3. Uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133, pušačkog statusa i prisustva / odsustva MS na nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin.....	49
4.3. Značaj serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fosfata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) u multiploj sklerozi	50
4.3.1. Uticaj pola na nivo serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fosfata, kinureninske i hinolinske kiseline kod MS-pacijenata	50

4.3.2. Uticaj pola i pušačkog statusa na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod MS-pacijenata	51
4.3.3. Uticaj pola i starosne dobi na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod MS-pacijenata	52
4.3.4. Korelacije između nivoa serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) i težine multiple skleroze	53
4.3.5. Udruženi uticaj pola i progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS skora i nivoa lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod pacijenata sa multiplom sklerozom	55
4.3.6. Uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133 (CC homozigoti i nosioci G alela) na nivo serumskih lakih lanaca neurofilamenata u zavisnosti od pola	56
4.4. Uticaj DMT na ispitivane biomarkere kod pacijenata sa multiplom sklerozom	57
4.4.1. Uticaj DMT na biomarkere oksidativnog stresa kod pacijenata sa multiplom sklerozom koji su primali DMT i pacijenata koji nisu primali DMT	57
4.4.2. Uticaj DMT na biomarkere oksidativnog stresa kod pacijenata sa multiplom sklerozom koji su primali DMT i pacijenata koji nisu primali DMT u odnosu na pušački status	58
4.4.3. Uticaj DMT na biomarkere oksidativnog stresa kod pacijenata sa multiplom sklerozom u zavisnosti od pola i pušačkog statusa	60
4.4.4. Uticaj DMT i progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS na biomarkere oksidativnog stresa	62
4.4.5. Uticaj DMT i progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS skora na biomarkere oksidativnog stresa u zavisnosti od pola	63
4.4.6. Uticaj šestomesečne DMT terapije i pola na biomarkere oksidativnog stresa	67
4.4.7. Uticaj određenog DMT leka kod MS-pacijenata na biomarkere oksidativnog stresa	68
4.4.8. Uticaj DMT terapije na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod pacijenata sa multiplom sklerozom	70
4.5. Povezanost između unosa mleka i težine MS kod pacijenata na DMT terapiji	75
5. DISKUSIJA	77
5.1. Oksidativni stres i multipla skleroza	77
5.1.1. Uticaj oksidativnog stresa procenjenog na osnovu biomarkera TAS, TOS i OSI na nastanak i razvoj multiple skleroze	77
5.1.2. Uticaj sistemskih efekata oksidativnog stresa procenjenog na osnovu biomarkera 8-oksodG/kreatinin na nastanak i razvoj multiple skleroze	78
5.1.3. Povezanost oksidativnog stresa i pušačkog statusa sa nastankom multiple skleroze	80
5.1.4. Povezanost oksidativnog stresa i izlaganja sunčevom zračenju sa nastankom multiple skleroze	82
5.2. Povezanost polimorfizma gena za 8-oksoguanin DNK glikozilazu 1 (OGG1 rs1052133) sa nastankom multiple skleroze	82
5.3. Klinički značaj serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata i metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod pacijenata sa multiplom sklerozom	85
5.3.1. Povezanost lakih lanaca neurofilamenata sa multiplom sklerozom	85
5.3.2. Povezanost nivoa sfingozin-1-fostata i multiple skleroze	86
5.3.3. Povezanost nivoa metabolita triptofana (kinureninska i hinolinska kiselina) i multiple skleroze	87
5.4. Povezanost DMT terapije sa ispitivanim biomarkerima kod pacijenata sa multiplom sklerozom	88
5.4.1. Uticaj DMT terapije na oksidativni stres	88
5.4.2. Uticaj šestomesečne DMT terapije na nivo serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL)	91
5.4.3. Uticaj šestomesečne terapije na nivo sfingozin-1-fostata (S1P)	91
5.4.4. Uticaj šestomesečne terapije na nivo metabolita triptofana (kinureninska i hinolinska kiselina)	92
5.5. Povezanost progresije multiple skleroze i upotrebe mleka u ishrani MS pacijenata koji su bili na DMT terapiji 92	92
6. ZAKLJUČCI	94
7. LITERATURA	98
8. BIOGRAFIJA AUTORA	112
9. IZJAVE	112

1. UVOD

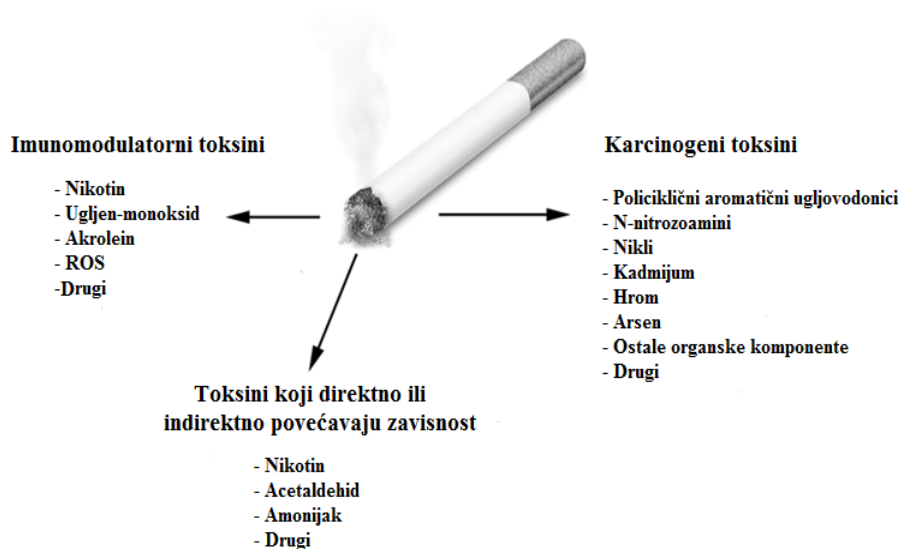
1.1. Multipla skleroza

1.1.1. Epidemiologija i etiologija multiple skleroze

Multipla skleroza (MS) je autoimunska, hronična, neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) praćena inflamacijom, demijelinizacijom i degeneracijom aksona (1). Broj ljudi obolelih od MS širom sveta je u 2020. godini iznosio oko 2,8 miliona što je za oko 30% više nego 2013. godine (2). Na globalnom nivou prevalenca MS u 2020. godini je bila 35,9 na 100000, a u Evropi je bila 133 pacijenta na 100000 stanovnika (2, 3). U Srbiji je broj obolelih od MS u skladu sa evropskim prosekom, 136 obolelih na 100000 stanovnika (4). Međutim, primećen je trend porasta obolelih od ove bolesti u populaciji Srbije, obzirom da je 1996. prevalenca iznosila 41/100000, a 2006. je zabeleženo 65 obolelih/100000 (5). Učestalost MS pokazuje polnu zavisnost, tako da je odnos žena i muškaraca oko 2:1 sa prosečnom starošću pacijenata između 20 i 40 godina (6).

Multipla skleroza je kompleksna bolest, čija etiologija obuhvata najverovatnije interakciju genetičkih i faktora sredine (7). Kompleks humanog leukocitnog antigena (HLA) na kratkom kraku hromozoma 6 je prvi identifikovani genetički lokus rizika za MS, a najznačajniji rizični alel je HLA-DRB1*15:01 (8, 9). Homozigoti sa ovim alelom imaju veći rizik za razvoj bolesti u odnosu na heterozigote (10). Etiološki faktori za koje se smatra da imaju značajan doprinos nastanku i razvoju MS su: izloženost duvanskom dimu, smanjeno izlaganje suncu i nizak nivo vitamina D, uticaj geografske širine, gojaznost (11-13).

Duvanski dim sadrži visoke koncentracije nikotina, ugljen-monoksida, amonijaka, acetaldehida, teških metala (Slika 1.) i oksidansa koji formiraju slobodne radikale kiseonika (ROS) uzrokujući stimulaciju makrofaga i oslobađanje velikog broja medijatora (14). ROS nisu prisutni u nesagorelim listovima duvana i u pepelu od cigareta, ali nastaju sagorevanjem u duvanskom dimu tokom pušenja cigareta (15). Pušenje je povezano sa većim rizikom za razvoj progresivne forme multiple skleroze i bržim razvojem invaliditeta (16). Osim toga, dovodi do posttranslacione modifikacije proteina u plućima, tako da je moguće da mehanizmi koji povezuju pušenje i osetljivost na MS uključuju autoimunost protiv proteina sa posttranslacionim modifikacijama koji su unakrsno reaktivni sa antigenima iz CNS-a (17). Tačan mehanizam kojim pušenje utiče na razvoj MS je još uvek nejasan, ali su istraživanja pokazala da razvoj bolesti nije posredovan isključivo nikotinom (18, 19) već toksičnim komponentama iz dima cigareta, tako da bi pasivno izlaganje dimu predstavljalo rizik za razvoj bolesti (20). Duvanski dim i pasivno pušenje, aktivacijom epitelnih ćelija, indukuju oslobađanje proinflamatornih citokina, čime se pokreće neuroinflamacija (21, 22). Pušenje se dovodi u vezu sa povećanjem aktivnosti matriks-metaloproteinaze-9 (MMP-9) koja dovodi do razgradnje ekstracelularnog matriksa (23, 24). Cijanid i azot oksid (NO) iz duvanskog dima uzrokuju demijelinizaciju, degeneraciju aksona i poremećaj u nervnoj provodljivosti (25, 26).



Slika 1. Toksini u dimu cigareta nastali sagorevanjem duvana (14.)

Izlaganje suncu i ultraljubičastom zračenju (UVB) ima značajnu ulogu u sintezi vitamina D koji ispoljava antiinflamatorno i protektivno dejstvo u nastanku MS (27-29). Sunčevi zraci stimulišu endogenu proizvodnju vitamina D, tako da monociti, makrofage i dendritične ćelije proizvode manje proinflamatornih citokina (IL-1, IL-12, TNF) i više IL-10, što dovodi do smanjenja diferencijacije Th1 i Th17 ćelija, a povećanja T regulatornih ćelija. Takođe, smanjuje se diferencijacija B ćelija u plazma ćelije, a time i proizvodnja antitela (27, 30, 31). Prevalenca MS je ređa u oblastima blizu ekvatora, dok se učestalost povećava ka severnijim delovima hemisfere, što je povezano sa smanjenjem izloženosti sunčevoj svetlosti (32). Veći rizik za nastanak MS postoji kod osoba koje su migrirale iz područja niskog rizika za razvoj bolesti u zemlju visokog rizika. Studije navode da je nakon seobe ljudi u Skandinavске zemlje i Kanadu, bio povećan rizik od MS kod doseljenika iz Evrope, Severne Amerike i Bliskog istoka, dok su najnižu prevalencu bolesti imali imigranti iz Afrike i Azije, osim imigranata iz Irana koji se nisu bitno razlikovali od opšte populacije (33, 34). Područja sa visokim rizikom za MS uključuju Norvešku sa prevalencom oko 165/100000 i Švedsku sa prevalencom oko 189/100000, dok je prevalenca MS bila najniža kod crnaca iz Južne Afrike (0,22/100000) (35-37). Među Iranskim imigrantima u Norveškoj prevalenca MS je iznosila 162/100000, što je znatno više od prevalencu u Iranu gde iznosi 99/100000, dok je među belcima rođenim u Južnoj Africi iznosila 6,9/100000, a među imigrantima iz Velike Britanije i Evrope 36/100000 (35).

Kao faktor rizika za nastanak MS, važnu ulogu ima gojaznost naročito u doba adolescencije, jer prisutna inflamacija, visok nivo leptina i smanjena bioraspodivnost vitamina D podstiču sintezu proinflamatornih citokina u masnom tkivu (38-41). Osim toga, konzumiranje mleka predstavlja etiološki faktor rizika koji ima važnu ulogu u započinjanju i modulaciji MS (42). Epidemiološki podaci ukazuju na postojanje veze između konzumiranja mleka i prevalencije MS (43).

1.1.2. Klinička slika, dijagnostika i procena progresije multiple skleroze

Kao posledica inflamacije u MS, dolazi do oštećenja oligodendrocita i do neurodegeneracije aksona (44). Oštećenjem mijelinskog omotača i gubitkom integriteta aksona, nastaje poremećaj u širenju impulsa duž nervne ćelije i prekid neuroloških funkcija što se manifestuje kliničkim karakteristikama bolesti. Simptomi MS su brojni: optički neuritis, paraliza, spastičnost, ataksija, slabost ekstremiteta, oštećenje senzibiliteta, seksualna disfunkcija, psihijatrijska i kognitivna oštećenja (45).

Bolest se ispoljava kao klinički izolovan sindrom (CIS), relapsno-remitentna (RRMS), sekundarno-progresivna (SPMS) i primarno-progresivna (PPMS) forma. CIS se smatra prvom epizodom neuroloških simptoma zbog imunološke aktivnosti koja traje 24h i može, ali ne mora da se razvije u MS. Najčešća forma bolesti je RRMS (85-90%), koju karakterišu periodi relapsa i remisije (46). SPMS karakteriše kontinuirana progresija bolesti tokom godina, dok PPMS karakteriše progresija bolesti od samog početka pojave simptoma. Progresivne forme najčešće zahvataju kičmenu moždinu, a ređe optički nerv, mali i veliki mozak. Relapsi se događaju u slučajnim intervalima i karakteriše ih nastanak novih i pogoršanje postojećih simptoma i znakova oštećenja CNS, koji postoje najmanje 24h kod obolelog, u odsustvu akutne infekcije i povišene telesne temperature. Prvi simptomi MS kod žena javljaju se u nešto ranijem uzrastu u poređenju sa muškarcima (47), tako da žene češće oboljevaju i uglavnom imaju benigni tok bolesti u poređenju sa muškarcima kod kojih je prisutnija progresivna forma (48).

Stepen funkcionalne onesposobljenosti, odnosno, kvantifikovanje neuroloških deficita kod MS pacijenata vrši se pomoću skale, *Expanded Disability Status Scale* (EDSS), koja ima vrednosti u intervalu od 0 do 10 (49). Bolji parametar za procenu progresije bolesti je *Multiple Sclerosis Severity Score* (MSSS), koji predstavlja algoritam koji dovodi u vezu EDSS skor sa vremenom trajanja bolesti (50). Progresija MS je klasifikovana prema MSSS skor na: lakši oblik (MSSS<3,4), srednje težak oblik (MSSS 3,4-6,7) i težak oblik bolesti (MSSS>6,7) (51).

Prema brzini progresije bolesti izdvajaju se benigna i maligna forma MS. Benigna MS je podtip RRMS i karakteriše je minimalni neurološki deficit i spora progresija tokom vremena. Bolest traje duže od 10 godina, a pacijenti razvijaju vrednosti za EDSS <2 i imaju očuvane kognitivne funkcije (52). Maligna MS se karakteriše brзом progresijom bolesti, visokim stepenom neurološkog deficita i vrednosti za EDSS >6 tokom 5 godina (53).

Za ranu dijagnostiku MS primenjuju se tzv. McDonald's kriterijumi (54) kod bolesnika koji imaju kliničku prezentaciju ili neuroradiološki dokaz prisustva bolesti, kao i pozitivan rezultat oligoklonalnih IgG traka u likvoru (55).

1.1.3. Terapija multiple skleroze

Zbog heterogenosti bolesti i nepredvidivog kliničkog toka, terapija MS predstavlja veliki izazov i može se podeliti na: terapiju akutnih pogoršanja bolesti (relapsa), terapiju koja modifikuje prirodni tok bolesti (eng. *Disease modifying therapy*, DMT) i simptomatsku terapiju (56).

1.1.3.1. Terapija akutnih pogoršanja bolesti (relapsa)

Osnovni cilj ove terapije je oporavak novonastalog neurološkog deficita i sprečavanje akumulacije novih. U terapiji relapsa se koriste visoke doze glukokortikoida (metilprednizolon) koji smanjuju proliferaciju Th1 limfocita i produkciju proinflammatoryh citokina IL-2, IFN- γ i TNF- α , a nemaju suprimirajući efekat na Th2 limfocite i na nivo antiinflammatoryh citokina IL-4 i TGF- β (57). Glukokortikoidi inhibiraju nuklearni faktor kB (NF-kB) koji indukuje ekspresiju velikog broja proinflammatoryh gena, inhibira se stvaranje proinflammatoryh citokina i povećava sinteza antiinflammatoryh citokina. Preporuka je intravensko davanje (i.v.) metilprednizolona u trajanju od 3 do 5 dana u dozi od 500 mg do 1000 mg dnevno. Oralna primena glukokortikoida se primenjuje u onim slučajevima kada postoji nemogućnost za i.v. aplikaciju. Glukokortikoidnu terapiju bi trebalo uključiti odmah sa pojavom prvih znakova pogoršanja u cilju smanjenja oštećenja aksona (58), imajući u vidu da mononuklearne ćelije u toku prvih 72h od početka relapsa dostižu maksimalnu produkciju NO, pa bi primena kortikosteroida posle tog perioda mogla biti neefikasna. Da bi se izbegli neželjeni efekti kortikosteroida neophodna je primena vitamina D i kalcijuma, a po potrebi i antiresorptivni lekovi, kalcitonin i bifosfonat kod prisutne osteoporoze i osteopenije.

1.1.3.2. Terapija koja modifikuje prirodni tok bolesti

Primena terapije koja modifikuje prirodni tok bolesti (DMT), kod pacijenata sa MS klinički je opravdana i neophodna kako bi se smanjio broj i težina recidiva, odložila progresija bolesti i sprečio invaliditet (59, 60).

Tokom XX veka terapija MS je bila ograničena isključivo na akutnu i simptomatsku terapiju. Prvi imunomodulatorni lek koji je odobren od strane FDA (eng. *Food and Drug Administration*) i koji je uveden u terapiju relapsa (1993. godine) bio je rekombinantni protein, interferon β -1b (Betaferon[®]), čiji mehanizam delovanja nije potpuno poznat i pretpostavlja se da efekat ostvaruje aktivacijom IFN receptora pri čemu dolazi do transkripcije ciljnih gena (61). Nakon njega u terapiju je uveden interferon β -1a (Rebif[®], Avonex[®]) u cilju sprečavanja akumulacije neuroloških deficita (62).

Interferon- β ima bolji efekat u RRMS nego u SPMS, a dejstvo ostvaruje inhibicijom proizvodnje inflammatoryh Th1 limfocita, INF- γ i IL-12 u dendritičnim ćelijama i indukuje produkciju Th2 limfocita (63, 64). Terapijom se postiže smanjenje volumena T2 lezija u mozgu (65). Međutim, nije dokazano da ovi lekovi usporavaju progresiju MS (66). Interferon- β je grupa najbezbednijih DMT lekova, ali imaju umerenu efikasnost koja se objašnjava činjenicom da tokom vremena dolazi do razvoja neutrališućih anti-INF- β antitela (67). Tokom primene INF- β neophodno je laboratorijsko praćenje funkcije jetre i analiza krvne slike zbog mogućeg povišenja aktivnosti transaminaza i leukopenije sa neutropenijom i limfopenijom. Analizu je potrebno raditi jednom mesečno tokom prva

tri meseca terapije, zatim svaki treći mesec do kraja prve godine lečenja, a potom na 6 meseci i jednom godišnje (68).

Copaxone[®] je smeša sintetskih polipeptida koga čine četiri amino kiseline (lizin, alanin, glutamat i tirozin), koje ulaze u sastav mijelin baznog proteina (MBP) (69). Uticaj ovog leka na nervni sistem se još uvek istražuje, ali glavni mehanizam delovanja je na adaptivni imuni odgovor (70). Pošto podseća na MBP, kompetitivno se vezuje za MHC (eng. *major histocompatibility complex*) II klase i tako zamenjuje mijelinske antigene za predstavljanje T ćelijama (71, 72). Copaxone[®] je uspešan u smanjenju Th17 ćelija i njegovim signalnim proinflamatornim putevima (73).

DMT terapija obuhvata i grupu lekova koji su modulatori receptora za sfingozin-1-fosfat, kao što je Fingolimod (Gylenia[®]). Fingolimod (Gylenia[®]) je strukturni analog sfingozina (komponente ćelijske membrane i sastavni deo mnogih bioaktivnih lipida) koji modulira S1P receptor i sprečava oslobađanje limfocita iz limfnih čvorova, snižavajući njihov broj u krvi i likvoru, čime se inhibira pokretanje imunog odgovora i aktivacija ćelija mikroglije (74). Zbog svoje lipofilne strukture ima sposobnost prolaska BBB i može ostvariti neuroprotektivne efekte direktno delujući na ćelije CNS preko modulacije specifičnih neuronskih receptora S1P1 i S1P5 (75). Lek Fingolimod smanjuje hroničnu inflamaciju, dovodi do remijelinizacije i do povećanja ekspresije MBP, smanjuje apoptozu i modulaciju ekspresije citokina (76). Takođe, dovodi do povećanja T regulatornih limfocita, a smanjuje aktivnost Teff kao što su Th1 i Th17 ćelije koje luče citokine odgovorne za nastanak relapsa u MS. IL-17, koga proizvode Th17 limfociti, se nalazi u lezijama MS i može igrati ulogu u rupturi BBB i povredi neurona (76).

Ostali S1P modulatori Siponimod i Ozanimod su selektivniji od Fingolimoda, sa visokim afinitetom samo za receptore S1P1 i S1P5. Ponesimod ima visok afinitet za receptore S1P1 i kao Ozanimod pripada agonistima receptora (76, 77).

Takođe u terapiji MS primenjuje se visoko efektivna terapija u koju spadaju monoklonska antitela Natalizumab (Tysabri[®]) koji se uglavnom koristi u lečenju težeg oblika bolesti (56).

Natalizumab je rekombinantno, monoklonsko antitelo usmereno prema α -4 subjedinici VLA-4 integrina na površini limfocita. On onemogućava kontakt VLA-4 sa ligandom VCAM-1 na površini vaskularnih endotelnih ćelija mozga i kičmene moždine i na taj način redukuje adheziju i migraciju limfocita u mozak (75).

Kao simptomatska terapija koristi se farmakološka i psihoterapija, a u terapiji spasticiteta koristi se Baklofen, Tizanidin i Baklofenska pumpa za pacijente kod kojih su vrednosti za EDSS > 7. U lečenju bola primenjuju se visoke doze kortikosteroida uz karbapin i antikonvulzivnu terapiju (56).

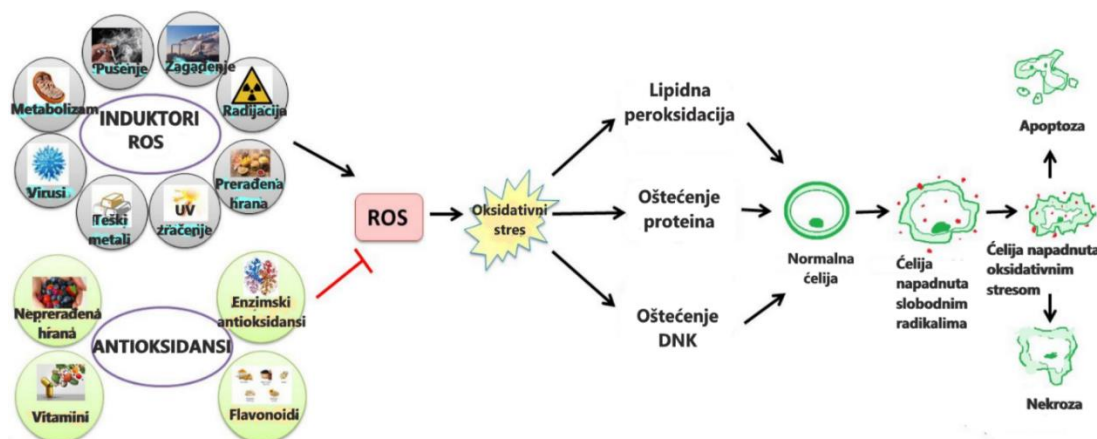
1.2. Značaj oksidativnog stresa u multiploj sklerozi

Multipla skleroza (MS) je bolest posredovana imunskim mehanizmom usmerenim prema autoantigenima mijelinskog omotača što dovodi do hronične inflamacije i destrukcije mijelina, bele mase mozga, neurona i aksona (78). Antigene prepoznaju limfociti i dolazi do stvaranja inflamatornih lezija (plakova) koje se obično nalaze u beloj masi mozga (79). Plakovi su žarišne oblasti unutar CNS gde postoji gubitak mijelina, a nastaju usled prekida integriteta krvno-moždane barijere (eng. *blood brain barrier*, BBB) (79, 80). Prekomerno stvaranje slobodnih radikala kiseonika (ROS) i slobodnih radikala azota (RNS), mitohondrijalna disfunkcija i loš antioksidativni odbrambeni sistem dovode do OS ili nitrooksidativnog stresa (NOS), a oni imaju značajnu ulogu u patogenezi MS (81).

1.2.1. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi multiple skleroze

Oksidativni stres je disbalans u organizmu koji nastaje kada postoji povećana proizvodnja slobodnih radikala koja prevazilazi sposobnost antioksidantnog sistema da ih neutrališe (82, 83).

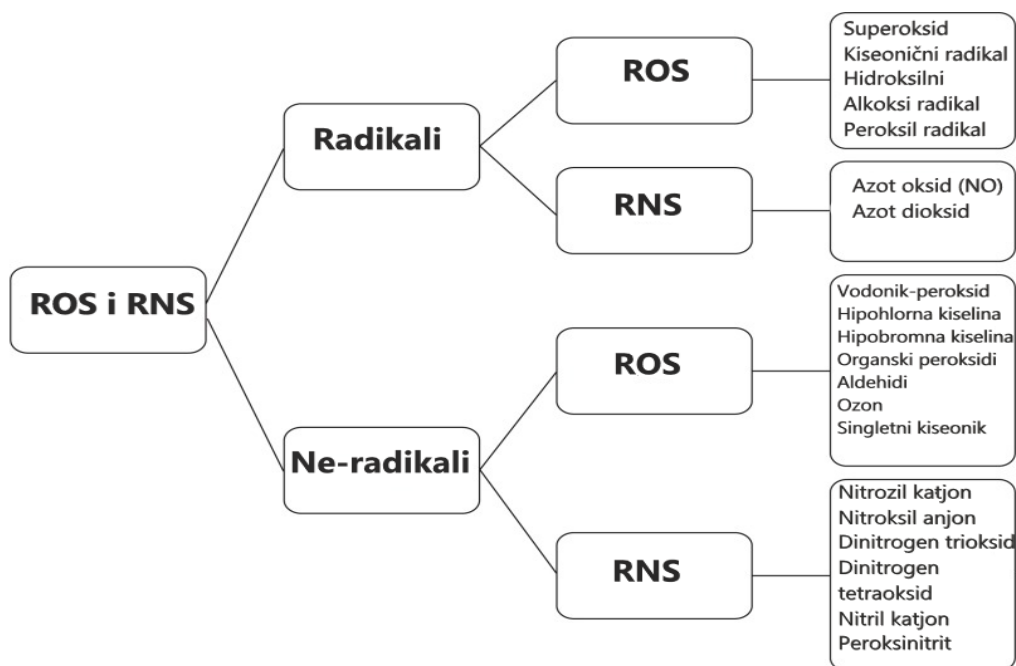
Slobodni radikali su nestabilni, kratkotrajni i visoko reaktivni molekuli koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjem energetsom omotaču i reaguju sa molekulima na površini ćelijske membrane (84). Promena reakcija koje se dešavaju u samoj ćeliji dovode do nastanka slobodnih radikala i peroksida koji deluju na proteine, lipide, dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK), narušavajući unutrašnje mehanizme na ovom nivou. Slobodni radikali se stvaraju u organizmu delovanjem faktora rizika iz spoljašnje sredine koji uključuju zagađenje vazduha, jonizujuće zračenje, dim cigareta ili kao posledica endogenih faktora koji uključuju aktivaciju imunskih ćelija, infekcije, ishemiju kada dolazi do prekoračenja kapaciteta antioksidativnih mehanizama (82, 83) (Slika 2.).



Slika 2. Šematski prikaz povezanosti ROS, oksidativnog stresa i njihovih efekata na ćelije (82).

Najvažniji slobodni radikali su izvedeni iz kiseonika (ROS) i primarno nastaju u mitohondrijama u toku metabolizma ćelije, fizičke aktivnosti, usled izlaganja jonizujućem zračenju, duvanskom dimu, inflamaciji i dr. (85). Njihovo stvaranje u malim koncentracijama ima značajnu i korisnu ulogu u sintezi NO, koji u polimorfonuklearima deluje kao baktericid i antivirusik (86, 87). Klasifikacija ROS i RNS u dve podgrupe, na radikale i neradikale (Slika 3.) (83), bazirana je na prisustvu (radikali) ili

odsustvu nesparenog elektrona (neradikali) (84). Smatra se da su: superoksidni radikal, vodonik peroksid, hidroksilni radikal, azot oksid (NO) i peroksinitrit uključeni u razvoj MS (88).



Slika 3. Šematski prikaz reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i azota (RNS) (84).

Slobodni radikali reaguju sa nezasićenim masnim kiselinama kako na ćelijskim membranama tako i na BBB, pokreću proces lipidne peroksidacije što rezultuje promenama membranskog gradijenta i dovodi do gubitka integriteta i nepovratnog oštećenja BBB (86, 87).

Nivoi slobodnih radikala se povećavaju u stanju inflamacije prevazilazeći antioksidativni kapacitet u lezijama pa tako dolazi do oštećenja mitohondrija, nukleinskih kiselina, lipida i proteina (89). Inflamacija dovodi do nastanka OS i obrnuto, što predstavlja začarani krug (86) koji prouzrokuje demijelinizaciju (90). Makrofagi i mikroglia ćelije ekspimiraju mijeloperoksidazu i podstiču proizvodnju ROS tokom fagocitoze mijelina u beloj masi, što ukazuje na veoma komplikovan odnos između inflamacije, OS i oštećenja aksona unutar plaka (91).

Mozak je organ koji koristi veliku količinu kiseonika tokom metaboličkih procesa, oslobađajući ROS i RNS, što ga čini osetljivim na oksidativne modifikacije različitih biomolekula (92). Utvrđeno je da mozak ima visok sadržaj lipida i nisku aktivnost antioksidantnih enzima u odnosu na druge organe (86). Utvrđeno je da OS kroz oksidaciju proteina, lipida, DNK i oštećenja mitohondrija, pokreće demijelinizaciju i neurodegeneraciju, što dovodi do razvoja MS (93). Disfunkcija mitohondrija, uključujući energetske deficite, defekte u strukturi DNK, abnormalnu gensku ekspresiju i aktivnost enzima uključenih u reparaciju oksidativno modifikovane molekule DNK predstavljaju glavne uzroke degeneracije aksona u MS (94-96). Energetski deficit nastaje kao posledica gubitka funkcije $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaze}$ i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transportera što uzrokuje depolarizaciju membrane i intracelularno povećanje kalcijuma, što čini ćelije podložnim za oksidativna oštećenja, ekscitotoksičnosti i nekontrolisanom oslobađanju slobodnih radikala (97). Povećana permeabilnost membrane i influs Ca^{2+} dovode do poremećaja u transportu kroz akson, a to prouzrokuje bubrenje, fragmentisanje i

dezintegraciju neurona (98). Takođe, aktivirani monociti i ćelije mikroglije eksprimiraju inducibilnu azot oksid sintazu i dolazi do povećanja koncentracije azot oksida (NO) koji dovodi do inaktiviranja superoksid-dismutaze-2 (SOD2) i stvaranja peroksinitrita koji oštećuje ćelijske komponente, inhibira respiratorni lanac mitohondrija i uzrokuje oštećenje DNK (97, 99, 100).

Antioksidativni sistem u neuronima je neefikasan. Većinu odbrambenih funkcija obavljaju astrociti koji učestvuju u regulaciji oksidoreduccionog balansa tako što čuvaju i oslobađaju endogene antioksidanse: glutation i askorbinsku kiselinu. Prevelika aktivacija astrocita i ćelija mikroglije dovodi do proizvodnje proinflammatoryh citokina, ROS i azot oksida (NO) što uzrokuje oštećenja BBB (101).

Oksidativni stres je jedan od primarnih faktora oštećenja ćelija kod inflamacije, kod vaskularnih i neurodegenerativnih bolesti uključujući sve faze MS (102). Kao odgovor ćelija na oštećenje tkiva dolazi do funkcionalnih promena u vaskularnom endotelu, do regrutovanja imunih ćelija, migracije i proliferacije ćelija mikroglije i astrocita i do proizvodnje proinflammatoryh citokina (102). Tokom reparacije oštećenog tkiva dolazi do velikog broja neželjenih efekata koji uključuju aktivaciju fagocita i prekomernu proizvodnju inflammatoryh citokina, ROS i RNS. Kao posledica toga dolazi do migracije leukocita, oštećenja oligodendrocita i oštećenja aksona. Akumulacija ROS i RNS može uzrokovati mutacije u DNK utičući na regulaciju ključnih gena i može aktivirati glavne faktore, kao što je nuklearni faktor κ B (NF κ B) koji reguliše ekspresiju proinflammatoryh gena (102). NF κ B je transkripcioni faktor koji se vezuje za DNK i koji stupa u interakciju sa promotorskim regionom proinflammatoryh gena i njegovom aktivacijom dolazi do ubrzane transkripcije ovih gena i sinteze proinflammatoryh citokina (86). Inflammatoryh citokini TNF- α i IFN- γ su odgovorni u aktivaciji NO-sintaze u makrofagama i ćelijama mikroglije u nastanku azot oksida (NO) u CNS. NO može brzo da reaguje sa superoksidnim anjonom stvarajući peroksinitrit (ONOO⁻) koji je jak oksidans i patogeni agens u MS jer doprinosi inhibiciji mitohondrijalne respiracije.

U cilju sprečavanja štetnog delovanja oksidanasa važnu ulogu ima odbrambeni sistem organizma koga čine antioksidansi. U antioksidativnu zaštitu uključeni su enzimi: katalaza, superoksid-dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza, glutation-S-transferaza, hem-oksigenaza-I-sistem i neenzimski antioksidansi: vitamin C, vitamin E, mokraćna kiselina, lipoinjska kiselina, urea, glutation, albumin, feritin (103). Sintezu većine antioksidanasa reguliše transkripcioni faktor Nrf2, koji se aktivira dejstvom OS. MS-pacijenti imaju nizak nivo antioksidativne zaštite jer se Nrf2 ne aktivira na adekvatan način, uprkos visokom nivou OS, što može biti posledica povećanog acetilovanja usled nedostatka histon deacetilaze (HDAC2) (103). Fragmentacija lipida, denaturacija proteina kao i poremećaji koji su povezani sa mehanizmima replikacije DNK i deformacijom ćelijskih organela predstavljaju glavne posledice OS (101). Aktivnost ROS dovodi do različitih intracelularnih oštećenja, uključujući aktivaciju enzima. Povećan sadržaj ROS unutar ćelija može biti posledica slabljenja njihovih antioksidativnih mehanizama, zbog smanjenja intracelularnih koncentracija redukovanog glutationa (GSH) i promena aktivnosti antioksidativnih enzima. Oksidativno modifikovana jedinjenja ometaju funkciju neurona, što može dovesti do njihove smrti apoptozom ili nekrozom (104). Poseban problem vezan je za činjenicu da nervno tkivo CNS ima slab kapacitet regeneracije zbog smanjene antioksidativne sposobnosti. Zbog ubrzanog metabolizma, kora velikog mozga je glavno mesto nastanka slobodnih radikala i u tom regionu se javlja početni porast aktivnosti SOD, katalaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze, koji predstavlja adaptivni odgovor na OS izazvan spoljnim faktorima (105, 106). Usled dugotrajne izloženosti OS, aktivnost tih enzima je

smanjena, što ima za posledicu oksidativnu inaktivaciju aktivnog enzimskog centra ili dolazi do modifikacije molekula proteina, smanjenja brzine sinteze enzima i nakupljanje peroksida (101).

Istraživanja sugerišu da žensku populaciju karakteriše veća imunska reaktivnost i efikasniji imunski odgovor u infektivnim i neinfektivnim bolestima u odnosu na muškarce (107, 108). Pokazano je da žene imaju više T-ćelija koje su specifičnije za sopstvene antigene u odnosu na muškarce (109), što je verovatno povezano sa većom prevalencom autoimunskih bolesti kod žena (108). S tim u vezi istraživanja su pokazala da oko 78% obolelih od autoimunskih bolesti čine žene (110). Međutim, svi uzroci ovog polnog dimorfizma još uvek nisu dovoljno rasvetljeni (111).

1.2.2. Značaj biomarkera za procenu oksidativnog stresa u multiploj sklerozi

Danas se brojna istraživanja bave otkrivanjem, validacijom i verifikacijom dijagnostičkih biomarkera, posebno onih za rano otkrivanje oštećenja neurona, za procenu ishoda DMT terapije i procene neželjenih efekata terapije kod MS pacijenata (112).

Brojne oksidativno izmenjene biomolekule (lipidi, proteini, DNK/RNK, enzimi) su predložene za biomarkere procene nivoa OS. Osim pojedinačnih biomarkera OS, kliničku primenu u proceni OS imaju ukupni antioksidativni status (TAS), ukupni oksidativni status (TOS) i indeks oksidativnog stresa (OSI), kao najpouzdaniji u proceni ravnoteže između cirkulišućih antioksidanasa i oksidanasa (113-115). Narušavanjem ravnoteže između prooksidanasa i antioksidativne zaštite, dolazi do porasta indeksa OSI što predstavlja potvrdu poremećene ravnoteže između oksidanasa i antioksidativne zaštite kod MS-pacijenata.

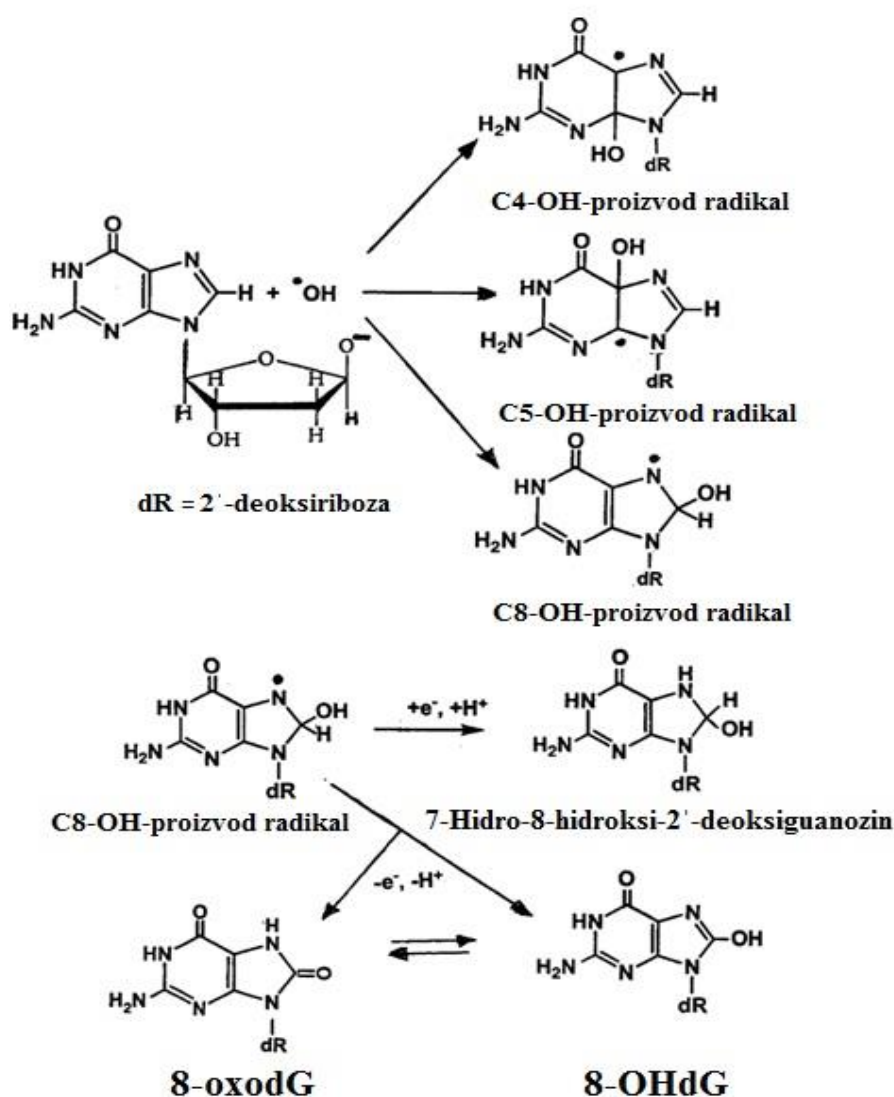
1.2.3. Značaj 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oksodG) i polimorfizma gena enzima 8-oksoguanin DNK glikozilaze 1 (OGG1 rs 1052133) u multiploj sklerozi

Interakcija između slobodnih radikala i DNK dovodi do modifikacije nukleobaza i nastanka lezija (116), a akumulacija lezija je povezana sa starenjem i različitim patološkim stanjima (117). Od svih baza, guanin najpre podleže delovanju ROS. U okviru bogatog sistema reparacije organizma, koga između ostalih čini enzim 8-oksoguanin DNK glikozilaza 1 (hOGG1) vrši se prepoznavanje, isecanje i uklanjanje modifikovane nukleobaze 8-okso-7,8-dihidrogvanina (8-oksoG) i modifikovanog nukleozida 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oksodG) nakon oštećenja (117). Ova dva proizvoda, 8-oksoG i 8-oksodG se izlučuju putem urina i predstavljaju glavne proizvode *in vivo* reparacije DNK oštećene oksidativnim stresom. Abazično mesto i popravka u DNK se završava delovanjem fosfodiesteraze, DNK polimeraze i DNK ligaze (118).

U reakciji 2'-deoksiguanozina sa hidroksilnim radikalom (OH[•]) dolazi do hidroksilacije 2'-deoksiguanozina i stvaranja 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin radikala, koji oksidacijom prelazi u 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (Slika 4.) (119). Nakon toga, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin podleže keto-enolnoj tautomeriji i nastaje glavni proizvod oksidativnog oštećenja DNK, 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin. Nivo urinarne ekskrecije 8-oksodG odražava sledeće procese u organizmu: stepen oksidativnog oštećenja DNK, brzinu prometa nukleinskih kiselina i aktivnost specifičnih enzima reparacije DNK (enzimi reparacije nukleotida i različite endonukleaze) (120-122). On je biomarker

sistemskih efekata OS sa promutagenim potencijalom i koristi se kao neinvazivni pristup u proceni oksidativnog oštećenja DNK i rezultat je delovanja mehanizama reparacije (123).

Određivanjem koncentracije biomarkera, 8-oksodG/kreatinin u urinu ima značajnu ulogu u proceni sistemskih efekata OS na organizam. Koristi se kao neinvazivni biomarker za procenu oksidativno oštećene DNK (123). Stabilan je tokom dugotrajnog čuvanja uzoraka i ima visoku specifičnost i selektivnost koja se postiže prilikom merenja njegove koncentracije izokratskom HPLC-MS/MS metodom (121, 122, 124), a rezultati se izražavaju kao indeks 8-oksodG/kreatinin, gde se nivo kreatinina u urinu koristi za normalizaciju koncentracije ovog biomarkera u pojedinačnom uzorku urina (125,126). Izražavanje nivoa 8-oksodG kao indeks 8-oksodG/kreatinin moguće je pod uslovom da je urinarno izlučivanje kreatinina konstanto tj. da ne postoje inter i intra-individualne razlike u izlučivanju kreatinina i ako je funkcija bubrega očuvana. U ostalim slučajevima preporučuje se 24h urin, kao uzorak izbora. Ovaj biomarker je evaluiran kao biomarker OS izazvanog duvanskim dimom (127).



Slika 4. Šematski prikaz sinteze 8-oxo-7,8dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oksodG) (119.).

Enzim OGG1 sprečava akumulaciju mutacija i učestvuje u regulaciji transkripcije različitih gena uključenih u odgovoru na OS (128). Otkriveno je više genetičkih varijanti unutar OGG1 lokusa, a među njima je najčešća varijanta rs1052133 (Ser326Cys) koja predstavlja zamenu nukleotida C u G,

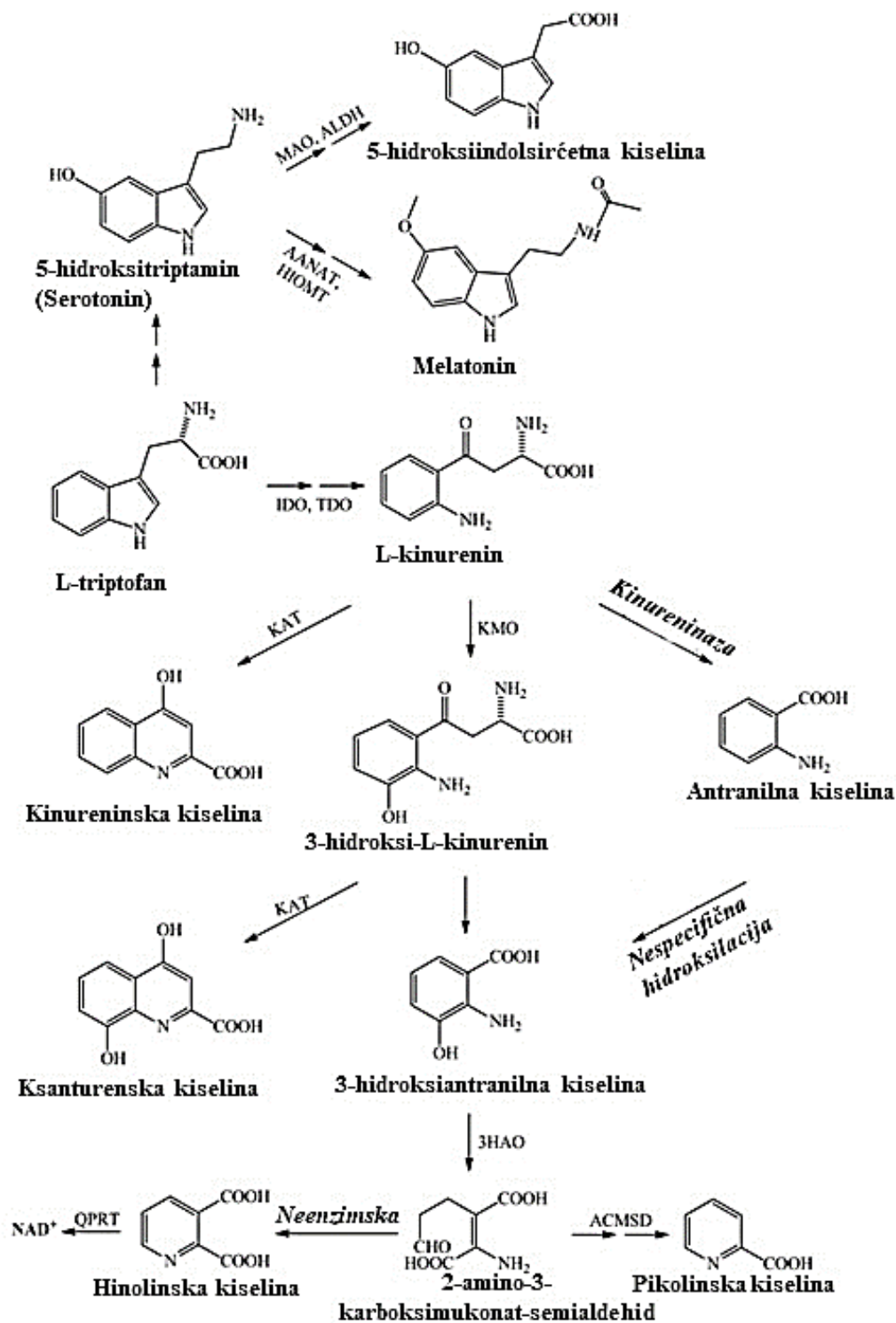
na poziciji 1245 u egzonu 7 (C→G), što za posledicu ima zamenu serina u cistein na položaju 326 (127). Protein Cys326 (G) ima oko 7 puta slabiji kapacitet reparacije 8-OHG od proteina Ser326 (C) (129,130).

1.3. Značaj kinureninskog puta metabolizma triptofana u multiploj sklerozi

U patogenezi MS prisutni su poremećaji metabolizma esencijalne aminokiseline triptofana (TRP), kao i njenih metabolita: kinurenina, melatonina i serotonina (131). Kod pacijenata sa MS, poremećaji metabolizma TRP se reflektuju na izmenjene koncentracije TRP i njegovih metabolita u serumu, plazmi, likvoru i urinu (131).

TRP kao esencijalna, aromatična amino kiselina, osim što je prekursor biosinteze proteina, važan je supstrat za nekoliko bioaktivnih supstanci u ljudskom organizmu i metabolizuje se kroz dva različita puta: serotonin / melatoninski put (oko 1%) i kinureninski put (KP) (oko 95%). Fiziološki značaj glavnog KP je biosinteza oksidovanog oblika nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD⁺), esencijalnog kofaktora uključenog u sintezu adenozin trifosfata i transfer vodonikovog jona u brojnim enzimskim reakcijama. Akumulacija nekih metabolita TRP može izazvati oksidativno oštećenje ćelija i posledično može pokrenuti inflamatorne procese, što doprinosi razvoju sistemskih bolesti, uključujući i neurodegenerativne (132). Smanjeni nivoi TRP u cirkulaciji povezani su sa povećanim rizikom od razvoja MS (133). Enzimi uključeni u KP imaju značajnu ulogu u imunomodulaciji i različitim redoks reakcijama, tako da poremećaj ovog puta dovodi do progresije bolesti. Prisustvo hroničnog oksidativnog stresa i aktivacija ćelija mikroglije kod pacijenata sa MS dovodi do oštećenja mitohondrija i do nastanka neurodegeneracije (134). Regulatorni enzimi u kinureninskom putu, IDO-1 i TDO se mogu indukovati / suprimirati delovanjem različitih faktora. Glavni induktor enzima IDO-1 je interferon- γ , samostalno i u sinergizmu sa drugim proinflamatornim citokinima (IL-1, TNF- α , IL-1 β). Neuroinflamacija i pogoršanje MS se mogu smanjiti inhibicijom aktivnosti enzima IDO-1 (134).

Kaskadni KP počinje oksidacijom TRP do N-formilkinurenina u glavnoj regulatornoj reakciji koju katalizuje triptofan 2,3-dioksidogenaza (TDO) i enzim indoleamin 2,3-dioksidogenaza u dve izoforme (IDO-1 i IDO-2) (Slika 5.). N-formilkinurenin se brzo prevodi u kinurenin (KIN), koji se uključuje u tzv. neuroprotektivni put u kome se kinurenin prevodi u kinureninsku kiselinu (KA) i drugi tzv. neurotoksični put, kada nastaju metaboliti 3-hidroksikinurenin (3-HK), 3-hidroksi antranilna kiselina (3-HAA), pikolinska kiselina (PA), antranilna kiselina (AA), ksanturenska kiselina (KSA) i hinolinska kiselina (QA) (135).



Slika 5. Kinureninski put metabolizma TRP (135.)

MAO: monoaminooksidaza; ALDH: aldehyd dehidrogenaza; AANAT: arilalkilamin N-acetiltransferaza; HIOMT: hidroksiindol-O-metiltransferaza; IDO: indoleamin 2,3-dioksigenaza; TDO: triptofan 2,3-dioksigenaza; KAT: kinurenin-aminotransferaza; QPRT: fosforibozil transferaza hinolinske kiseline; ACMSD: aminokarboksimumonat semialdehid dekarboksilaza

Ravnoteža između neuroprotektivnih i neurotoksičnih metabolita je od ključne važnosti za normalno funkcionisanje mozga. Neuroprotektivne uloge KIN i KA se pripisuju, između ostalog i njihovim antioksidativnim osobinama, zahvaljujući kojima štite makromolekule od oksidativne modifikacije i sprečavaju oštećenje tkiva izazvano prekomernim inflamatornim odgovorom (132). Metaboliti 3-HK i 3-HAA ispoljavaju neurotoksičnost indukcijom oksidativnog stresa, aktivacijom apoptoze neuronskih ćelija i pojačavanjem citotoksičnosti QA (134). KA je snažan antagonist ekscitatornog glutamatnog receptora na N-metil-D-aspartat (NMDA) i glicin, dok je hinolinska kiselina (QA) selektivni agonist ovog receptora (136). Prekomerna stimulacija NMDA-receptora indukuje povećani efluks Na^+ , Ca^{2+} , K^+ u ciljne neurone i oligodendrocite. Visoke koncentracije Ca^{2+} deluju neurotoksično na ćelije i dovode do oštećenja koje je povezano sa neurodegenerativnim bolestima uključujući i MS (137). Aktivirane ćelije mikroglije i makrofagi su glavni izvor QA u mozgu. Neurotoksični potencijal QA se može pripisati: stimulaciji oslobađanja glutamata od strane neurona, inhibiciji preuzimanja glutamata od astrocita, stvaranju reaktivnih vrsta kiseonika koji posreduju u lipidnoj peroksidaciji i sniženju endogenih antioksidanasa (138-140). Takođe, poremećaj ravnoteže između koncentracija QA i KA stimuliše proizvodnju slobodnih radikala, narušava se BBB i dolazi do povećanja fosforilacije strukturnih proteina (neurofilamenata, tau proteina, glija fibrilarni protein) što destabilizuje citoskelet neuronskih ćelija (141).

1.4. Značaj lakih lanaca neurofilamenata u dijagnostici i praćenju multiple skleroze

U dijagnostici MS značajnu ulogu imaju tehnike magnetne rezonance i evociranih potencijala, kao i analiza likvora kojom se vrši detekcija intratekalne sinteze imunoglobulina G (oligoklonalne trake, koje su prisutne u najranijoj fazi MS), ali svaka od njih ima ograničenu dijagnostičku osetljivost i specifičnost (142). Za kompleksne i heterogene bolesti poput MS, neophodna je validacija i implementacija novih laboratorijskih biomarkera koji mogu pomoći u dijagnozi bolesti, stratifikaciji pacijenata i objektivnom praćenju progresije i odgovora na lečenje (143).

Rani biomarker oštećenja aksona kod MS je nivo lakih lanaca neurofilamenata (NfL), koji se mogu određivati u likvoru i serumu. Neurofilamenti su specifični proteini citoskeleta neurona koji imaju značajnu ulogu u održavanju oblika i veličine aksona. Sastoje se od tri subjedinice: lakih lanaca (NfL), srednjih lanaca (NfM) i teških lanaca (NfH) (144).

Laki lanci neurofilamenata (NfL) predstavljaju jedan od značajnih biomarkera koji su pokazatelji ranog oštećenja neurona i važni su u slučaju „klinički tihe bolesti” kada je tumačenje kliničkih promena otežano (145). Hronična upala bele moždane mase povezana je sa povećanjem nivoa NfL i težinom MS (146). Osim toga, NfL predstavlja dobar prognostički indikator formiranja lezije i atrofije mozga kod MS pacijenata (147). Zbog značajne korelacije između nivoa serumskog NfL (sNfL) i NfL u likvoru, smatra se da je sNfL osetljiv i specifičan neinvazivan biomarker u dijagnostici MS i praćenju efikasnosti terapije. S tim u vezi, utvrđeno je da se povećanje sNfL dovodi u vezu sa povećanim rizikom od pogoršanja invaliditeta (148).

1.5. Značaj sfingozin-1-fosfata u multiploj sklerozi

Sfingozin-1-fosfat (S1P) je signalni sfingolipidni molekul, uključen u inhibiciju apoptoze, proliferativnu i inflamatornu signalizaciju (59). Stvaraju ga eritrociti, endotelne ćelije i trombociti (149). Nastaje delovanjem sfingozin kinaze 1 i 2 na sfingozin. Oko 1-2% cirkuliše kao aktivni oblik, dok je većim delom vezan za lipoproteine niske i visoke gustine. Biološka uloga S1P se ostvaruje vezivanjem za receptore (S1PR) gde dolazi do transdukcije signala preko G-proteina. S1P signalizacija ima značajnu ulogu u aktivaciji i proliferaciji mikroglija i oligodendrocita. S1PR su eksprimirani u ćelijama CNS uključujući oligodendrocite, mikroglije i astrocite. Postoji pet tipova receptora u zavisnosti od lokalizacije i to: S1P1-3 u vaskularnom endotelu S1P4 u imunskom sistemu i S1P5 u CNS (oligodendrocitima) i u slezini (59). Signalni putevi regulišu razvoj mozga, srca, tonus bronhija, vaskularnu permeabilnost, promet limfocita, aktivaciju i proliferaciju mikroglija i oligodendrocita. Funkcionalna raznovrsnost i široka distribucija receptora za koje je S1P ligand, čini ih pogodnim terapijskim metama kod različitih bolesti, a posebno kod MS.

Modulatori S1P-receptora imaju ulogu u redukciji aktivnosti bolesti ili progresiji MS. Oni slobodno prolaze BBB i imaju potencijalne neuroprotektivne i antiinflamatorne efekte u CNS koji su posredovani podtipom receptora (76).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj naučnog istraživanja doktorske disertacije je da se utvrdi klinički značaj oksidativnog stresa i kinureninskog puta metabolizma triptofana u nastanku i razvoju relapsno-remitentne multiple skleroze (RRMS) u populaciji Srbije. Takođe, cilj je da se utvrdi potencijalna primena biomarkera oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, genetičke varijante enzima reparacije oksidativno oštećene molekule DNK, lakih lanaca neurofilamenata, kinureninske i hinolinske kiseline u dijagnostici i prognostici RRMS kao i praćenju efekata imunomodulatorne/imunosupresorne terapije. Za postizanje definisanog cilja planirano je da se ispita sledeće:

- Utvrditi razlike u koncentraciji TAS, TOS, OSI i 8-oksodG/kreatinina između grupe pacijenata sa RRMS i zdravih ispitanika.
- Utvrditi pojedinačne i udružene uticaje pola, pušačkog statusa i izloženosti sunčevom zračenju na koncentraciju TAS, TOS, OSI i 8-oksodG/kreatinin, kod pacijenata sa RRMS i zdravih ispitanika.
- Utvrditi frekvencije genotipova i alela genetičke varijante rs1052133 u OGG1 i odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže kod pacijenata sa RRMS i u kontrolnoj grupi i ispitati njenu povezanost sa nastankom RRMS.
- Utvrditi povezanost između genetičke varijante OGG1 rs1052133 i nivoa urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinina, kod RRMS pacijenata i kontrolne grupe.
- Utvrditi povezanost između OGG1 rs1052133 genotipova/alela, pušačkog statusa i nivoa 8-oksodG/kreatinina kod RRMS pacijenata i kontrolne grupe.
- Utvrditi pojedinačne i udružene uticaje progresije bolesti, pola i pušačkog statusa na parametre oksidativnog stresa (TAS, TOS, OSI i 8-oksodG/kreatinin), metabolite kinureninskog puta (kinureninska i hinolinska kiselina), lake lance neurofilamenata u serumu (sNfL) i nivo sfingozin-1 fosfata (S1P) kod pacijenata sa RRMS.
- Utvrditi uticaj DMT terapije na parametre oksidativnog stresa (TAS, TOS, OSI i 8-oksodG/kreatinin), metabolite kinureninskog puta (kinureninska i hinolinska kiselina), lake lance neurofilamenata u serumu (sNfL) i nivo sfingozin-1-fosfata (S1P) kod RRMS pacijenata u odnosu na pol, progresiju bolesti i pušački status.
- Utvrditi razlike u efikasnosti terapije određenim lekom iz grupe DMT (interferon beta-1a, interferon beta-1b, glatiramer acetat i modulatori sfingozin-1-fosfat receptora), procenjene pomoću koncentracije sNfL nakon šestomesečne terapije, kod svih RRMS pacijenata i u zavisnosti od pola i starosti.
- Utvrditi uticaj terapije određenim lekom iz grupe DMT (interferon beta-1a, interferon beta-1b, glatiramer acetat i modulatori sfingozin-1-fosfat receptora) na parametre osidativnog

stresa (TAS, TOS, OSI, 8-oksodG/kreatinin), metabolite kinureninskog puta (kinureninska i hinolinska kiselina) i nivo sfingozin-1-fosfata (S1P) nakon šestomesečne terapije kod RRMS pacijenata.

- Utvrditi razlike u efikasnosti terapije određenim lekom iz grupe DMT (interferon beta-1a, interferon beta-1b, glatiramer acetat i modulatori sfingozin-1-fosfat receptora), procenjene pomoću sNfL nakon šestomesečnog praćenja u odnosu na genetičku varijantu OGG1 rs1052133.
- Utvrditi povezanost između konzumacije kravljeg mleka i težine MS kod pacijenata na DMT terapiji.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je realizovano u dva pravca, kao studija tipa slučaj-kontrola (eng. *case-control*) i studija praćenja (eng. *follow-up study*) u periodu od marta 2018. do jula 2019. godine. Sprovođenje ovog istraživanja je odobreno od strane Etičkog odbora VMA (broj 4494-1) i Etičkog odbora Farmaceutskog fakulteta (broj 358/1).

U istraživanju je učestvovalo 175 pacijenata obolelih od RRMS (76 muškaraca (43,4%) i 99 žena (56,6%) prosečne starosne dobi $33,43 \pm 9,1$ godina. Odnos muškarci/žene je bio 1:1,3. Prosečno trajanje bolesti je bilo 7,6 godina (raspon 1-32 godine). MS je klasifikovana prema MSSS kriterijumu na: blagu (MSSS<3,4), umerenu (MSSS 3,4-6,7) i tešku (MSSS>6,7) formu bolesti (51). Pacijenti su lečeni na Klinici za neurologiju VMA. Od ukupnog broja pacijenata, 111 je primalo DMT terapiju koja menja prirodni tok bolesti (56 muškaraca i 55 žena), a 64 je bilo bez terapije (20 muškaraca i 44 žene). Kod pacijenata koji nisu bili na terapiji uzorkovanje je vršeno prilikom redovnih kontrolnih pregleda, a uzorkovanje krvi pacijenata koji su primali terapiju je vršeno pre početka terapije i nakon 6 meseci primene terapije.

Pacijenti na DMT terapiji su primali sledeće lekove: IFN β -1b [Betaferon[®], n=20 (18%)], IFN β -1a [Rebif[®], n=15 (14%)], glatiramer acetat [Copaxone[®], n=10 (9%)] i modulatore sfingozin-1-fosfat receptora [S1PR-modulatori: Ponesimod[®], Ozanimod[®] ili Fingolimod[®], n=66 (59%)]. Pacijenti su prosečno primali terapiju 5,04 godine (raspon 0,5-17,5 godina). Praćenje efekata terapije na oksidativni stres posle 6 meseci obuhvatilo je 91 pacijenta. Od njih, 32 je primalo interferon- β [(15 pacijenata je primalo Rebif[®] (11 muškaraca i 4 žene)], 17 pacijenata je primalo Betaferon[®] (12 muškaraca i 5 žena) i 59 pacijenata je primalo S1PR-modulatore [Ponesimod[®], Ozanimod[®] ili Fingolimod[®], 23 muškarca i 36 žena].

Kontrolnu grupu ispitanika činilo je 254 zdrava ispitanika [81 muškarac (31,9%); 173 žene (68,1%)], prosečne starosne dobi $36,90 \pm 8,78$, čiji su rezultati laboratorijskih parametara bili u referentnom intervalu i koji su dobrovoljno, uz pismenu saglasnost pristupili istraživanju. Uzorkovanje je obavljeno u okviru redovnog sistematskog pregleda u Institutu za medicinu rada i Institutu za medicinsku biohemiju VMA.

3.1.1. Podaci o ispitanicima

Sakupljanje podataka o pacijentima i zdravim ispitanicima, kao i sakupljanje uzoraka, sprovedeno je davanjem pismene saglasnosti, što je u skladu sa etičkim principima Helsinške deklaracije i smernicama dobre kliničke i laboratorijske prakse i važećom lokalnom regulativom.

Svi relevantni podaci o ispitanicima su sakupljeni putem upitnika, koje je popunilo zdravstveno osoblje. Upitnik je sadržao sledeće podatke: pol, starost, godina postavljanja dijagnoze i terapija za pacijente, indeks telesne mase [BMI=težina(kg)/visina² (m²)], način ishrane (zastupljenost mleka u

ishrani), pušački status (aktivni pušač, nepušač, bivši pušač, pasivni pušač) i boravak na otvorenom (izlaganje sunčevim zracima). Informisani pristanak pacijenata je sadržao kratak opis, svrhu i cilj istraživanja, uz svojeručni potpis pacijenata i zdravih ispitanika kao i potpis istraživača.

3.1.2. Kriterijumi za uključivanje ispitanika u istraživanje

U istraživanju su uključeni pacijenti sa dijagnostikovanom multiplom sklerozom, relapsno remitentnog toka bolesti, dijagnostikovani po McDonald's kriterijumima (150).

Kriterijumi za isključenje iz studije su: prisustvo primarno-progresivnog oblika multiple skleroze, dijabetes melitus, srčana oboljenja, oboljenja bubrega, disfunkcija štitne žlezde i autoimune bolesti.

3.1.3. Uzorci ispitanika

Za ispitivanje parametara oksidativnog stresa (TOS i TAS), serumskih lakih lanaca neurofilamenta (sNfL), metabolita triptofana [kinureninsku kiselinu (KA) i hinolinsku kiselinu (QA)] i sfingozin-1-fosfata (S1P) uzet je uzorak krvi u zapremini od 10 ml bez antikoagulansa, a za analizu genetičke varijante 8-oksoguanin DNK glikozilaze 1 (OGG1 rs1052133) uzeto je 3,5 ml krvi sa 3,8% Na-citratom, kao antikoagulansom. Uzorkovanje venske krvi ispitanika i pacijenata je obavljeno u jutarnjim časovima, nakon noćnog gladovanja (>10h) koristeći vakutajner sistem (*Beckton & Dickinson Vacutainer® Blood Collection Tubes*). Uzorci krvi su nakon spontane koagulacije centrifugirani na 850xg (3000 obrt/min), 15 min. a serum podeljen u manje alikvotne i zamrznut na -80 °C do analiziranja.

Za analizu genetičke varijante OGG1 rs1052133, uzorak krvi je zamrznut na -20 °C do analiziranja.

Za analizu 8-oksodG/kreatinin, od ispitanika je uzeto 10 ml uzorka prvog jutarnjeg urina. Uzorkovanje urina je vršeno u sterilne posude. Uzorci urina su centrifugirani na 850xg (3000 obrt/min), 15 min, a zatim zamrznuti do analiziranja. Neposredno pre analize, uzorci su ostavljeni na 3-8 °C da se spontano odmrznu. Nakon toga su homogenizovani na vorteks mešalici i potom sonifikovani 5 min u ultrazvučnom kupatilu. Zatim su centrifugirani na 10000xg 5 min i analizirani.

3.2. Metodologija određivanja izabranih biomarkera

Analiza biomarkera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite TOS, TAS i OSI obavljena je u Laboratoriji za medicinsko biohemijske analize Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu u uzorku seruma kod svih ispitanika. Određivanjem biomarkera TOS i TAS (113, 114) dobija se uvid u redoks stanje organizma. Izračunavanjem indeksa OSI (115) može se proceniti da li je narušena ravnoteža između oksidanasa i antioksidativne zaštite, odnosno da li je došlo do razvoja oksidativnog stresa.

Analiza urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin je obavljena na Katedri za farmaceutski hemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, primenom direktnog neizotopskog merenja, pomoću HPLC-MS/MS metode (spregnuta visoko osetljiva tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa masenom spektrometrijom). Analiza kreatinina u urinu je urađena u Institutu za

medicinsku biohemiju VMA, na automatskom analizatoru Advia 1200 firme Siemens (Siemens Healthcare Diagnostic, Tarrytown, NY, USA) primenom kinetičke, *Jaffe* metode.

Biomarkeri: serumski laki lanci neurofilamenata, sfingozin-1-fosfat, hinolinska kiselina i kinureninska kiselina su određeni primenom imunohemijskih ELISA testova (BioAssay™ Elisa) na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Svim ispitanicima je urađena analiza genetičke varijante u genu 8-oksoguanin glikozilaze-1 (OGG1 rs1052133), PCR metodom, nakon izolovanja DNK iz pune krvi, u Institutu za nuklearne nauke Vinča, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Prema pušačkom statusu pacijenti i kontrolni ispitanici su podeljeni na: pušače, nepušače, bivše pušače i pasivne pušače. Prema izloženosti suncu: na one koji se izlažu i koji se ne izlažu suncu, a prema konzumiranju mleka, na one koji koriste i koji ne koriste mleko u ishrani.

Kod kontrolnih ispitanika su analizirani nivoi biomarkera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kao i genetička varijanta OGG1 rs1052133.

Kod pacijenata sa multiplom sklerozom koji nisu primali terapiju, kao i kod onih na terapiji analizirani su nivoi biomarkera oksidativnog stresa (TOS, TAS, OSI, 8-oksodG/kreatinin). Ovi parametri su analizirani i kod pacijenata pre i posle terapije u trajanju od šest meseci. Biomarkeri oksidativnog stresa, metaboliti triptofana (kinureninska i hinolinska kiselina), sfingozin-1-fosfata i laki lanaci neurofilamenata su analizirani kod 40 pacijenata, pre terapije i nakon šest meseci.

3.2.1. Analiza parametara oksidativnog stresa

3.2.1.1. Određivanje nivoa ukupnog antioksidativnog statusa u serumu (eng. total antioxidant status TAS)

Nivo serumskog TAS je određen modifikovanom metodom po Erel-u (113). Reakcija se zasniva na oksidaciji stabilnog hromogena, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline (ABTS), do odgovarajućeg katjona (ABTS^{•+}) uz pomoć vodonik-peroksida u kiseloj sredini, pri čemu nastaje smaragdna boja. Antioksidanasi iz uzorka deluju na obojeni jon ABTS^{•+} i on se redukuje do bezbojnog ABTS-a, što se manifestuje smanjenjem intenziteta boje na 660 nm. Intenzitet obezbojavanja srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Vrednosti se očitavaju iz standardne krive (Slika 6), a najčešće upotrebljavan standard je Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina), hidrosolubilni ekvivalent vitamina E, prikazano na Slici 6. Metoda je kolorimetrijska i aplikovana je na biohemijskom analizatoru Olympus AU400® (Beckman Coulter, Inc, USA), a aplikacija je prikazana na Slici 7. Koncentracije analita su preračunate na osnovu izmerenih apsorbancija, pomoću linearne regresione jednačine $Y=AX+B$, gde su nagib $A=1,7343$ i odsečak $B=0$. Metoda je pokazala statistički značajnu preciznost, sa koeficijentom varijacije u seriji za TAS 1,85%, koeficijent varijacije originalne metode za TAS je 2,9%.

Hemikalije i reagensi:

- Natrijum-acetat: POCH S.A., CAS No. 805640115, $C_2H_3NaO_2$
- Sirćetna kiselina: NRK, Inženjering Beograd, CAS No.64-19-7, $C_2H_4O_2$
- Vodonik-peroksid: NRK, Inženjering Beograd, CAS No. 7722-84-1, H_2O_2
- ABTSTM : Sigma-AldrichCo, CAS No.30931-67-0, $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$
- Trolox: Sigma-AldrichCo, CAS No. 135806-59-6, $C_{15}H_{20}O_4$
- Fosfatni pufer: Fisher Chemical, J/2850/15*FSH, $Na_3H_3P_2O_8$

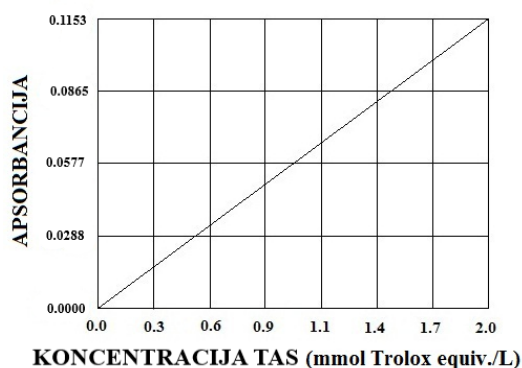
1. **Reagens 1 (TAS):** Acetatni pufer ($c=0,4$ mol/L, $pH=5,8$). Pripremljen je mešanjem 940 ml natrijum-acetata ($c=0,4$ mmol/L) i 60 ml sirćetne kiseline ($c=0,4$ mmol/L) za 1000 ml rastvora. Reagens je stabilan 6 meseci, na $+4$ °C.
2. **Reagens 2 (TAS):** 30 ml acetatnog pufera (30 mmol/L pH 3,6) i 70 ml rastvora vodonik-peroksida (2 mmol/L). U 100 ml pripremljenog rastvora doda se 0,549 g ABTS-a. Rastvor se inkubira 1h na sobnoj temperaturi do pojave plavo-zelene boje ABTS⁺ jona. Reagens je stabilan 6 meseci, na $+4$ °C.
3. **Standardni rastvor (TAS):** rastvor Trolox-a ($c=2$ mmol/L). Rastvor Trolox-a je pripremljen rastvaranjem 0,0005g Trolox-a u 10 mL fosfatnog pufera ($c=30$ mmol/L, $pH=7,4$).

Postupak za određivanje parametra TAS prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Postupak za određivanje ukupnog antioksidativnog statusa u serumu

	Slepa proba (μL)	Standard (μL)	Analiza (μL)
Reagens 1	200	200	200
Reagens 2	25	25	25
Destilovana voda	5	-	-
Standard	-	5	-
Uzorak	-	-	5

Nakon mešanja svih komponenti u reakcionoj kivetici, smiša se inkubira 5 minuta na 37 °C i absorbanca očitava 660 nm.



Slika 6. Standardna kalibraciona kriva za određivanje TAS

Specific Test Parameters									
General		LIH	ISE	Range					
Test Name:	TAS		<	>	Type:	Serum		Operation: Yes	
Sample:	Volume	5.0	µL	Dilution	0	µL	Pre-Dilution Rate:	1	
Reagents:	R1 Volume	200	µL	Dilution	0	µL	Min OD	Max OD	
	R2 Volume	25	µL	Dilution	0	µL	L	H	
Wavelength:	Pri.	660		Sec.			Reagent OD limit:	First L	First H
Method:	END						Last L	Last H	
Reacting slope:	-						Dynamic Range:		
Measuring Point 1:	First	0		Last	26		Correlation Factor:	-999999.9	H 999999.9
Measuring Point 2:	First	0		Last	10				
Linearity:			%				A	1.00000000	B 0.00000000
No Lag Time:							On-board stability period:		

Slika 7. Aplikacija metode za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAS) na analizatoru Olympus AU400 (Beckman Coulter, Inc, Brea, USA)

3.2.1.2. Određivanje nivoa ukupnog oksidativnog statusa (eng. total oxidant status, TOS)

Nivo ukupnih oksidanasa prisutnih u serumu pacijenata i zdravih ispitanika određen je primenom modifikovane metode po Erel-u, koja je aplikovana na biohemijском analizatoru Olympus AU400 (Beckman Coulter, Inc., USA) (114). Oksidansi iz uzorka oksiduju fero jon-orto-dianizidni kompleks u feri jon, u kiseloj sredini. Reakcija oksidacije je olakšana prisustvom molekula glicerola u reakcionom medijumu. Stvoreni feri jon gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom i intenzitet nastale boje se meri spektrofotometrijski na 560 nm i proporcionalan je ukupnom sadržaju oksidanasa u uzorku. U originalnoj metodi po Erelu, standardna kriva je dobijena određivanjem jedne koncentracije standarda, metodom krajnje tačke.

U ovoj studiji, koncentracija TOS je određena primenom modifikovane metode standardne kalibracione krive na biohemijском analizatoru Olympus AU400, koja je prikazana na Slici 8. Kalibracija je izvršena metodom krajnje tačke sa dve koncentracije rastvora vodonik peroksida (H_2O_2 : 100 i 200 $\mu\text{mol/L}$) i na osnovu izmerenih apsorbancija konstruisana je kalibraciona kriva. Kao slepa proba korišćena je destilovana voda. Rezultati su preračunati na osnovu definisane poligonalne jednačine, pomoću softvera analizatora i izraženi su u jedinicama $\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Eq/L}$. U dobijenoj jednačini $A_0=1,1575 \times 10^2$, $B_0=0$, $A_1=1,7544 \times 10^2$ i $B=2,9393 \times 10^{-1}$.

Originalna metoda po Erelu je optimizovana u laboratoriji za medicinsko-biohemijske analize, Katedre za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Aplikacija metode je prikazana na Slici 9. Metoda je pokazala statistički značajnu preciznost, sa koeficijentom varijacije u seriji za TOS 1,99%, a koeficijent varijacije originalne metode za TOS je 3,2%.

Hemikalije i reagensi:

- Ksilenol-oranž: Sigma-AldrichCo, CAS No.3618-43-7, $C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$
- Natrijum hlorid: Sigma-AldrichCo, CAS No.7647-14-5, NaCl
- Sumporna kiselina: Lach-Ner, CAS No. 7664-93-9, H_2SO_4
- Glicerol: Sigma-AldrichCo, CAS No.56-81-5, $C_3H_8O_3$

- Feroamonijum sulfat: Sigma-AldrichCo, CAS No.7783-85-9, $N_2H_{20}FeS_2O_{14}$
- O-dianizidin dihidrohlorid: Sigma-AldrichCo, CAS No.20325-40-0, $C_{14}H_{18}N_2O_2Cl_2$
- Sumporna kiselina: Lach-Ner, CAS No. 7664-93-9, H_2SO_4
- Vodoni-peroksid: NRK, Inženjering Beograd, CAS No. 7722-84-1, H_2O_2

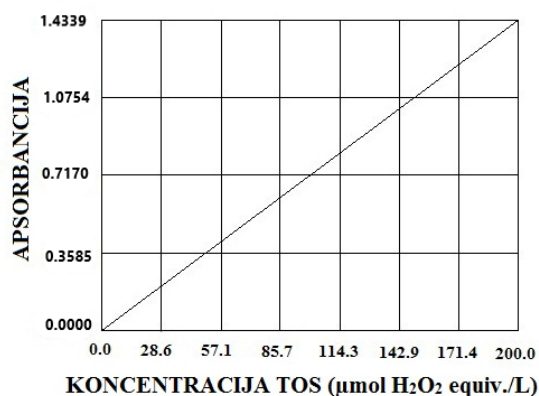
- 1. Reagens 1 (TOS):** Priprema se rastvaranjem 114 mg ksilenol-oranža i 8,18 g NaCl u 900 mL rastvora H_2SO_4 (c=25 mM). U tako dobijeni rastvor dodaje se 100 mL glicerola, a pH vrednost treba podesiti na 1,75. Reagens je stabilan 6 meseci na 4 °C.
- 2. Reagens 2 (TOS):** Priprema se rastvaranjem 1,96 g feroamonijum sulfata i 3,17g o-dianizidin dihidrohlorida u 1000 mL rastvora H_2SO_4 (c=25mM). Reagens je stabilan 6 meseci na 4 °C.
- 3. Standardni rastvori (TOS):** rastvori vodoni-peroksida (c=100 $\mu\text{mol/L}$ i c=200 $\mu\text{mol/L}$)

Osnovni rastvor vodoni-peroksida (c=10 mmol/L) je pripremljen iz 7,75 μL rastvora koncentrovanog vodoni peroksida (30%) u koji je dodata destilovana voda do ukupno 10 ml. Standardni rastvori vodoni-peroksida (c=100 $\mu\text{mol/L}$ i c=200 $\mu\text{mol/L}$) su pripremljeni razblaživanjem osnovnog rastvora (c=10 mmol/L) neposredno pre izvođenja analize. Postupak za određivanje biomarkera TOS je prikazan u Tabeli 2.

Tabela 2. Postupak za određivanje ukupnog oksidativnog statusa u serumu (TOS)

	Slepa proba (μL)	Standard (μL)	Analiza (μL)
Reagens 1	225	225	225
Reagens 2	25	25	25
Destilovana voda	35	-	-
Standard	-	35	-
Uzorak	-	-	35

Nakon mešanja svih komponenti u reakcionoj kivetu, smeša se inkubira 3-4 minuta i absorbance očitava bihromatski na 560 nm i 800 nm.



Slika 8. Standardna kalibraciona kriva za određivanje TOS

Specific Test Parameters										
General		LIH	ISE	Range						
Test Name:	TOS			<	>	Type:	Serum		Operation:	Yes
Sample:	Volume	35.0	μL	Dilution	0	μL	Pre-Dilution Rate:	1		
Reagents:	R1 Volume	225	μL	Dilution	0	μL	Min OD	Max OD		
	R2 Volume	25	μL	Dilution	0	μL	Reagent OD limit:	L	H	
Wavelength:	Pri.	540		Sec.	800		First L	-2.0000	First H	2.5000
Method:	END					Last L	-2.0000	Last H	2.5000	
Reacting slope:	+					Dynamic Range:				
Measuring Point 1:	First	0		Last	23		Correlation Factor:	-999999.9	H	999999.9
Measuring Point 2:	First	0		Last	10		A	1.0000000	B	0.0000000
Linearity:						On-board stability period:				
No Lag Time:										

Slika 9. Aplikacija za određivanje totalnog oksidativnog kapaciteta (TOS) na analizatoru Olympus AU400 (Beckman Coulter, Inc, Brea, USA)

3.2.1.3. Određivanje indeksa oksidativnog stresa (eng. *Oxidative stress index, OSI*)

Pored direktno izmerenih koncentracija TAS i TOS, izračunat je OSI indeks koji predstavlja odnos koncentracija TOS/TAS. OSI je izračunat primenom formule (115):

$$\text{OSI (arbitrarne jedinice)} = [(\text{TOS (mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L)} / \text{TAS (mmol Trolox Eq/L)})] \times 100$$

3.2.1.4. Određivanje koncentracije 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina u urinu (8-oksodG/kreatinin)

Kao pokazatelj procene oksidativnog stresa i oštećenja DNK molekula kod zdravih ispitanika i pacijenata određena je koncentracija 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oksodG) izražena na koncentraciju kreatinina. Za analizu je korišćen prvi jutarnji urin. Primenjena je HPLC-MS/MS metoda direktnog neizotopskog merenja (spregnuta visoko senzitivna tečna hromatografija pod visokim pritiskom i masena spektrometrija). Nivo kreatinina je određen primenom kinetičke Jaffe metode, na automatskom analizatoru.

Hemikalije i Reagensi:

- 8-oksodG: Sigma-AldrichCo, CAS No.88847-89-6, C₉H₁₃O₆N₅
- Amonijum-acetat: Sigma-AldrichCo, CAS No.631-61-8, C₂H₇O₂N
- Acetonitrile: Sigma-AldrichCo, CAS No.75-05-8, C₂H₃N
- Ultra čista voda: Milli-Q kvaliteta (Sigma-AldrichCo)
- Sirćetna kiselina: NRK, Inženjering Beograd, CAS No.64-19-7, C₂H₄O₂
- Kreatinin: Reagent Advia[®] Chemistry Creatinine_2 (Siemens Healthcare)

1. Priprema mobilne faze:

Kao mobilna faza korišćeni su rastvori amonijum-acetata i acetonitrila. Amonijum-acetat, 10 mM rastvor je pripremljen rastvaranjem 771 mg amonijum-acetata u 1L vode. Podešavanje pH vrednosti rastvora amonijum-acetata (pH=4,3) vrši se pomoću sirćetne kiseline. Amonijum-acetat i acetonitril su mešani u zapreminskom odnosu 96,4:3,6. Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz najlon filter (0,2 μm).

2. Priprema osnovnog i radnih rastvora standardne supstance:

- Osnovni rastvor 8-oksodG, oko $c=2 \cdot 10^6$ nmol/L, pripremljen je rastvaranjem 1 mg supstance 8-oksodG-a u 1,765 mL vode.
- Razblaženi rastvor 8-oksodG, od oko $c=2 \cdot 10^5$ nmol/L, pripremljen je mešanjem 100 μL osnovnog rastvora 8-oksodG ($\sim c=2 \cdot 10^6$ nmol/L) i 900 μL vode, za 1 mL rastvora. Tačna koncentracija ovog rastvora utvrđena je spektrofotometrijski na aparatu UV-1800 UV Spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) koristeći poznate vrednosti za ekstinkciju 8-oksodG ($\epsilon=12,300$ at 245 nm) (151).
- Radni rastvor 8-oksodG ($c=2000$ nmol/L) je pripremljen iz razblaženog rastvora, neposredno pre analize, mešanjem 20 μL razblaženog rastvora ($\sim c=2 \cdot 10^5$ nmol/L) i 1980 μL vode kako bi se dobila tačna radna koncentracija 8-oksodG od 2000 nmol/L. Radni rastvor je dalje korišćen za pripremu standardnih rastvora različitih koncentracija 8-oksodG [c (nmol/L) =0; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0] u vodi i pool-u urina zdravih ispitanika.

Priprema standardnih rastvora 8-oksodG, određene koncentracije i način njihovog čuvanja prikazan je u Tabeli 3.

Tabela 3. Priprema i čuvanje standardnih rastvora i kalibratora 8-oksodG

Naziv	Koncentracija	Priprema	Čuvanje
Osnovni	$2 \cdot 10^6$ nmol/L	1 mg + 1,765 mL H ₂ O	-80 °C
Razblaženi	$2 \cdot 10^5$ nmol/L	100 μL ($2 \cdot 10^6$ nmol/L) + 900 μL H ₂ O	-80 °C
Radni	2000 nmol/L	20 μL ($2 \cdot 10^5$ nmol/L) + 1980 μL H ₂ O	7 dana na +4 °C
Osnovni kalibrator	200 nmol/L	300 μL (2000 nmol/L) + 2700 μL H ₂ O/pool	ex tempore
Radni kalibrator	100 nmol/L	2000 μL (200 nmol/L) + 2000 μL H ₂ O/pool	ex tempore
Radni kalibrator	50 nmol/L	2000 μL (100 nmol/L) + 2000 μL H ₂ O/pool	ex tempore
Radni kalibrator	25 nmol/L	2000 μL (50 nmol/L) + 2000 μL H ₂ O / pool	ex tempore
Radni kalibrator	12,5 nmol/L	2000 μL (25 nmol/L) + 2000 μL H ₂ O/pool	ex tempore
Radni kalibrator	6,25 nmol/L	2000 μL (12,5 nmol/L) + 2000 μL H ₂ O / pool	ex tempore
Radni kalibrator	0 nmol/L	H ₂ O / pool	ex tempore

Uslovi razdvajanja 8-oksodG primenom HPLC-MS/MS:

- Kolona: Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ (3 μ m, 100 L \times 4.6 mm ID)
- Predkolona za UHPLC-SecurityGuard ULTRA Cartridges, UHPLC C18 for 2.1mm ID
- Mobilna faza (A): amonijum-acetat (c=10 mM)
- Mobilna faza (B): acetonitril
- Protok mobilne faze: 500 μ L/min
- Temperatura kolone: 25 $^{\circ}$ C
- Jonski izvor HESI: analiza pozitivnih jona
- Maseni analizator: kvadrupol
- Temperature kapilare: 280 $^{\circ}$ C
- Napon kapilare: 5000V

Izvođenje analize:

Merenje 8-oksodG u urinu vršeno je na Thermo ACCELA (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) HPLC-u povezanim sa masenim spektrofotometrom Thermo TSQ Quantum Access Max (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) koji se sastoji od tri kvadrupolna analizatora i koji je opremljen elektrosprej jonskim izvorom za zagrevanje (HESI). Svi analizirani urini i standardi su snažno promešani, sonificirani 2 minuta i zatim centrifugirani 10 minuta na 10000xg. Bistri supernatanti su zatim postavljeni u termostatirani „autosampler” HPLC-a na 10 $^{\circ}$ C i po 20 μ L od svakog uzorka, standarda i kontrole je korišćeno za analizu. Uzorci su injektovani na Thermo Scientific Hypersil C18 GOLD aQ kolonu i eluirani mobilnom fazom (amonijum-acetat i acetonitril u zapreminskom odnosu 96,4:3,6) 10 minuta pri brzini od 500 μ L/min, na temperaturi od 25 $^{\circ}$ C. Zahvaljujući integrativnom preklopnom ventilu, koji je instaliran u maseni spektrometar, samo eluat frakcija 8-oksodG-a stiže do masenog spektrometra, dok se ostatak eluata isporučuje u otpad (0-5,5 minuta eluata ide u otpad, 5,5-7 minuta eluata ide do masenog spektrofotometra, 7-10 minuta eluata ide u otpad). Podaci o kalibraciji i uzorcima su dobijeni tehnikom višestrukog praćenja odabranih jona: $[M+H]^+$ (prekursorski jon m/z 284; proizveden jon m/z 167). Kalibracija je vršena upotrebom standardnih rastvora različitih koncentracija 8-oksodG [c (nmol/L) = 0; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0], pripremljenih u pool-u urina zdravih ispitanika.

3.2.2. Određivanje koncentracije lakih lanaca neurofilamenata (sNfL)

Serumski laki lanci neurofilamenta (sNfL) su određeni, primenom ELISA kvantitativnog sendvič testa (NEFL-BioAssay TM Elisa Kit; US Biological, Salem, United States).

Komponente testa:

- Mikrotitarska ploča 1x96 bazenčića
- Standard 2x1 bočica
- Sample/Standard dilucionni puffer 1x20 ml
- Antitelo obeleženo biotinom (koncentrovano) 1x120 μ L
- Antitelo dilucionni puffer 1x10 ml
- Streptavidin (HRP)(SABC) 1x 120 μ L
- SABC dilucionni puffer 1x 10 ml
- TMB (tetrametilbenzidin) supstrat 1x 10 ml

- Stop reagens 1x 10ml
- Wash puffer, 25X 1x30 ml

Analitičke karakteristike testa:

Opseg detekcije: 15,625-1000 pg/ml

Osetljivost: <9,375 pg/ml

Preciznost: Intra-Assay koeficijent varijacije je < 8% ; Inter-Assay koeficijent varijacije je < 10%

Princip testa:

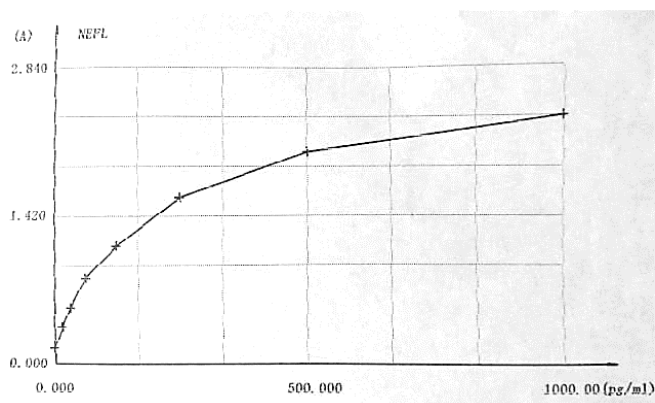
Princip sendvič ELISA testa zasniva se na detekciji antigena upotrebom specifičnih antitela. Zidovi bazenčića na mikrotitarskoj ploči su obloženi antitelima koja su specifična za sNfL iz uzorka, koji se pipetira u svaki bazenčić. Nakon toga, dodaje se antitelo obeleženo biotinom, streptavidin (HRP) i substrat tetrametilbenzidin (TMB), a reakcija se zaustavlja dodatkom sumporne kiseline pri čemu dolazi do promene boje čiji intenzitet se meri na 450nm ± 10nm, a koncentracija sNfL se određuje pomoću kalibracione krive.

Izvođenje analize:

Pre početka izvođenja testa neophodno je pripremiti standardne rastvore odgovarajućih koncentracija [c (pg/ml) = 1000; 500 ; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 0] prikazanih u Tabeli 4. Poslednja epruveta će služiti kao *blank* i sadržaće samo Sample/Standard diluenta. Za izradu kalibracione krive, rekonstituiše se sadržaj u bočici standarda sa 1 ml Sample/Standard diluenta i ostavi da stoji 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim snažno promeša na vortex mešalici. Od tog standarda čija je koncentracija 1000 pg/ml, pripreme se standardni rastvori odgovarajućih koncentracija za kalibracionu krivu (Slika 10.). Uzorci se centrifugiraju 20 minuta na 3000 obrtaja i odvoji se supernatant. Standardni rastvori i uzorci se pipetiraju u odgovarajuće bazenčiće na mikrotitarskoj ploči i inkubiraju. Nakon toga vrši se ispiranje ploče i dodavanje antitela obeleženih biotinom, a zatim se dodaje streptavidin, TMB supstrat i inkubira. Dodatkom supstrata, u bazenčićima koji sadrže sNfL dolazi do promene boje u plavu. U završnoj tački reakcije dodaje se sumporna kiselina i boja se menja iz plave u žutu. Intenzitet boje je izmeren na ELISA čitaču (Elx800 Absorbance Microplate Reader, BioTek), spektrofotometrijski na 450 nm i proporcionalan je koncentraciji sNfL u uzorku. Koncentracija sNfL se određuje poređenjem u odnosu na dobijenu standardnu krivu.

Tabela 4. Priprema standardnih rastvora za pripremu kalibracione krive za merenje sNfL

Koncentracija (pg/ml)	Zapremina standarda (µL)	Zapremina diluenta (µL)
1000	1000 pg (stock)	1000
500	300 od stock	300
250	300 iz bočice 1	300
125	300 iz bočice 2	300
62,5	300 iz bočice 3	300
31,25	300 iz bočice 4	300
15,625	300 iz bočice 5	300
-	-	300



Slika 10. Kalibraciona kriva za određivanje NfL u serumu

3.2.3. Određivanje koncentracije sfingozin-1-fosfata (S1P)

Sfingozin-1-fosfat (S1P) je određen u serumu BioAssay TM Elisa Kit kvantitativnim kompetitivnim testom (S1p-BioAssay TM Elisa Kit; US Biological, Salem, United States).

Komponente testa:

- Mikrotitarska ploča 1x96 bazenčića
- Standard 2x1 bočica
- Sample/Standard dilucioni puffer 1x20 ml
- Antitelo obeleženo biotinom (koncentrovano) 1x60 μ L
- Antitelo dilucioni puffer 1x10 ml
- Streptavidin (HRP) (SABC) 1x 120 μ L
- SABC dilucioni puffer 1x 10 ml
- TMB supstrat (tetrametilbenzidin) 1x 10 ml
- Stop reagens 1x 10ml
- Wash puffer, 25X 1x30 ml

Analitičke karakteristike testa:

Opseg detekcije: 3,125-200 ng/ml

Osetljivost: <1,875 ng/ml

Preciznost: Intra-Assay koeficijent varijacije je < 8% ; Inter-Assay koeficijent varijacije je < 10%

Princip testa:

Princip kompetitivnog ELISA testa se zasniva na takmičenju između antigena iz uzorka (S1P) i antigena koji je vezan za čvrstu fazu mikrotitarske ploče za vezivanje za određenu količinu obeleženog antitela. Antigen (S1P) je vezan za čvrstu fazu mikrotitarske ploče. Standardi i uzorci se dodaju u odgovarajuće bazenčiće na ploči, nakon čega se dodaje antitelo specifično za S1P koje je konjugovano biotinom. Streptavidin konjugovan sa peroksidazom rena se dodaje u svaki bazenčić mikrotitarske ploče i inkubira.

Nakon dodavanja supstrata, tetrametilbenzidina (TMB) samo u onim bazenčićima koji sadrže S1P, antitelo konjugovano biotinom i streptavidin konjugovan enzimom će pokazati promenu boje.

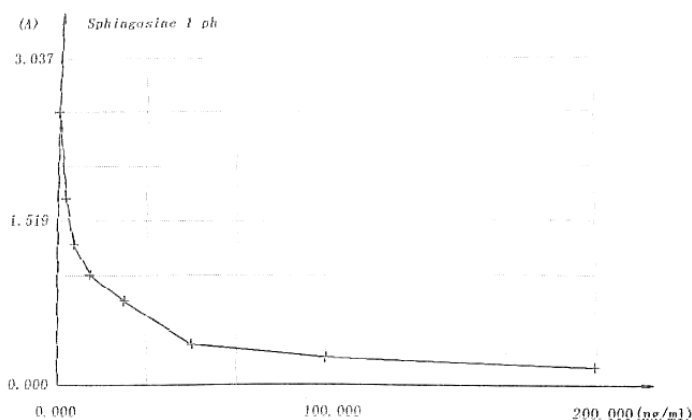
Reakcija enzim-supstrat se završava dodatkom sumporne kiseline i promena boje se meri spektrofotometrijski na $450\text{nm}\pm 10\text{nm}$. Koncentracija S1P u uzorku se određuje iz standardne krive.

Izvođenje analize:

Pre početka izvođenja testa neophodno je pripremiti standardne rastvore odgovarajućih koncentracija (200 ng/ml; 100 ng/ml; 50 ng/ml; 25 ng/ml; 12,5 ng/ml; 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml) prikazanih u Tabeli 5. Poslednja epruveta će služiti kao *blank* i sadržaće samo Sample/Standard diluenta. Za izradu kalibracione krive rekonstituisati sadržaj iz bočice standarda sa 1 ml Sample/Standard diluenta i ostaviti da stoji 10 minuta na sobnoj temperature, a zatim snažno promešati na vortex mešalici. Od tog standarda čija je koncentracija 200 ng/ml, napraviti standardne rastvore odgovarajućih koncentracija za kalibracionu krivu (Slika 11.). Uzorci se centrifugiraju 20 minuta na 3000 obrtaja i odvoji supernatant. Standardni rastvori i uzorci se pipetiraju u odgovarajuće bazenčice na ploči. Nakon toga se vrši dodavanje antitela obeleženih biotinom. Nakon inkubacije i ispiranja ploče (da bi se uklonila sva nevezana antitela), u sve bazenčice se dodaje streptavidin, a zatim TMB supstrat i ponovo inkubira. Dodatkom supstrata u onim bazenčicama koji sadrže najveću koncentraciju S1P dolazi do promene boje u plavu. U završnoj tački dodaje se sumporna kiselina i boja se menja iz plave u žutu. Intenzitet boje je izmeren na ELISA čitaču (ELx800 Absorbance Microplate Reader, BioTek), spektrofotometrijski na 450 nm i obrnuto je proporcionalan koncentraciji S1P u uzorku. Koncentracija S1P se određuje poređenjem apsorbance sa kalibracionom krivom.

Tabela 5. Priprema standardnih rastvora za kalibracionu krivu S1P

Koncentracija (ng/ml)	Zapremina standarda (μL)	Zapremina diluenta (μL)
200	200 ng (stock)	1000
100	300 od stock	300
50	300 iz bočice 1	300
25	300 iz bočice 2	300
12,5	300 iz bočice 3	300
6,25	300 iz bočice 4	300
3,125	300 iz bočice 5	300
-	-	300



Slika 11. Kalibraciona kriva za određivanje S1P u serumu

3.2.4. Određivanje koncentracije hinolinske kiseline (QA)

Hinolinska kiselina (QA) se određuje u serumu, kvantitativno, kompetitivnim ELISA testom (Quinolinic Acid Elisa Kit; Immusmol SAS, Bordeaux, France).

Komponente testa:

- Reakciona ploča 1x96
- Adhezivna folija
- Standard 6x1 bočica
- ELISA Wash Buffer Concentrate 1x20ml
- Enzimski konjugat (kozji anti-zečiji imunoglobulini konjugovani peroksidazom) 1x12ml
- Supstrat (Hromogeni supstrat tetrametilbenzidin, substratni pufer i vodonik peroksid) 1x12ml
- Stop reagens (0.25 M sumporna kiselina) 1x 10ml
- Mikrotitarska ploča 1x96 bazenčića
- Koncentrat antiseruma hinolinske kiseline (zečije antitelo protiv hinolinske kiseline) 1x4ml
- Diluent antiseruma hinolinske kiseline 1x4ml
- Reakcioni diluent
- Acilacioni reagens
- Acilacioni pufer (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (MES) 2x30ml

Analitičke karakteristike testa:

Opseg detekcije: 25 – 2 000 ng/ml

Osetljivost: 6 ng/mL

Preciznost: Intra-Assay koeficijent varijacije je < 13,6%; Inter-Assay koeficijent varijacije je <17,2%

Princip testa:

Princip ELISA testa uključuje kompeticiju između antigena iz uzorka (QA) i antigena koji je vezan za čvrstu fazu mikrotitarske ploče da se vežu za ograničenu količinu obeleženog antitela. Mikrotitarska ploča je obložena antigenima hinolinske kiseline koja je mesto vezivanja antitela. Kada je sistem u ravnoteži, slobodan antigen i slobodni kompleksi antigen-antiserum se uklanjaju ispiranjem. Primarno antitelo, zečje antihinolinska kiselina antitelo se detektuje pomoću anti-zečjeg IgG konjugovanog peroksidazom, koristeći TMB kao supstrat. Reakcija se prati na 450 nm. Kvantifikacija uzoraka se postiže poređenjem njihove apsorbance sa kalibracionom krivom.

Izvođenje analize:

Pre početka izvođenja testa neophodno je standardne rastvore koji su spremni za upotrebu temperirati do sobne temperature. Zatim, pripremiti pufer za ispiranje, rastvaranjem bočice od 20 ml dejonizovanom vodom do ukupne zapremine 1000 ml. Pripremiti Acilacioni reagens (u cilju građenja stabilnog enolata) rekonstituisanjem 1 bočice sa 12 ml acilacionog pufera. Antiserum hinolinske kiseline se priprema u odnosu 1:1 neposredno pre upotrebe. Uzorke centrifugirati 20 minuta na približno 3000 obrtaja i odvojiti supernatant. Hemolizirane i lipemične uzorke ne bi trebalo uzimati u rad. Standardni rastvori i uzorci se dodaju u odgovarajuće bazenčiće reakcione ploče. Zatim se doda reakcioni diluent i kratko promeša na šejkeru, doda se acilacioni reagens i nakon kratkog mešanja pokrije adhezivnom folijom, a zatim inkubira 2h na 37°C. Nakon završene inkubacije određena zapremina analita se prenosi u bazenčiće mikrotitarske ploče. Dodaje se zečje antitelo protiv

hinolinske kiseline i nakon mešanja ponovo pokrije adhezivnom folijom i inkubira 15-20h (preko noći) na 2-8 °C. Nakon toga, ukloni se sav sadržaj iz bazenčića, ispere 4 puta puferom i prosuši okretanjem ploče na apsorptivni materijal. Zatim se pipetira enzimski konjugat (anti zečje IgG konjugovano peroksidazom), inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi i na šejkeru (500 rpm). Ukloniti sadržaj iz bazenčića, isprati ploču 4 puta puferom i posušiti bazenčiće inverzijom ploče o apsorptivni materijal. Dodati substrat i inkubirati 20-30 minuta na sobnoj temperaturi i promešati na šejkeru. Zatim se doda Stop reagens (sumporna kiselina) i izmeri apsorbancija na 450 nm, koja je obrnuto proorcionalna koncentraciji hinolinske kiseline.

3.2.5. Određivanje koncentracije kinureninske kiseline (KA)

Kinureninska kiselina (KA) se određuje u serumu, kvantitativno, kompetitivnim ELISA testom (Kinurenic Acid Elisa Kit; Immusmol SAS, Bordeaux, France).

Komponente testa:

- Ekstrakciona ploča, 1x96
- Adhezivna folija
- Standard 6x1 bočica
- ELISA pufer koncentrat 1x20ml
- Enzimski konjugat (kozji anti-zečiji imunoglobulini konjugovani peroksidazom) 1x12ml
- Substrat (tetrametilbenzidine, supstratni pufer i vodonik peroksid) 1x12ml
- Stop reagens (0.25 M sumporna kiselina) 1x 10ml
- Mikrotitarska ploča 1x96 bazenčića
- Koncentrat antiseruma kinureninske kiseline (zečje antitelo protiv kinureninske kiseline) 1x4ml
- Diluent antiseruma kinureninske kiseline 1x4ml
- Ekstrakcioni reagens (pufer kisele pH vrednosti)
- Acilacioni reagens-liofilizat
- Acilacioni pufer 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 2x30ml

Analitičke karakteristike testa:

Opseg detekcije: 1,4– 74 ng/ml

Osetljivost: <0,53 ng/mL

Preciznost: Intra-Assay koeficijent varijacije je < 7%; Inter-Assay koeficijent varijacije je <10%

Princip testa:

Princip kompetitivnog ELISA testa se zasniva na kompeticiji između antigena iz uzorka (KA) i antigena koji je vezan za čvrstu fazu mikrotitarske ploče za vezivanje za određenu količinu obeleženog antitela. Kada je sistem u ravnoteži, slobodan antigen i slobodni kompleksi antigen-antiserum se uklanjaju ispiranjem. Primarno antitelo, zečje antikinureninska kiselina antitelo se detektuje pomoću anti-zečjeg IgG konjugovanog peroksidazom koristeći TMB kao supstrat. Reakcija se prati na 450nm. Kvantifikacija nepoznatih uzoraka se postiže poređenjem njihove apsorbance sa kalibracionom krivom.

Izvođenje analize:

Pre početka izvođenja testa neophodno je standardne rastvore, već spremne za upotrebu temperirati do sobne temperature. Zatim, pripremiti pufer za ispiranje rastvaranjem bočice od 20 ml dejonizovanom vodom do ukupne zapremine 1000 ml. Pripremiti acilacioni reagens (u cilju građenja stabilnog enolata) rekonstituisanjem 1 bočice sa 15 ml acilacionog pufera. Antiserum kinureninske kiseline se priprema u odnosu 1:1 neposredno pre upotrebe.

Uzorke centrifugirati 20 minuta na 3000 obrtaja i odvojiti supernatant. Hemolizirane i lipemične uzorke ne bi trebalo uzimati u rad. Standardni rastvori i uzorci se dodaju u odgovarajuće bazenčiće ekstrakcione ploče. Zatim se dodaje ekstrakcioni reagens, prekrije se adhezivnom folijom i inkubira 1h na šejkeru na sobnoj temperaturi. Potom se ukloni sav sadržaj iz bazenčića, ispere puferom i prosuši okretanjem ploče na apsorptivni materijal. Doda se acilacioni reagens i kratko promeša. Pokrije se adhezivnom folijom i inkubira 90 minuta na 37 °C. Nakon završene inkubacije određena zapremina analita se prenosi u bazenčiće mikrotitarske ploče. Dodaje se antiserum kinureninske kiseline (zečje antikinureniska kiselina antitelo) i nakon kratkog mešanja pokrije adhezivnom folijom i inkubira 15-20h (preko noći) na 2-8 °C. Potom se ukloni sav sadržaj iz bazenčića, ispere 4 puta elisa puferom i posuše bazenčići, okretanjem ploče na apsorptivni materijal. Pipetirati enzimski konjugat (anti zečje IgG konjugovano peroksidazom), inkubirati 30 minuta na sobnoj temperaturi i na šejkeru (500rpm). Ukloniti sadržaj iz bazenčića, isprati ploču 4 puta elisa puferom i posušiti bazenčiće inverzijom ploče o apsorptivni materijal. Dodati substrat (TMB) i inkubirati 20-30 minuta na sobnoj temperaturi i na šejkeru. Zatim dodati Stop reagens (sumpornu kiselinu) i apsorbancija se čita na ELISA čitaču na 450 nm. Apsorbancija je obrnuto proporcionalna koncentraciji kinureninske kiseline.

3.3. Analiza genetičke varijante 8-oksoguanin DNK glikozilaze 1 (OGG1 rs1052133)

3.3.1. Ekstrakcija DNK, merenje koncentracije i procena kvaliteta ekstrahovane DNK

Genetička varijanta OGG1 rs1052133 je ispitana u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke Vinča, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Jedarna DNK je ekstrahovana iz krvi primenom testa za izolaciju, prema protokolu proizvođača (Gentra Puregene Kit, Qiagen). Koncentracija DNK u uzorku je određena merenjem apsorbanci na 260 nm (maksimum apsorbance za nukleinske kiseline), dok su za analizu čistoća uzorci mereni na 280 nm (maksimum apsorbance za proteine, peptide i aminokiseline) i 230 nm (maksimum apsorbance za organska jedinjenja poput fenola, etanola, glikogena, natrijum-dodecil-sulfata i sličnih jedinjenja sa hidroksilnom grupom), upotrebom aparata NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, SAD). Odnos apsorbancija na ovim talasnim dužinama (A_{260}/A_{280}) je korišćen kao mera čistoće nukleinskih kiselina i proteina ekstrakcije, pa je tako odnos od približno 1,8 prihvaćen kao „čist“ za DNK, a odnos od približno 2.0 „čist“ za RNK (152). Uzorak ekstrahovane DNK sa odnosom apsorbancija A_{260}/A_{280} od 1.7 do 2.0, a A_{260}/A_{230} većim od prethodnog odnosa (A_{260}/A_{280}), ali ispod 2.2 se smatraju izolatima visoke čistoće DNK. Korišćeni su uzorci koji imaju odnos preko 1.7.

3.3.2. Genotipizacija OGG1 rs1052133

Genotipizacija je vršena korišćenjem verzije metode umnožavanja ciljanog fragmenata DNK lančanom reakcijom DNK polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), koja primenjuje alelsku diskriminaciju baziranu na TaqMan[®] tehnologiji, na uređaju 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD). TaqMan[®] esej za alelsku diskriminaciju sadrži par prajmera (jedan komplementaran genomskoj sekvenci uzvodno od lokusa varijante od interesa, a drugi nizvodnoj genomskoj sekvenci) i par fluorescentno obeleženih TaqMan[®] proba. Krajevi TaqMan[®] proba su konjugovani sa fluorescentnim molekulima, 5' kraj sadrži reporterski fluorohrom 6-FAM (6-carboxyfluorescein) dok 3' kraj je konjugovan sa fluorohromom za gašenje NFQ (eng. *non-fluorescently quenched*). Pojedinačne TaqMan[®] probe su komplementarne alelima varijante od interesa i imaju na sebi specifičnu reportersku fluoroboju. Sve dok su ova dva fluorohroma u neposrednoj blizini jedan drugog (kada je TaqMan sonda netaknuta), fluorescencija koju emituje reporterski fluorohrom se apsorbuje od strane fluorohroma za gašenje. Nakon amplifikacije ciljne sekvence, TaqMan sonda se razgrađuje od strane Taq polimeraze, što dovodi do razdvajanja reportera i fluorohroma za gašenje. Kao rezultat, signal fluorescencije reporterskog fluorohroma će postati detektovan i dalje će se povećavati tokom uzastopnih PCR ciklusa zbog akumulacije slobodnih reporterskih fluorohroma (153). Tokom PCR reakcije oslobađa se boja i analizom intenziteta fluorescencije specifičnih talasnih dužina (koje odgovaraju pojedinačnim reporterskim fluorobojama) u reakcionim smešama pre i posle PCR amplifikacije se određuju genotipovi. Korišćen je TaqMan[®] esej za alelsku diskriminaciju ispitane varijante, TaqMan[®] esej ID: C_3095552_1_ (Applied Biosystems, SAD). Primenjeni su uslovi PCR reakcije koje je preporučio proizvođač.

3.4. Statistička analiza

Raspodela kontinuiranih promenljivih je ispitana primenom Kolmogorov-Smirnovog testa. Pošto se radi o ispunjenosti uslova za normalnost raspodele parametri su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. U tom slučaju su primenjeni parametarski statistički testovi poređenja srednjih vrednosti između dve grupe (Studentov-t-test), jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA), kombinovana analiza varijanse (Sidak post hoc test), t-test parova (paired t-test), analiza kovarijanse (ANCOVA), testiranje ponovljenih merenja (Repeated Measures analysis), Mann-Whitney test. Kategorijske promenljive su prikazane kao apsolutne i relativne frekvence. Za njihovu analizu je upotrebljen kaj kvadrat (χ^2) test.

Odstupanje distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže ispitano je χ^2 testom za kontrolnu grupu i grupu MS-pacijenata, a Fisherov egzaktni test je primenjen u slučaju kada je broj bio <5 . Za ispitivanje razlika kategorijskih promenljivih između kontrolne grupe i grupe MS-pacijenata primenjen je χ^2 -test za 2x2 tabele kontigencije i izračunat je Odds Ratio (OR) i 95% interval pouzdanosti.

Postojanje veze između promenljivih je analizirano upotrebom parametarske Pearsonove korelacione analize ili neparametarske Spearmanove korelacione analize. Za otkrivanje nezavisnih prediktora MS korišćena je binarna logistička regresija. Statistička značajnost je usvojena za vrednost verovatnoće $p < 0,05$. Za analizu je korišćen statistički program SPSS (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

4. REZULTATI

U ovoj studiji je ispitana povezanost oksidativnog stresa (OS) i kinureninskog puta metabolizma triptofana (KP) u nastanku i razvoju multiple skleroze (MS) u populaciji Srbije, kao i značaj biomarkera serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL) i sfingozin-1-fosfata (S1P) u dijagnostici i praćenju MS. Takođe, ispitan je uticaj faktora spoljašnje sredine, povezanost genetičke varijante gena enzima reparacije 8-oksoguanin DNK glikozilaza 1 (OGG1) rs1052133 sa pojavom MS kao i efekat DMT terapije na nivo biomarkera OS, metabolite KP, sNfL i S1P.

4.1. Povezanost oksidativnog stresa i multiple skleroze

4.1.1. Deskriptivna statistička analiza biomarkera oksidativnog stresa kod svih ispitanika i u odnosu na pol

Studija je obuhvatila ukupno 175 pacijenata obolelih od MS, 76 muškaraca i 99 žena, starosne dobi 33 ± 9 godina. Kontrolnu grupu je činilo 254 zdrava ispitanika, 81 muškarac i 173 žene, starosne dobi 37 ± 9 godina.

Za procenu oksidativnog stresa (OS) kod zdravih ispitanika (kontrolna grupa) i pacijenata sa MS (MS-pacijenti) u serumu su izmerene koncentracije: ukupnog oksidativnog statusa (TOS) i ukupnog antioksidativnog statusa (TAS). Oksidativni indeks (OSI) je dobijen računski, kao odnos ukupnog oksidativnog statusa i ukupnog antioksidativnog statusa (TOS/TAS). U pojedinačnom uzorku urina MS-pacijenata i kontrolnih ispitanika određena je koncentracija 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oksodG), izražena na nivo kreatinina u urinu (8-oksodG/kreatinin). Za svakog ispitanika su prikupljeni podaci o pušačkom statusu, na osnovu čega su podeljeni u dve grupe (pušači, nepušači) ili četiri grupe (aktivni pušači, bivši i pasivni pušači i nepušači). Prema izloženosti sunčevom zračenju, ispitanici su podeljeni u dve grupe (oni koji se izlažu suncu i one koji se ne izlažu suncu).

Rezultati deskriptivne analize kod zdravih ispitanika i MS-pacijenata prikazani su u Tabeli 6. Poređenjem kontrolne grupe i pacijenata, uočeno je značajno više muškaraca u grupi pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike (43% i 32%; $p=0,015$) (Tabela 6.). U kontrolnoj grupi, muškarci su imali značajno više vrednosti indeksa telesne mase u odnosu na žene ($p<0,001$). U grupi muškaraca, MS-pacijenti su imali niži indeks telesne mase od zdravih muškaraca ($p<0,001$). Pacijenti su bili mlađi kada im je dijagnostikovana bolest u poređenju sa zdravim ispitanicima (33 i 37 godina; $p<0,001$). Ista razlika je bila kod muškaraca (33 i 37 godina; $p<0,001$) i žena (34 i 37 godina; $p=0,016$).

Viši nivo biomarkera OS je dobijen kod MS-pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom (TOS: $p=0,018$; OSI: $p=0,023$; 8-oksodG/kreatinin: $p<0,001$). U grupi MS-pacijenata primećeno je da žene imaju niži nivo biomarkera TAS ($p<0,001$) i značajno viši TOS ($p=0,010$), OSI ($p=0,006$) i 8-oksodG/kreatinin ($p<0,001$) u odnosu na muškarce. U grupi zdravih ispitanika uočeno je da su muškarci imali više nivoa TAS ($p<0,001$) i 8-oksodG/kreatinin ($p=0,030$), a niži indeks OSI ($p<0,001$) u poređenju sa ženama. Takođe, MS-muškarci su imali niži nivo TAS ($p=0,006$) u odnosu

na zdrave ispitanike, dok su MS-žene imale viši nivo TOS ($p=0,002$), 8-oksodG/kreatinin ($p<0,001$) i OSI ($p<0,001$) u odnosu na zdrave ispitanice.

Tabela 6. Demografske karakteristike i biomarkeri oksidativnog stresa kod svih zdravih ispitanika i MS-pacijenata i podjeljenih prema polu

Karakteristika/ biomarker	Svi		Muškarci		Žene	
	Kontrola (N=254)	MS (N=175)	Kontrola (N=81)	MS (N=76)	Kontrola (N=173)	MS (N=99)
Pol (%)	-	-	32	43	68	57
Starost* (godine)	36,90± 8,78 ^a	33,43± 9,10	37,41± 7,82 ^b	33,22± 8,05	36,62± 9,21 ^c	33,60± 9,93
Trajanje MS (godine)	-	7,56± 5,60	-	7,81± 4,72	-	7,41± 8,72
Izloženost suncu, n (%)	102 (40,2) ^a	123 (70,3)	48 (59,3) ^e	54 (71,1)	54 (31,2) ^c	69 (69,7)
Nepušači, n (%)	140 (55,1)	77 (44,0)	48 (59,2)	34 (44,8)	92 (53,2)	43 (43,4)
Bivši pušači, n (%)	24 (9,4) ^a	4 (2,2)	6 (7,4)	1 (1,3)	18 (10,4) ^c	3 (3,1)
Pasivni pušači, n (%)	6 (2,4) ^a	40 (22,8)	2 (2,5) ^b	16 (21,0)	4 (2,3) ^c	24 (24,2)
Aktivni pušači, n (%)	84 (33,1)	56 (32,0)	25 (30,9)	25 (32,9)	59 (34,1)	29 (29,3)
BMI (kg/m ²)	24,4± 3,6	24,7± 3,9	26,7± 2,5 ^{b,e}	25,8± 3,2 ^d	23,7± 3,6	23,8± 4,3
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	2,02± 0,21	2,00± 0,20	2,18± 0,18 ^{b,e}	2,09± 0,21 ^d	1,94± 0,18	1,93± 0,17
TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv/L)	8,67± 1,85 ^a	9,02± 1,76	8,38± 1,99	8,55± 1,67 ^d	8,81± 1,76 ^c	9,40± 1,76
OSI (arbitrarne jedinice)	0,43± 0,10 ^a	0,45± 0,10	0,39± 0,10 ^e	0,41± 0,09 ^d	0,45± 0,09 ^c	0,49± 0,10
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	1,18± 0,56 ^a	1,58± 1,09	1,31± 0,49 ^e	1,44± 0,72	1,12± 0,58 ^c	1,70± 1,31

Kvantitativne promjenjive su prikazane kao srednja vrednost ± Sd; Starost* pacijenata kada je bolest dijagnostikovana; BMI: indeks telesne mase; TOS: ukupni oksidativni status; TAS: ukupni antioksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; ^a razlike između kontrole i MS u celoj populaciji; ^b razlike između kontrole i MS u populaciji muškaraca; ^c razlike između kontrole i MS u populaciji žena; ^d razlike između muškaraca i žena u MS populaciji; ^e razlike između muškaraca i žena u kontrolnoj populaciji.

4.1.2. Udruženi uticaj pola i prisustva/odsustva MS na biomarkere oksidativnog stresa

Primenom testa dvo-faktorska analiza varijanse (ANOVA), analiziran je uticaj pola i zdravstvenog stanja na biomarkere OS, a rezultati analize su prikazani u Tabeli 7. i Slici 12. Uočeno je da su na nivo biomarkera TAS uticali udruženo pol i prisustvo bolesti, ali je razlika bila na granici značajnosti ($p=0,059$; eta kvadrat= 0,009). Dodatnom analizom pomoću Sidak post hoc testa pokazano je da su muškarci u kontrolnoj grupi imali značajno viši nivo biomarkera TAS u odnosu na pacijente ($p=0,003$; eta kvadrat=0,021) (Tabela 7. i Slika 12A.).

Primenom dvo-faktorske ANOVE nije uočen udruženi uticaj pola i bolesti na nivo biomarkera TOS ($p=0,256$, eta kvadrat=0,003), ali je primenom Sidak testa pokazano da žene u kontrolnoj grupi imaju niži nivo TOS u odnosu na pacijente ($p=0,011$, eta kvadrat=0,015) (Tabela 7. i Slika 12B.).

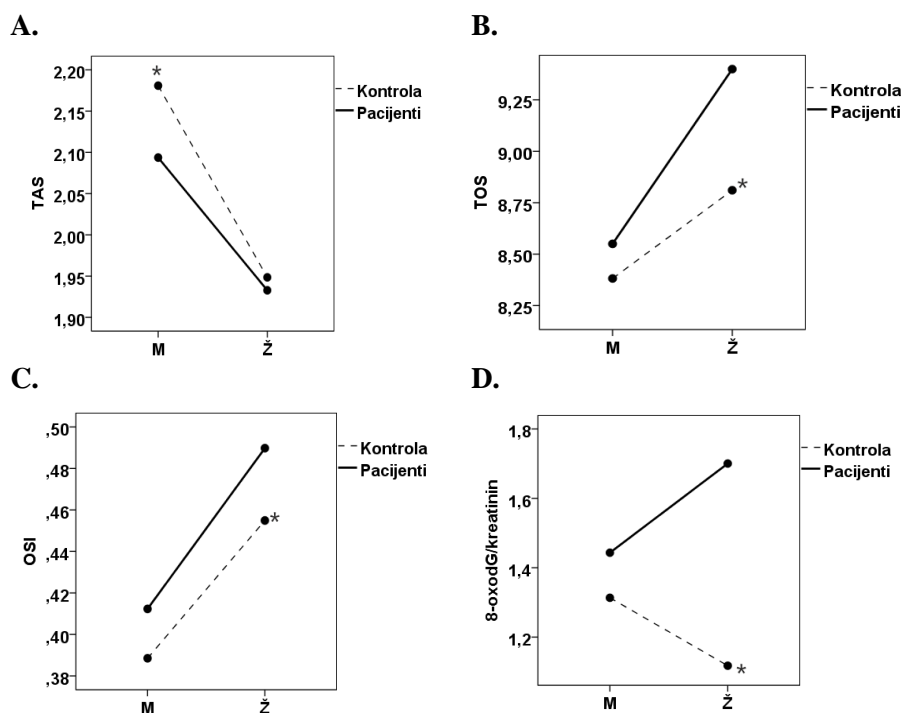
Uticaj udruženih faktora pola i bolesti nije uočen kod indeksa OSI ($p=0,583$, eta kvadrat=0,001), ali je primenom Sidak testa pokazano da zdrave žene imaju niži OSI u odnosu na pacijente ($p=0,006$, eta kvadrat=0,018) (Tabela 7., Slika 12C.).

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA, uočeno je da su udruženi faktori pol i bolest imali uticaj na nivo 8-oksodG/kreatinin ($p=0,021$; eta kvadrat=0,017) (Tabela 7.). Dodatnom primenom Sidak testa pokazano je da zdrave žene imaju niži nivo biomarkera u odnosu na pacijente ($p<0,001$, eta kvadrat=0,068) (Tabela 7., Slika 12D.).

Tabela 7. Ispitivanje uticaja pola i prisustva/odsustva MS na biomarkere oksidativnog stresa

Biomarker	Udruženi uticaj faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	stanje : pol	0,059	0,009
	Post hoc test po Sidak-u		
	muškarci: stanje	0,003	0,021
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	stanje : pol	0,256	0,003
	Post hoc test po Sidak-u		
	žene: stanje	0,011	0,015
OSI (arbitrarne jedinice)	stanje : pol	0,583	0,001
	Post hoc test po Sidak-u		
	žene: stanje	0,006	0,015
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	stanje : pol	0,021	0,017
	Post hoc test po Sidak-u		
	žene : stanje	<0,001	0,068

MS: multipla skleroza; TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; stanje (prisustvo/odsustvo MS).



Slika 12. Procenjene srednje vrednosti biomarkera oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i kod MS-pacijenata prema polu; A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status (μmol H₂O₂ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol); M: muškarci; Ž: žene; * razlika u odnosu na pacijente.

4.1.3. Uticaj pušačkog statusa na biomarkere oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa multiplom sklerozom

4.1.3.1. Analiza učestalosti pušačkog statusa na pojavu MS

Štetno delovanje supstanci iz duvanskog dima može doprineti nastanku OS. Procenjujući izloženost duvanskom dimu, uočeno je da je pasivnih pušača bilo značajno više u grupi pacijenata nego u kontrolnoj grupi ($p < 0,001$), a ova razlika je prisutna i kod polova (kod muškaraca, $p = 0,0002$ i žena, $p < 0,001$) (Tabela 8.). Prema podacima dobijenim za Odds ratio koji su prikazani u Tabeli 8., kod muškaraca je pasivno pušenje povezano sa 10 puta većim rizikom, a kod žena sa 13 puta većim rizikom od razvoja MS. U grupi pacijenata je bilo značajno manje bivših pušača nego u kontrolnoj grupi ($p = 0,003$), a ista razlika je dobijena i kod žena ($p < 0,001$) (Tabela 8.).

U studiji je ispitan uticaj pušačkog statusa na nivo biomarkera OS (procenjen pomoću TAS, TOS, OSI i 8-oksodG/kreatinin) kod kontrolnih ispitanika i MS-pacijenata. Primenom student t-testa ispitana je razlika biomarkera OS između kontrolne grupe i MS-pacijenata, a rezultati su prikazani u Tabeli 9. Pacijenti-pušači su imali nešto viši nivo biomarkera TOS u odnosu na kontrolne ispitanike, ali je verovatnoća bila na granici značajnosti ($p = 0,065$). Osim toga, pacijenti-pušači su imali značajno viši indeks OSI i 8-oksodG/kreatinin ($p = 0,048$; $p < 0,001$) od zdravih ispitanika (Tabela 9.). Pacijenti-nepušači su imali značajno viši indeks 8-oksodG/kreatinin ($p = 0,008$) u odnosu na zdrave ispitanike.

Tabela 8. Pušački status kod svih zdravih ispitanika i MS-pacijenata i podjeljenih prema polu

Pušački status	Svi			
	Kontrola (N=254)	MS (N=175)	P	Odds ratio (95% CI)
Nepušači, n (%)	140 (55,1)	77 (44,0)	ns	-
Bivši pušači, n (%)	24 (9,4) ^a	4 (2,2)	0,003	0,22 (0,08-0,65)
Pasivni pušači, n (%)	6 (2,4) ^a	40 (22,8)	<0,001	12,25 (5,06-29,62)
Aktivni pušači, n (%)	84 (33,1)	56 (32,0)	ns	-
Muškarci				
Pušački status	Kontrola (N=81; 32%)	MS (N=76; 43%)	P	Odds ratio 95% CI
Nepušači, n (%)	48 (59,2)	34 (44,8)	ns	-
Bivši pušači, n (%)	6 (7,4)	1 (1,3)	ns	-
Pasivni pušači, n (%)	2 (2,5) ^b	16 (21,0)	<0,001	10,53 (2,33-47,58)
Aktivni pušači, n (%)	25 (30,9)	25 (32,9)	ns	-
Žene				
Pušački status	Kontrola (N=173; 68%)	MS (N=99; 57%)	P	Odds ratio 95% CI
Nepušači, n (%)	92 (53,2)	43 (43,4)	ns	-
Bivši pušači, n (%)	18 (10,4) ^c	3 (3,1)	<0,001	0,29 (0,09-0,96)
Pasivni pušači, n (%)	4 (2,3) ^c	24 (24,2)	<0,001	13,52 (4,53-40,33)
Aktivni pušači, n (%)	59 (34,1)	29 (29,3)	ns	-

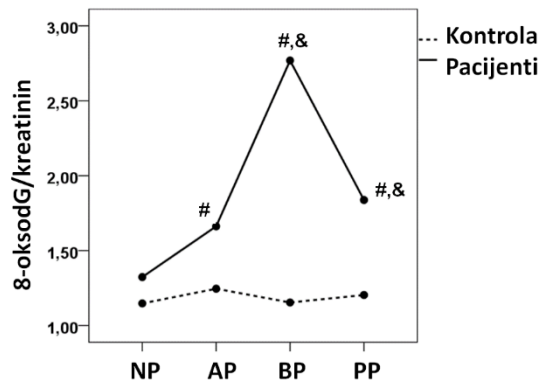
^a razlike između kontrole i MS u celoj populaciji; ^b razlike između kontrole i MS u populaciji muškaraca; ^c razlike između kontrole i MS u populaciji žena; ns-nije statistički značajno.

Tabela 9. Uticaj pušačkog statusa na biomarkere oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata

Biomarker	Kontrolna grupa		MS-pacijenti	
	Nepušači (N=170)	Pušači (N=84)	Nepušači (N=148)	Pušači (N=27)
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	1,99±0,21	2,04±0,21	1,98±0,19	2,01±0,21
TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv/L)	8,72±1,85	8,65±1,85	8,94±1,73	9,06±1,79
OSI (arbitrarne jedinice)	0,44±0,10	0,43±0,10	0,46±0,11	0,45±0,10 ^b
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	1,24±0,49	1,15±0,59	1,66±0,99 ^a	1,55±1,13 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost±Sd; TOS: ukupni oksidativni status; TAS: ukupni antioksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; ^a razlike između kontrole i pacijenata u grupi nepušača; ^b razlike između kontrole i pacijenata u grupi pušača; statistička značajnost: p<0,05.

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA analiziran je uticaj pušačkog statusa (nepušači, bivši pušači, pasivni pušači, aktivni pušači) i prisustva bolesti na nivo 8-oksodG/kreatinina. Rezultat je prikazan na Slici 13.



Slika 13. Procenjena granična vrednost 8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)

NP: nepušač; AP: aktivni pušač; BP: bivši pušač; PP: pasivni pušač; # razlika u odnosu na kontrolnu grupu; & razlika u odnosu na nepušače.

Uočen je značajan uticaj pušačkog statusa i prisustva MS na nivo 8-oksodG/kreatinina ($p=0,025$, eta kvadrat= $0,030$). Daljom analizom i primenom Sidak testa pokazano je da su bivši pušači, pasivni pušači i aktivni pušači imali viši nivo 8-oksodG/kreatinin u grupi MS-pacijenata nego u kontrolnoj grupi (bivši pušači: $p=0,002$; pasivni pušači: $p=0,050$; aktivni pušači: $p=0,012$). Osim toga, uočeno je da su u grupi MS-pacijenata bivši pušači i pasivni pušači imali viši nivo 8-oksodG/kreatinin u odnosu na nepušače (bivši pušači: $p=0,017$; pasivni pušači: $p<0,001$).

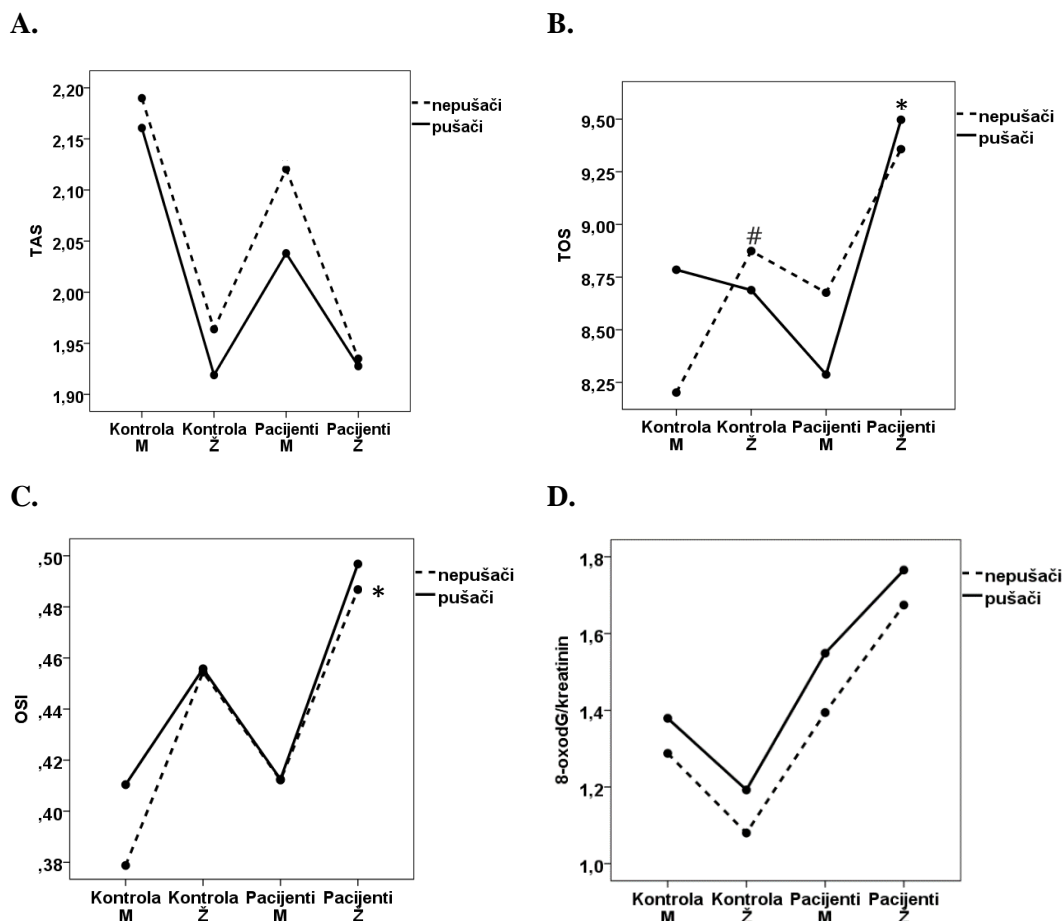
4.1.3.2. Udruženi uticaj pola, pušačkog statusa i prisustva/odsustva MS na biomarkere oksidativnog stresa

Primenom testa tro-faktorska ANOVA, analizirani su uticaji pola, pušačkog statusa i zdravstvenog stanja (prisustvo/odsustvo MS) na nivo biomarkera OS u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata, a rezultati su prikazani u Tabeli 10. i Slici 14. Prema pušačkom statusu, pacijenti su podeljeni na pušače i nepušače. Udružen uticaj pola, zdravstvenog stanja i pušačkog statusa nije imao značaj na nivo biomarkera TAS ($p=0,262$, eta kvadrat= $0,003$) (Tabela 10.). Iako udružen uticaj pola, bolesti i pušačkih navika nije imao značaj na nivo biomarkera TOS ($p=0,104$, eta kvadrat= $0,006$), Sidak analizom je uočeno da su u grupi zdravih ispitanika nepušača, žene imale viši nivo biomarkera TOS u odnosu na muškarce ($p=0,022$, eta kvadrat= $0,013$). Osim toga, među ženama-pušačima, pacijentkinje su imale viši nivo biomarkera TOS u odnosu na zdrave žene, ($p=0,050$, eta kvadrat= $0,009$) (Tabela 10., Slika 14B.). Takođe, udružen uticaj pola, bolesti i pušačkog statusa nije imao značaj na indeks OSI ($p=0,358$, eta kvadrat= $0,002$), ali je Sidak testom zapaženo da su MS-žene-nepušači imale viši indeks OSI od zdravih žena-nepušača ($p=0,035$, eta kvadrat= $0,011$) (Tabela 10., Slika 14C.). Na nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin udružen uticaj pola, prisustva bolesti i pušačkog statusa nije imao statistički značaj ($p=0,844$; eta kvadrat= 0).

Tabela 10. Ispitivanje udruženog uticaja pola, prisustva/odsustva MS i pušačkog statusa na biomarkere oksidativnog stresa

Biomarker	Udruženi uticaj faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	pol : stanje: pušenje	0,262	0,003
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	pol : stanje: pušenje	0,104	0,006
	Post hoc test po Sidak-u		
	kontrola i nepušači: pol	0,022	0,013
	žene i pušači: stanje	0,050	0,009
OSI (arbitrarne jedinice)	pol : stanje : pušenje	0,358	0,002
	Post hoc test po Sidak-u		
	žene i nepušači: stanje	0,035	0,011
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	pol : stanje: pušenje	0,844	0

MS: multipla skleroza; TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; stanje (prisustvo/odsustvo MS).



Slika 14. Procenjene srednje vrednosti parametara oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i kod MS-pacijenata prema polu i pušačkom statusu; A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS-ukupni oksidativni status ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L); C. OSI-oksidativni indeks; D. 8-oksodG/ kreatinin:8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (nmol/mmol);# razlika u odnosu na muškarce; * razlika u odnosu na kontrolnu grupu

4.1.3.3. Udružen uticaj pola, progresije bolesti i pušačkog statusa na biomarkere oksidativnog stresa u grupi pacijenata sa multiplom sklerozom

Primenom testa tro-faktorska ANOVA analiziran je uticaj progresije bolesti (MSSS<3,4; MSSS 3,4-6,7; MSSS>6,7), pola i pušačkog statusa (pušači/nepušači) na nivo biomarkera oksidativnog stresa, u grupi pacijenata obolelih od MS (Tabela 11., Slika 15.).

Uočeno je da udružen uticaj pola, progresije bolesti i pušačkog statusa nema uticaj na nivo biomarkera TAS ($p=0,189$, eta kvadrat=0,026). Daljom analizom i primenom Sidak testa pokazano je da su u grupi muškaraca sa teškim oblikom bolesti (MSSS>6,7), pušači imali niži nivo biomarkera TAS u odnosu na nepušače ($p=0,020$, eta kvadrat=0,041). U grupi nepušača, sa lakšim oblikom bolesti (MSSS<3,4) i sa teškim oblikom bolesti (MSSS>6,7), žene su imale niži nivo TAS u odnosu na muškarce (MSSS<3,4: $p=0,005$, eta kvadrat=0,059; MSSS>6,7: $p=0,003$, eta kvadrat=0,069). U grupi pušača sa lakšim oblikom bolesti (MSSS<3,4), žene su takođe imale niži nivo TAS u odnosu na muškarce ($p=0,051$, eta kvadrat=0,004) (Tabela 11., Slika 15A.).

Testom tro-faktorska ANOVA utvrđeno je da udruženi faktori pol, pušenje i progresija bolesti imaju uticaj na nivo biomarkera TOS ($p=0,025$, eta kvadrat=0,056). Analizom pomoću Sidak testa pokazano je da su u grupi muškaraca sa teškim oblikom bolesti (MSSS>6,7), nepušači imali veći nivo biomarkera TOS u odnosu na pušače ($p=0,029$, eta kvadrat=0,037). Među nepušačima sa srednje teškim oblikom bolesti (MSSS 3,4-6,7), muškarci su imali niži nivo biomarkera TOS u odnosu na žene ($p=0,007$, eta kvadrat=0,055). U grupi sa teškim oblikom bolesti (MSSS>6,7), a koji su bili pušači, muškarci su imali niži nivo biomarkera TOS u odnosu na žene ($P=0,014$, eta kvadrat=0,046). (Tabela 11., Slika 15B.).

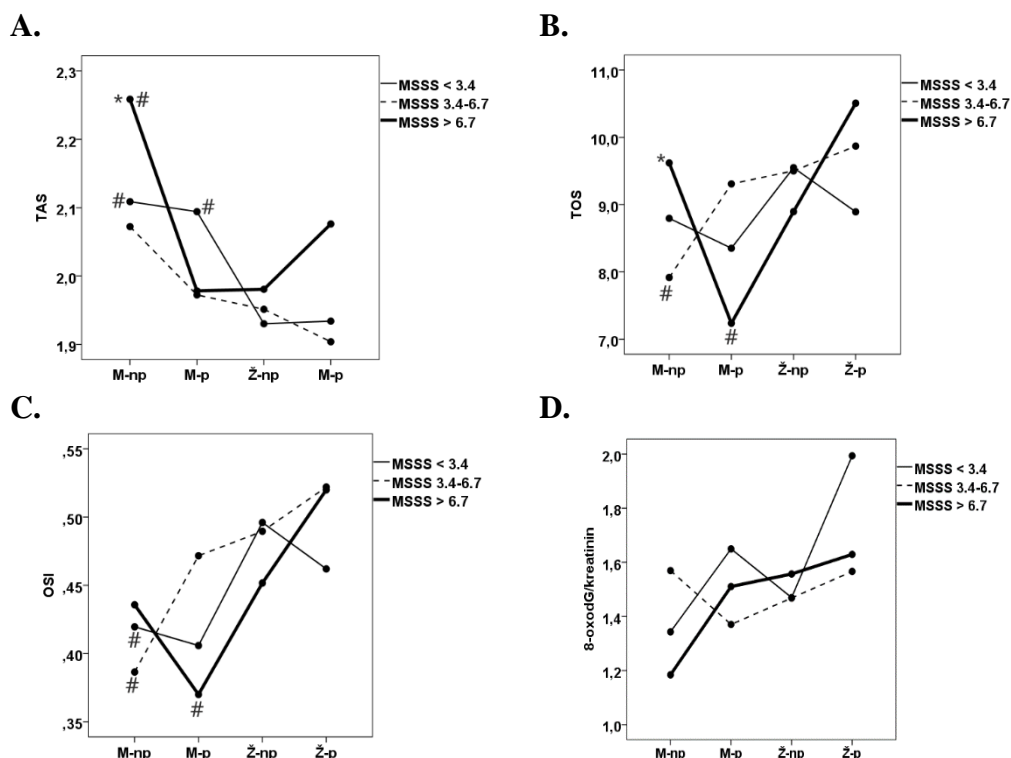
Testom tro-faktorska ANOVA utvrđeno je da udruženi faktori pol, pušenje i progresija bolesti nemaju uticaj na nivo indeksa OSI ($p=0,207$, eta kvadrat=0,024). Analizom pomoću Sidak testa pokazano je da su kod nepušača sa lakšim i sa srednje teškim oblikom bolesti, žene imale viši indeks OSI u odnosu na muškarce (MSSS<3,4: $p=0,020$, eta kvadrat=0,041; MSSS 3,4-6,7: $p=0,002$, eta kvadrat=0,071). U grupi pušača sa teškim oblikom bolesti (MSSS>6,7), žene su takođe imale viši indeks OSI u odnosu na muškarce ($p=0,047$, eta kvadrat=0,030) (Tabela 11., Slika 15C.).

Primenom testa, tro-faktorska ANOVA utvrđeno je da na nivo urinarnog 8-oksodG/kreatinin nisu imali uticaj udruženi faktori: pol, progresija bolesti i pušenje ($p=0,905$, eta kvadrat=0,002) (Tabela 11.).

Tabela 11. Ispitivanje udruženih uticaja pola, progresije bolesti i pušačkog statusa na biomarkere oksidativnog stresa kod MS-pacijenata

Biomarker	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	pol: MSSS: pušački status	0,189	0,026
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS>6,7 i muškarci: pušački status	0,020	0,041
	nepušači i MSSS<3,4: pol	0,005	0,059
	nepušači i MSSS>6,7: pol	0,003	0,069
TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv/L)	pol: MSSS: pušački status	0,025	0,056
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS>6,7 i muškarci: pušački status	0,029	0,037
	MSSS 3,4-6,7 i nepušači: pol	0,007	0,055
	MSSS>6,7 i pušači: pol	0,014	0,046
OSI (arbitrarne jedinice)	pol: MSSS: pušački status	0,207	0,024
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS<3,4 i nepušači: pol	0,020	0,041
	MSSS 3,4-6,7 i nepušači: pol	0,002	0,071
	MSSS>6,7 i pušači: pol	0,047	0,030
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	pol: MSSS: pušački status	0,905	0,002

TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; MSSS: *Multiple Sclerosis Severity Score* (<3,4; 3,4-6,7>6,7); pušački status: pušači, nepušači.



Slika 15. Procenjena srednja vrednost parametara: A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status (μmol H₂O₂ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin (nmol/mmol); M-np: muškarci nepušači, M-p: muškarci pušači, Ž-np: žene nepušači, Ž-p: žene pušači; * razlika u odnosu na pušače; # razlika u odnosu na žene.

4.1.4. Uticaj izlaganja suncu na biomarkere oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa multiplom sklerozom

4.1.4.1. Uticaj sunčevog zračenja na pojavu multiple skleroze

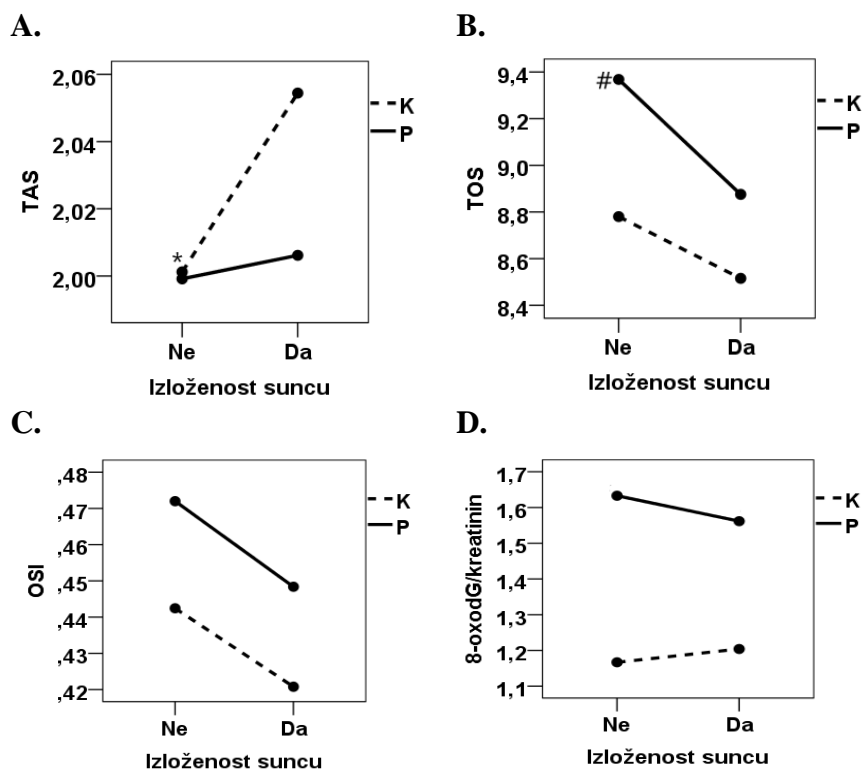
Procenjajući izloženost suncu, uočeno je da su pacijenti bili više izloženi suncu nego kontrolna grupa ispitanika (70,3% i 40,2%; $p < 0,01$) (Tabela 6.).

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA analiziran je uticaj sunčevog zračenja na biomarkere OS u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata, koji su podeljeni na one koji se izlažu suncu i koji se ne sunčaju (Tabela 12., Slika 16.). Iako udružen uticaj sunčanja i zdravstvenog stanja nije imao značaj na nivo biomarkera TAS ($p = 0,292$, eta kvadrat = 0,003), analiza pomoću Sidak testa je pokazala da je kontrolna grupa ispitanika koja se sunčala, imala viši nivo biomarkera TAS u odnosu na ispitanike u istoj grupi koji se nisu sunčali ($p = 0,045$, eta kvadrat = 0,010) (Tabela 12., Slika 16A.). Primenom testa dvo-faktorska ANOVA utvrđeno je da udružen uticaj sunčanja i prisustva bolesti nije imao značaj na nivo biomarkera TOS ($p = 0,553$, eta kvadrat = 0,001). Daljom analizom pomoću Sidak testa pokazano je da u grupi ispitanika koji se nisu izlagali suncu, viši nivo TOS su imali MS-pacijenti u odnosu na kontrolne ispitanike ($p = 0,047$, eta kvadrat = 0,009) (Tabela 12., Slika 16B.). Primenom testa dvo-faktorska ANOVA utvrđeno je da udružen uticaj sunčanja i prisustva bolesti nije imao značaj na nivo indeksa OSI i na nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin (OSI: $p = 0,589$, eta kvadrat = 0,001; 8-oksodG/kreatinin: $p = 0,928$, eta kvadrat = 0) (Tabela 12.).

Tabela 12. Ispitivanje udruženog uticaja izloženosti suncu i prisustva/odsustva MS na biomarkere oksidativnog stresa

Biomarker	Udružen uticaj faktora i interakcije	p	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	izloženost suncu (da/ne) : stanje	0,292	0,003
	Post hoc test po Sidak-u		
	kontrola : izloženost suncu (da/ne)	0,045	0,010
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	izloženost suncu (da/ne) : stanje	0,553	0,010
	Post hoc test po Sidak-u		
	ne izlaganje suncu : stanje	0,047	0,009
OSI (arbitrarne jedinice)	izloženost suncu (da/ne) : stanje	0,928	0
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	izloženost suncu(da/ne) : stanje	0,589	0,001

Stanje (prisustvo/odsustvo MS). TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin;



Slika 16. Procenjene srednje vrednosti parametara oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi (K) i kod MS-pacijenata (P) u odnosu na izloženost suncu; A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status (μmol H₂O₂ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozi (nmol/mmol); * razlika u odnosu na izloženost suncu; # razlika u odnosu na kontrolnu grupu

4.1.4.2. Udružen uticaj pola, prisustva/odsustva MS i izlaganja suncu na biomarkere oksidativnog stresa

Primenom testa tro-faktorska ANOVA nije dobijen statistički značajan uticaj pola, izloženosti suncu i prisustva bolesti na nivo TAS ($p=0,606$, eta kvadrat $0,001$) (Tabela 13.).

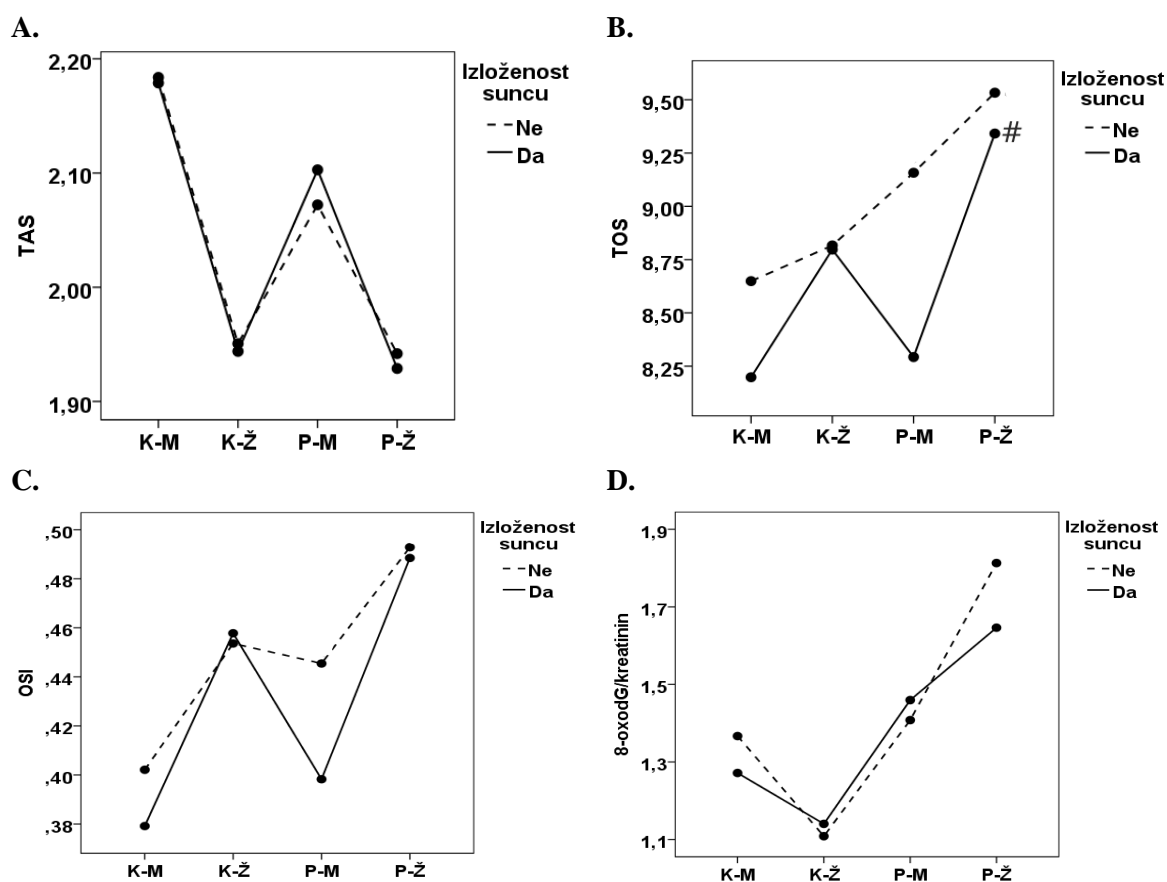
Takođe, nije dobijen značajan uticaj udruženih faktora pol, izloženost suncu i prisustvo bolesti na biomarker TOS ($p=0,760$, eta kvadrat= 0). Primenom Sidak testa pokazano je da su u grupi pacijenata koji su se izlagali suncu, žene imale viši TOS u odnosu na muškarce ($p=0,002$, eta kvadrat= $0,023$) (Tabela 13., Slika 17B.).

Zajednički uticaj pola, prisustva bolesti i izloženosti suncu nije imao uticaj na nivo 8-oksodG/kreatinin i indeks OSI (8-oksodG/kreatinin: $p=0,405$, eta kvadrat= $0,002$) (OSI: $p=0,717$, eta kvadrat= 0) (Tabela 13.).

Tabela 13. Ispitivanje uticaja pola, prisustva/odsustva MS i izloženosti suncu na biomarkere oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata

Biomarker	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	pol : stanje : izloženost suncu	0,606	0,001
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	pol : stanje : izloženost suncu	0,760	0
	Post hoc test po Sidak-u		
	izloženost suncu i pacijenti: pol	0,002	0,023
OSI (arbitrarne jedinice)	pol : stanje : izloženost suncu	0,717	0
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	pol : stanje : izloženost suncu	0,405	0,002

Stanje: prisustvo/odsustvo MS; izloženost suncu; da, ne. TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin.



Slika 17. Procenjene srednje vrednosti parametara oksidativnog stresa u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata prema polu i izloženosti suncu; A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin (nmol/mmol); K-M-kontrola muškarci; K-Ž-kontrola žene; P-M-pacijenti muškarci, P-Ž-pacijenti žene; # razlika u odnosu na muškarce.

4.1.5. Analiza prediktora za nastanak multiple skleroze vezani za oksidativni stres

Primenom binarne logističke regresije (metoda unosa, eng. *Enter*) ispitani su prediktori, koji su povezani sa nastankom MS. Dobijeni model u okviru koga su identifikovani nezavisni prediktori za nastanak MS prikazani su u Tabeli 14.

Tabela 14. Binarni model logističke regresije za predviđanje nastanka multiple skleroze

Prediktor	β (S.E)	p	OR (95% CI)
Pasivni pušači	2,38 (0,57)	<0,001	10,83 (3,54-33,12)
8-oksodG/kreatinin	0,69 (0,19)	<0,001	1,99 (1,35-2,92)
OSI	3,00 (1,23)	0,014	20,12 (1,82-222,62)
Konstanta	-2,86 (0,63)	<0,001	
Celokupni model	χ^2 (df 5, N=351) 54,37 p < 0,001		

β (S.E): koeficijent regresije β (standardna greška za β); OR (95% CI): eng. Odds ratio (interval pouzdanosti); statistička značajnost za $p < 0,05$; OSI-oksidativni indeks; χ^2 -kaj kvadrat test; 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin

Celokupni regresioni model (sa svim prediktorima) bio je statistički značajan, χ^2 (df 5, N=310)=54,37, $p < 0,001$). (Tabela 14.). Ovaj model logističke regresije je objasnio između 16% (Cox and Snell R square) i 22% (Nagelkerke R squared) varijanse u razvoju MS i pravilno klasifikovao 69% pacijenata sa MS.

Kao što je pokazano u Tabeli 14., pasivno pušenje, povećan OSI indeks i povećan 8-oksodG/kreatinin su nezavisni prediktorski faktori razvoja MS. Model pokazuje da je najjači prediktorski faktor OSI indeks (OR 20,12), a zatim izloženost pasivnom pušenju (OR 10,83).

4.1.6. Korelacije između biomarkera oksidativnog stresa, godina starosti i indeksa telesne mase u kontrolnoj grupi ispitanika i kod pacijenata sa multiplom sklerozom

Primenom Pearson-ove korelacione analize ispitana je korelacija između starenja, indeksa telesne mase (BMI) i biomarkera oksidativnog stresa kod zdravih ispitanika i MS pacijenata, a rezultati su predstavljeni u Tabeli 15.

Statističkom analizom je pokazano da je indeks telesne mase u pozitivnoj korelaciji sa godinama starosti u obe grupe ispitanika, (zdravi: $r = 0,295$, $p < 0,01$; MS-pacijenti: $r = 0,237$, $p < 0,01$) i sa parametrom TAS (zdravi: $r = 0,378$, $p < 0,01$; MS-pacijenti $r = 0,237$, $p < 0,01$). Očekivano, u obe grupe ispitanika, OSI je bio u negativnoj korelaciji sa biomarkerom TAS (kontrola: $r = -0,426$, $p < 0,01$; MS-pacijenti $r = -0,498$, $p < 0,01$). Međutim, samo u grupi MS-pacijenata, dobijena je pozitivna korelacija između biomarkera TOS i godina starosti ($r = 0,186$, $p < 0,01$), kao i između biomarkera 8-oksodG/kreatinin i indeksa telesne mase ($r = 0,256$, $p < 0,01$).

Tabela 15. Korelacije između biomarkera oksidativnog stresa, starosti i indeksa telesne mase u kontrolnoj grupi (n=254) i kod MS-pacijenata (n=175)

Biomarker	K MS									
	Godine		K	MS						
BMI	0,295*	0,237*	BMI		K	MS				
TAS	0,046	0,113	0,378*	0,237*	TAS		K	MS		
TOS	-0,007	0,186*	0,042	0,089	-0,003	-0,071	TOS		K	MS
OSI	-0,033	0,097	-0,123	-0,029	-0,426*	-0,498*	0,899*	0,894*	OSI	
8-oksodG/ kreatinin	0,113	-0,014	0,045	0,256*	0,097	-0,024	-0,063	0,057	-0,091	0,056

U tabeli su prikazane vrednosti za Pearson-ov korelacioni koeficijent; *P<0,05; K: kontrolna grupa; BMI: indeks telesne mase; MS: pacijenti sa multiplom sklerozom; TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin.

4.2. Povezanost između genetičke varijante 8-oksoguanin DNK glikozilaze-1 (OGG1) rs1052133 i multiple skleroze

4.2.1. Distribucija genotipova genetičke varijante OGG1 rs1052133 i odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa multiplom sklerozom

U ovoj studiji je analizirana varijanta gena OGG1, rs1052133, koji kodira enzim za reparaciju DNK, u kontrolnoj grupi ispitanika i MS-pacijenata u populaciji Srbije.

U cilju testiranja da li distribucija genotipova u ispitanom uzorku odgovara očekivanoj distribuciji alela G i C izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (H-W ravnoteža) što je prikazano u Tabeli 16. Na slici 18. je prikazana distribucija genotipova varijante OGG1 rs 1052133, gde se vidi dominacija CC genotipa kod MS pacijenata. Kod MS-muškaraca je bilo prisutno izvesno povećanje učestalosti homozigota CC u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 16. i grafik 18D.). Kod muškaraca CC homozigota postojao je faktor rizika za pojavu MS sa verovatnoćom na granici značajnosti (p=0,083), sa Odds ratio (95%) 1,864 (0,919-3,77).

Dobijene frekvencije genotipova u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata nisu odstupali od Hardy-Weinbergove ravnoteže (Tabela 16.).

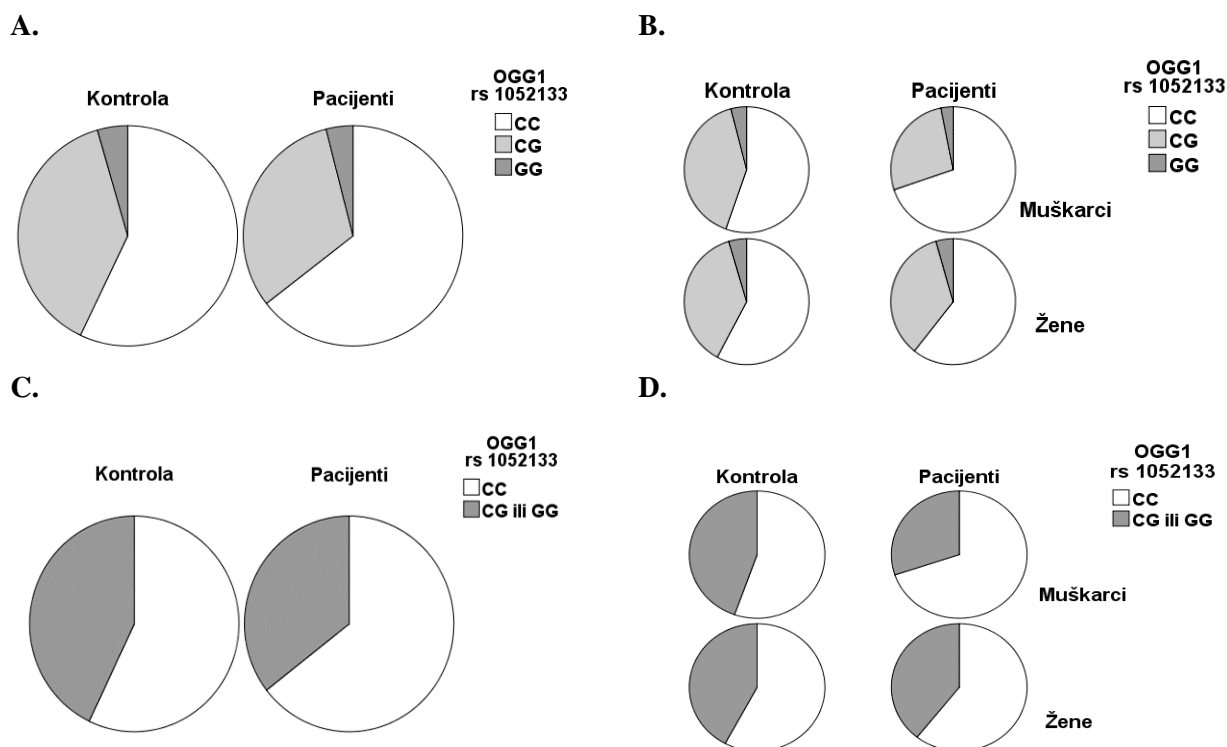
Tabela 16. Distribucija genotipova i alela OGG1 rs 1052133 kod svih ispitanika i prema polu

Genotipovi	Kontrola (n=247)		Pacijenti (n=152)		p**
	Dobijeni broj (frekvencija)	Očekivani broj (frekvencija)	Dobijeni broj (frekvencija)	Očekivani broj (frekvencija)	
CC	141 (0,5709)	143,86 (0,5824)	98 (0,6447)	97,92 (0,6442)	0,144
CG	95 (0,3846)	89,29 (0,3615)	48 (0,3158)	48,15 (0,3168)	0,164
GG	11 (0,0445)	13,86 (0,0561)	6 (0,0395)	5,92 (0,0390)	0,808
CG i GG	106 (0,4291)	-	54 (0,3563)	-	0,144

Nastavak Tabele 16.

	Kontrola (n=247)		Pacijenti (n=152)		p**
Aleli	Dobijeni broj (frekvencija)	Očekivani broj (frekvencija)	Dobijeni broj (frekvencija)	Očekivani broj (frekvencija)	
C	377 (0,7632)		244 (0,8026)		0,192
G	117 (0,2386)		60 (0,1974)		
*H-W χ^2 (p)	1,01 (0,603)		0,002 (1,00)		
	Kontrola-muškarci (n=74)		Pacijenti-muškarci (n=63)		
Genotipovi	Dobijeni broj (frekvencija)	Očekivani broj (frekvencija)	Dobijeni broj (frekvencija)	Očekivani broj/ (frekvencija)	
CC	41 (0,5541)	42,38 (0,5727)	44 (0,6984)	43,75 (0,6944)	0,083
CG	30 (0,4056)	27,24 (0,3681)	17 (0,2698)	17,5 (0,2778)	0,096
GG	3 (0,0405)	4,38 (0,0592)	2 (0,0317)	1,75 (0,0278)	0,784
CG i GG	33 (0,4459)	-	19 (0,3016)	-	0,082
Aleli					
C	112 (0,7568)		105 (0,8333)		0,120
G	36 (0,2432)		21 (0,1668)		
*H-W χ^2 (p)	0,7577 (0,684)		0,0514 (0,974)		
	Kontrola-žene (n=173)		Pacijenti-žene (n=89)		
Genotipovi	Dobijeni broj (frekvencija)	Očekivani broj (frekvencija)	Dobijeni broj (frekvencija)	Očekivani broj/ (frekvencija)	
CC	100 (0,5780)	101,48 (0,5866)	54 (0,6067)	54,27 (0,6098)	0,655
CG	65 (0,3757)	62,04 (0,3586)	31 (0,3483)	30,46 (0,3422)	0,663
GG	8 (0,0462)	9,48 (0,0548)	4 (0,0449)	4,27 (0,0480)	0,962
CG i GG	73 (0,4220)	-	35 (0,3932)	-	0,655
Aleli					
C	265 (0,7659)		139 (0,7809)		0,699
G	81 (0,2341)		39 (0,2191)		
*H-W χ^2 (p)	0,3945 (0,821)		0,0285 (0,993)		

*testiranje Hardy-Weinberg-ove ravnoteže; p-statistička značajnost; **razlika između dobijenih brojeva genotipova, alela i nosioca G alela između kontrolne grupe i MS-pacijenata



Slika 18. Distribucija varijanti OGG1 rs 1052133

A. OGG1 rs 1052133 genotipovi kod svih ispitanika u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata; B. OGG1 rs 1052133 genotipovi u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata prema polu; C. homozigoti CC i nosioci G alela kod svih ispitanika u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata; D. homozigoti CC i nosioci G alela u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata prema polu.

4.2.2. Povezanost genetičke varijante OGG1 rs1052133 i nivoa urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA, analizirana je povezanost genetičke varijante OGG1 rs1052133 i nivoa urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin kod 171 kontrolna ispitanika i 120 MS-pacijenata. Jedna analiza se odnosila na povezanost sva tri genotipa OGG1 rs1052133 (CC, CG i GG), a druga analiza se odnosila na OGG1 rs1052133: CC homozigota i nosilaca G alela. Rezultati su prikazani u Tabeli 17. i Slici 19. Utvrđeno je da su pacijenti koji su nosioci C alela imali viši nivo urinarnog 8-oksodG/kreatinin u odnosu na kontrolnu grupu (CC: $p=0,005$, eta kvadrat=0,028; CG: $p<0,001$, eta kvadrat=0,050) (Tabela 17., Slika 19A.).

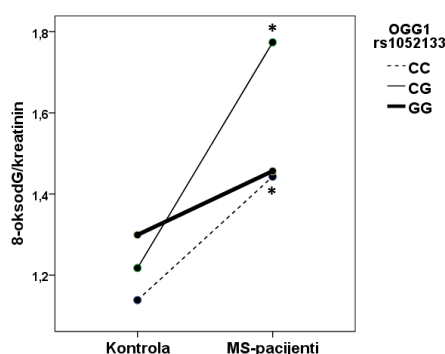
Kada je analiziran uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133, između CC homozigota i nosilaca G alela, na nivo 8-oksodG/kreatinin, nije utvrđen statistički značajan uticaj ($p=0,232$, eta kvadrat=0,005). Primenom Sidak post hoc testa utvrđeno je da je kod MS-pacijenata, nezavisno da li su CC homozigoti ili su nosioci G alela, nivo 8-oksodG/kreatinina viši (CC: $p=0,005$, eta kvadrat=0,028; CG ili GG: $p<0,001$, eta kvadrat=0,048) (Tabela 17., Slika 19B.). Međutim, samo u okviru grupe MS-pacijenata utvrđen je povišen nivo 8-oksodG/kreatinina kod nosilaca G alela (CG i GG) u odnosu na CC homozigote ($p=0,029$; eta kvadrat=0,016).

Tabela 17. Povezanost genetičke varijante OGG1 rs1052133 i nivoa biomarkera 8-oksodG/kreatinin u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata

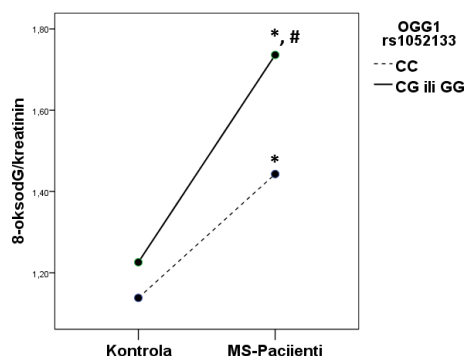
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
	OGG1 rs1052133 (CC, CG, GG) : stanje	0,314	0,008
	Post hoc test po Sidak-u		
	CC: stanje	0,005	0,028
	CG: stanje	<0,001	0,050
	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije		
	OGG1 rs1052133 (CC, CG ili GG) : stanje	0,232	0,005
	Post hoc test po Sidak-u		
	CC: stanje	0,005	0,028
	CG ili GG: stanje	<0,001	0,048
MS-pacijenti : OGG1 rs1052133 (CC, CG ili GG)	0,029	0,016	

8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin; stanje: prisustvo/odsustvo MS

A.



B.



Slika 19. Procenjena srednja vrednost urinarnog 8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol) u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata: A. prema OGG1 rs1052133: CC,CG; GG; B. prema OGG1 rs1052133: CC, CG ili GG;

* razlika u odnosu na kontrolnu grupu; # razlika u odnosu na genotip CC

4.2.3. Uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133, pušačkog statusa i prisustva / odsustva MS na nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin

Primenom testa tro-faktorska ANOVA ispitan je uticaj prisustva bolesti, genetičke varijante OGG1 rs1052133 (CC homozigoti ili nosioci G alela, GC ili CC) i pušačkog statusa na nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin i rezultati su prikazani u Tabeli 18. i na Slici 20. U kontrolnoj grupi broj ispitanika prema pušačkom statusu i genetičkoj varijanti OGG1 rs1052133 bio je: nepušači i CC, n=66; nepušači i nosioci G alela, n=52; pušači i CC, n=29; pušači i nosioci G alela, n=24. U grupi MS pacijenata broj ispitanika prema pušačkom statusu i OGG1 rs1052133 bio je: nepušači i CC, n=55; nepušači i nosioci G alela, n=30; pušači i CC, n=22; pušači i nosioci G alela, n=12.

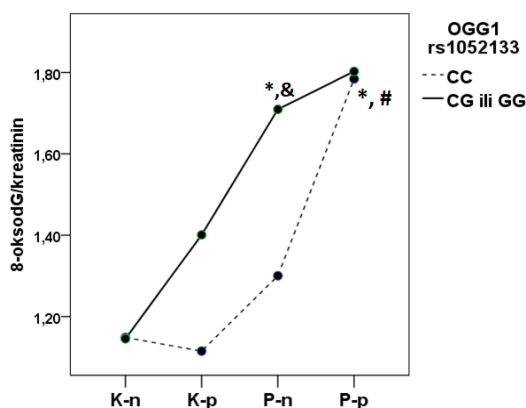
Udruženi uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133, prisustvo ili odsustvo MS i pušački status bio je na granici značajnosti na nivo urinarnog 8-oksodG/kreatinina ($p=0,068$, eta kvadrat=0,018). Daljom analizom pomoću Sidak testa pokazano je da nezavisno od pušačkog statusa i genetičke varijante OGG1 rs1052133, pacijenti imaju viši nivo 8-oksodG/kreatinina (pacijenti nepušači i nosioci G alela vs. zdravi nepušači i nosioci G alela, $p<0,001$; pacijenti pušači i CC homozigoti vs. zdravi pušači i CC homozigoti, $p=0,001$) u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, utvrđeno je da u grupi MS-pacijenata koji su CC homozigoti, pušači su imali viši nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu

na pacijente nepušače sa istim karakteristikama ($p=0,005$), dok je u grupi MS pacijenata koji su bili nepušači, nivo 8-oksodG/kreatinina bio značajno viši kod nosilaca G alela ($p=0,010$).

Tabela 18. Uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133 (CC, CG ili GG) i pušačkog statusa na nivo biomarkera 8-oksodG/kreatinin u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata

8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
		stanje : pušački status: OGG1 rs1052133	0,068
	Post hoc test po Sidak-u		
	nepušači i nosioci G alela: stanje	<0,001	0,043
	pušači i CC: stanje	0,001	0,041
	pacijenti i CC: pušački status	0,005	0,027
	pacijenti i nepušači: OGG1 rs1052133	0,010	0,023

Stanje: prisustvo/odsustvo MS; pušački status: pušači, nepušači; OGG1 rs1052133: CC homozigoti ili nosioci G alela (GC ili CC)



Slika 20. Procenjene srednje vrednosti 8-oksodG/kreatinina u kontrolnoj grupi i grupi MS-pacijenata prema pušačkom statusu i varijanti OGG1 rs1052133 (CC homozigoti i nosioci G alela)

K-n: kontrola nepušači; K-p: kontrola pušači; P-n: pacijenti nepušači; P-p: pacijenti pušači; * razlika u odnosu na kontrolu; # razlika u odnosu na nepušače; & razlika u odnosu na CC.

4.3. Značaj serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fosfata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) u multiploj sklerozi

4.3.1. Uticaj pola na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fosfata, kinureninske i hinolinske kiseline kod MS-pacijenata

Primenom t-testa analiziran je uticaj pola na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL), sfingozin-1-fosfata (S1P), kinureninske kiseline (KA) i hinolinske kiseline (QA) kod MS-pacijenata, a rezultati su prikazani u Tabeli 19. Utvrđeno je da su žene imale značajno viši nivo sNfL u odnosu na muškarce ($p<0,001$). Pol nije imao statistički značajan uticaj na nivoe biomarkera S1P, KA i QA.

Tabela 19. Nivoi serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, kinureninske i hinolinske kiseline kod svih MS-pacijenata i prema polu

Biomarker	Svi pacijenti (n=78)	Muškarci (n=40)	Žene (n=38)	p*
sNfL (pg/ml)	11,80±2,07	11,04±1,67	12,61±2,17	<0,001
S1P (ng/ml)	171,43±40,44	169,71±45,35	173,25±34,9	0,702
KA (ng/ml)	53,39±26,49	53,02±32,85	53,71±20,74	0,936
QA (ng/ml)	102,04±48,99	100,88±47,95	102,98±50,94	0,894

Vrednosti kontinuiranih promenljivih u tabeli su predstavljene kao srednje vrednosti±standardna devijacija; sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1-fosfat; KA: kinureninska kiselina; QA: hinolinska kiselina; *značajnost razlike prema polu.

4.3.2. Uticaj pola i pušačkog statusa na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod MS-pacijenata

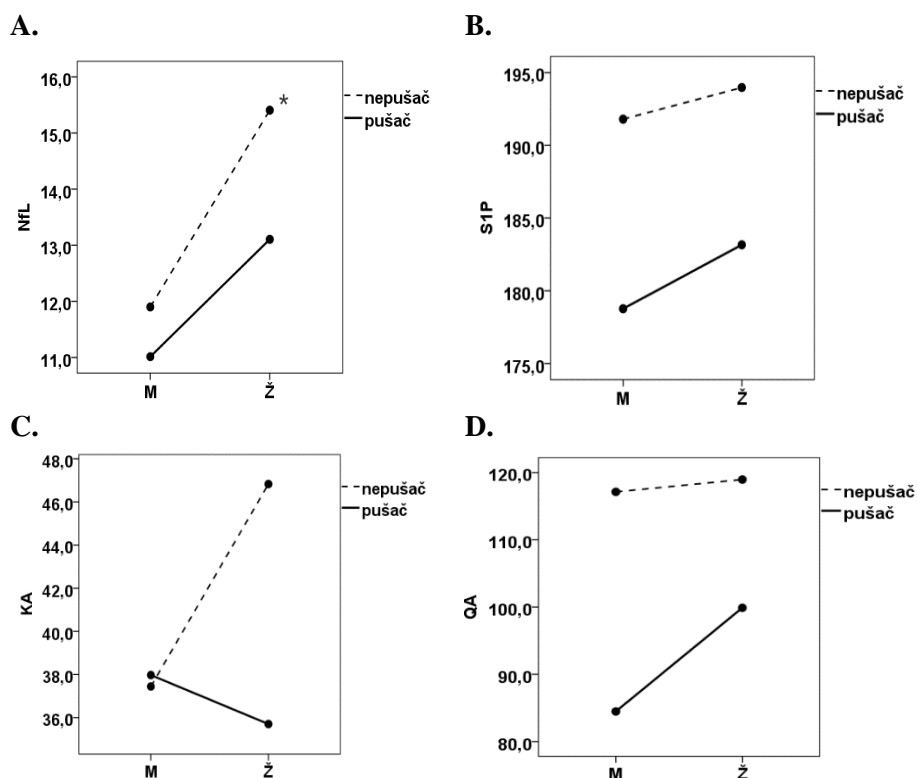
Biomarkeri sNfL, S1P, KA i QA su analizirani u grupi MS-pacijenata koji su bili podeljeni prema polu i u odnosu na pušački status (pušači i nepušači). Primenom testa dvo-faktorska ANOVA analiziran je udružen uticaj pušačkog statusa i pola kod ovih pacijenata. Rezultati su prikazani u Tabeli 20. i Slici 21.

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA nije dobijen značajan uticaj pola i pušačkog statusa na nivo biomarkera sNfL ($p=0,501$, eta kvadrat=0,006), ali je primenom Sidak testa pokazano da su među nepušačima, žene imale viši nivo sNfL u odnosu na muškarce ($p<0,001$, eta kvadrat=0,136) (Tabela 20, Slika 21A.). Nije dobijen značajan uticaj pola i pušačkog statusa na nivoe ostalih biomarkera (S1P: $p=0,834$, eta kvadrat=0,001; KA: $p=0,140$, eta kvadrat=0,066; QA: $p=0,486$, eta kvadrat=0,014).

Tabela 20. Ispitivanje udruženog uticaja pola i pušačkog statusa na serumske lake lance neurofilamenata, sfingozin-1-fostat, kinureninsku i hinolinsku kiselinu kod MS-pacijenata

Biomarker	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
sNfL (pg/ml)	pol : pušenje	0,501	0,006
	Post hoc test po Sidak-u		
	nepušač : pol	<0,001	0,136
	žene: pušački status	0,017	0,074
S1P (ng/ml)	pol : pušenje	0,834	0,001
KA (ng/ml)	pol : pušenje	0,140	0,060
QA (ng/ml)	pol : pušenje	0,486	0,014

sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1 fosfat; KA: kinureninska kiselina, QA: hinolinska kiselina



Slika 21. Procenjene srednje vrednosti: A. serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNFL, pg/ml); B. sfingozin-1-fosfata (S1P, ng/mL); C. kinureninske kiseline (KA, ng/mL); D. hinolinske kiseline (QA, ng/mL) u odnosu na pol i pušački status; * razlika u odnosu na muškarce.

4.3.3. Uticaj pola i starosne dobi na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod MS-pacijenata

Biomarkeri serumski laki lanci neurofilamenata (sNFL), sfingozin-1-fostat (S1P), kinureninska (KA) i hinolinska (QA) kiselina su analizirani u grupi MS-pacijenata koji su bili podeljeni prema polu i starosnoj dobi (pacijenti mlađi od 30 godina i pacijenti stariji od 30 godina). Rezultati dobijeni primenom neparametarskog Mann-Whitney testa prikazani su u Tabeli 21. Utvrđene su povišene vrednosti za sNFL i S1P u populaciji mlađih pacijenata, u celokupnoj populaciji pacijenata (za sNFL: $p=0,001$; za S1P: $p=0,097$), kod muškaraca (za sNFL: $p=0,066$; za S1P: $p=0,015$), kao i kod žena (za sNFL: $p=0,005$). Žene starije od 30 godina imale su povišen nivo sNFL u odnosu na muškarce iste starosne dobi ($p=0,009$).

Tabela 21. Nivoi serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, kinureninske i hinolinske kiseline kod svih MS-pacijenata i podeljenih prema polu i starosnim grupa

	Biomarker	Starosne grupe	P *
Svi			
sNfL (pg/ml)	13,7 (12,2-15,4)	< 30 (n=9)	0,001
	11,3 (9,9-13,0)	> 30 (n=69)	
S1P (ng/ml)	182,9 (148,5-223,3)	< 30 (n=9)	0,097
	176,2 (162,4-187,8)	> 30 (n=69)	
KA (ng/ml)	66,3 (52,1-90,3)	< 30 (n=7)	0,154
	45,9 (32,1-64,5)	> 30 (n=33)	
QA (ng/ml)	93,9 (59,0-99,2)	< 30 (n=7)	0,749
	83,6 (64,5-140,3)	> 30 (n=33)	
Muškarci			
sNfL (pg/ml)	12,45 (10,8-14,50)	< 30 (n=3)	0,066
	10,2 (9,6-12,2) ^a	> 30 (n=37)	
S1P (ng/ml)	220,4 (210,2-220,4)	< 30 (n=3)	0,015
	170,7 (138,1-187,9)	> 30 (n=37)	
KA (ng/ml)	81,3 (52,1-89,5)	< 30 (n=2)	0,206
	38,80 (26,9-69,2)	> 30 (n=16)	
QA (ng/ml)	93,1 (87,1-99,1)	< 30 (n=2)	0,574
	81,2 (72,2-132,6)	> 30 (n=16)	
Žene			
sNfL (pg/ml)	15,2 (13,4-16,4)	< 30 (n=6)	0,005
	12,1 (10,4-13,4)	> 30 (n=32)	
S1P (ng/ml)	173,6 (137,3-227,6)	< 30 (n=6)	0,889
	173,2 (155,5-193,5)	> 30 (n=32)	
KA (ng/ml)	66,3 (31,5-81,7)	< 30 (n=5)	0,273
	54,7 (42,6-84,5)	> 30 (n=17)	
QA (ng/ml)	93,9 (58,6-112,9)	< 30 (n=5)	0,505
	98,2 (60,1-145,4)	> 30 (n=17)	

Vrednosti u tabeli su prikazane kao medijana i interkvartilni interval (25.-75. percentil); * razlike između starosnih grupa; ^a razlika po polu u grupi pacijenata starijih od 30 godina; sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1-fosfat; KA: kinureninska kiselina; QA: hinolinska kiselina

4.3.4. Korelacije između nivoa serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) i težine multiple skleroze

Za ispitivanje veze između MSSS skora, sNfL, S1P, KA i QA korišćena je Pearsonova linearna korelaciona analiza i rezultati su prikazani u Tabeli 22. Kod svih pacijenata i kod muškaraca sa MS utvrđen je trend pozitivne korelacije između sNfL i S1P, ali je razlika bila na granici značajnosti (svi: p=0,092; muškarci: p=0,089). Kod svih pacijenata i u populaciji žena sa MS dobijena je negativna korelacija između parametara sNfL i QA, ali je takođe razlika bila na granici značajnosti (svi: p=0,094; žene: p=0,068). Statistički značajna korelacija između MSSS skora i parametra S1P dobijena je kod svih pacijenata i kod muškaraca sa MS (svi: p=0,019; muškarci: p=0,029).

Tabela 22. Korelacije između serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, kinureninske kiseline, hinolinske kiseline i MSSS skora kod svih MS-pacijenata i prema polu

MS-pacijenti	Parametri	sNfL			
Svi	S1P	0,192 (0,092)			
Muškarci		0,272 (0,089)			
Žene		0,116 (0,489)			
Svi	KA	0,078 (0,634)	S1P		
Muškarci		0,095 (0,707)	0,153 (0,545)		
Žene		-0,142 (0,528)	-0,056 (0,804)	KA	
Svi	QA	0,039 (0,810)	-0,141 (0,387)		
Muškarci		-0,147 (0,562)	0,177 (0,496)	-0,324 (0,190)	
Žene		-0,396 (0,068)	-0,100 (0,659)	0,069 (0,759)	QA
Svi	MSSS	0,266 (0,019)	0,205 (0,205)	0,131 (0,420)	
Muškarci		-0,043 (0,794)	0,345 (0,029)	0,294 (0,236)	-0,071 (0,780)
Žene		-0,012 (0,942)	0,149 (0,373)	0,072 (0,752)	0,335 (0,128)

Rezultati u tabeli su prikazani kao: Pearsonov koeficijent korelacije (statistička značajnost za nivo verovatnoće $p < 0,05$); sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1-fosfat; KA: kinureninska kiselina; QA: hinolinska kiselina

Zatim je ispitana korelacija između biomarkera sNfL, S1P, KA i QA u zavisnosti od progresije bolesti u dve grupe pacijenata podeljenih na osnovu MSSS skora na one sa blagom i srednjom formom bolesti ($MSSS < 6,7$) i pacijente sa teškim oblikom bolesti ($MSSS > 6,7$). Rezultati su prikazani u Tabeli 23. Utvrđena je visoka pozitivna korelacija između biomarkera sNfL i S1P kod pacijenata sa teškim oblikom bolesti ($MSSS > 6,7$) ($r = 0,696$, $n = 13$, $p = 0,008$).

Tabela 23. Korelacije između serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, hinolinske i kinureninske kiseline i težine multiple skleroze procenjene na osnovu MSSS skora

Težina bolesti		Biomarker	sNfL		
MSSS	< 6,7	S1P	0.142 (0.260)		
	> 6,7		0.696 (0.008)	S1P	
MSSS	< 6,7	KA	0.127 (0.494)	0.084 (0.653)	
	> 6,7		-0.251 (0.514)	-0.035 (0.928)	KA
MSSS	< 6,7	QA	-0.322 (0.077)	-0.032 (0.865)	-0.098 (0.601)
	> 6,7		0.103 (0.792)	0.144 (0.711)	-0.462 (0.211)

Rezultati u tabeli su prikazani kao: Pearsonov koeficijent korelacije (statistička značajnost p); sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1-fosfat; KA: kinureninska kiselina, QA: hinolinska kiselina; MSSS- *Multiple Sclerosis Severity Score*

4.3.5. Udruženi uticaj pola i progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS skora i nivoa lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod pacijenata sa multiplom sklerozom

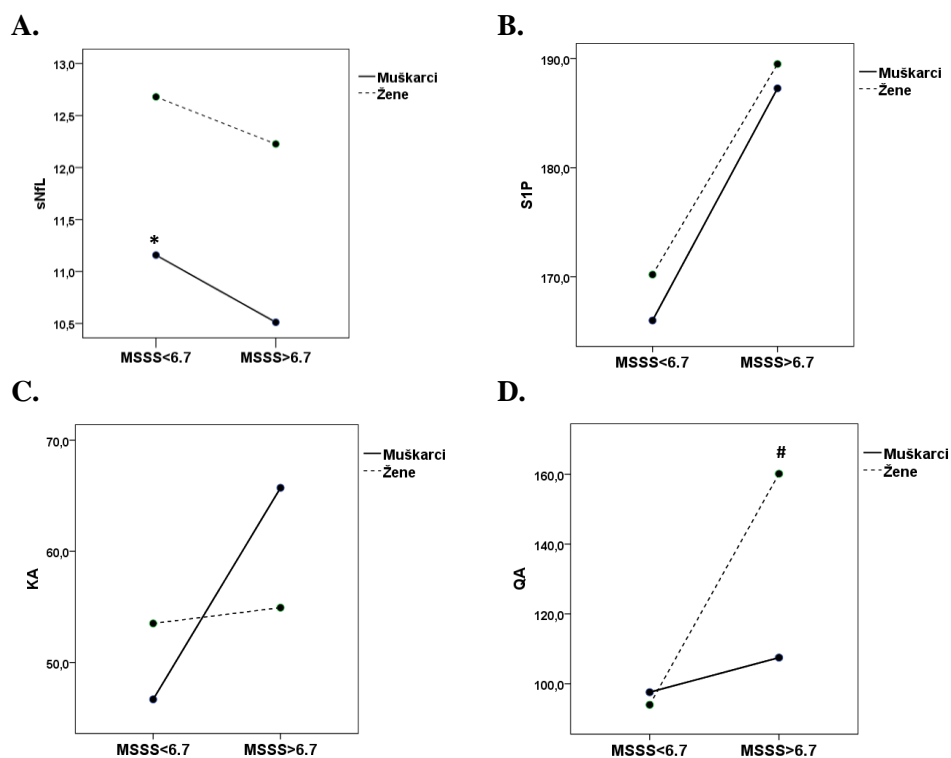
Primenom testa dvo-faktorska ANOVA analiziran je udružen uticaj progresije bolesti ($6,7 > \text{MSSS} < 6,7$) i pola kod MS-pacijenata na nivo serumskih biomarkera sNfL, S1P, KA i QA. Iako nije zapažen statistički značajan uticaj progresije bolesti i pola na sNfL ($p=0,871$, eta kvadrat=0) (Tabela 24.), primenom Sidak testa pokazano je da u grupi sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti ($\text{MSSS} < 6,7$) žene imaju viši nivo sNfL u odnosu na muškarace ($p < 0,002$, eta kvadrat=0,119) (Tabela 24., Slika 22.).

Analiza je pokazala da iako nije bilo značajnog uticaja progresije bolesti i pola na nivo hinolinske kiseline (QA) ($p=0,143$, eta kvadrat=0,057), uočeno je da žene sa teškim oblikom bolesti ($\text{MSSS} > 6,7$) imaju značajno viši nivo hinolinske kiseline u odnosu na žene sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti ($\text{MSSS} < 6,7$) ($p=0,032$; Tabela 24).

Tabela 24. Uticaj progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS skora i pola na serumske lake lance neurofilamenata, sfingozin-1-fostat, kinureninsku i hinolinsku kiselinu

Biomarker	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
sNfL (pg/ml)	pol : MSSS	0,871	0
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS (<6,7): pol	0,002	0,119
S1P (ng/ml)	pol : MSSS	0,936	0
KA (ng/ml)	pol : MSSS	0,416	0,018
QA (ng/ml)	pol : MSSS	0,143	0,057
	Post hoc test po Sidak-u		
	Žene: MSSS	0,032	0,122

sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1-fosfat; KA: kinureninska kiselina, QA: hinolinska kiselina MSSS: multiple sclerosis severity score, $\text{MSSS} < 6,7$ ili $\text{MSSS} > 6,7$.



Slika 22. Procenjene srednje vrednosti: A. serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL, pg/ml); B. sfingozin-1-fosfata (S1P, ng/mL); C. kinureninske kiseline (KA, ng/mL); D. hinolinske kiseline (QA, ng/mL) u odnosu na pol i težinu bolesti procenjene na osnovu MSSS: *Multiple Sclerosis Severity Score*, MSSS<6.7 ili MSSS>6.7; *razlika u odnosu na žene; # razlika u odnosu na MSSS<6.7.

4.3.6. Uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133 (CC homozigoti i nosioci G alela) na nivo serumskih lakih lanaca neurofilamenata u zavisnosti od pola

Ispitan je uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133 (CC homozigoti; nosioci G alela: CG ili GG) na nivo serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL) u zavisnosti od pola, primenom testa dvo-faktorska ANOVA i rezultati su prikazani u Tabeli 25. i Slici 23.

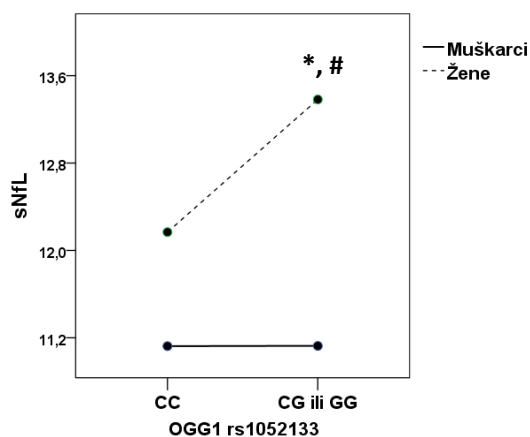
Udruženi uticaj dva faktora nije pokazao značajan efekat na nivo sNfL ($p=0,225$, eta kvadrat= $0,022$), ali je Sidak post hoc test pokazao da je u grupi MS-pacijenata koji su nosioci G alela (CG ili GG) bio statistički značajan viši nivo sNfL kod žena u odnosu na muškarce ($p=0,007$, eta kvadrat= $0,103$) (Tabela 25., Slika 23A.).

Uočen je viši nivo sNfL u grupi pacijentkinja koje su bile GG i CG u odnosu na pacijentkinje koje su bile CC homozigoti, ali je verovatnoća bila na granici značajnosti ($p=0,064$, eta kvadrat= $0,050$) (Tabela 25., Slika 23A.).

Tabela 25. Ispitivanje udruženog uticaja genetičke varijante OGG1 rs1052133 na nivo serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL) u zavisnosti od pola kod MS-pacijenata

Biomarker	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
sNfL (pg/ml)	pol : OGG1 rs1052133	0,225	0,022
	Post hoc test po Sidak-u		
	žene : OGG1 rs1052133	0,064	0,050
	OGG1 rs1052133 : pol	0,007	0,103

OGG1 rs1052133: CC homozigoti i nosioci G alella (CG ili GG); sNfL: serumski laki lanaci neurofilamenata



Slika 23. Procenjene srednje vrednosti serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL, pg/ml), u odnosu na pol i genetičku varijantu OGG1 rs1052133: CC homozigoti i nosioci G alella (CG ili GG); * u odnosu na muškarce, # u odnosu na CC homozigot

4.4. Uticaj DMT na ispitivane biomarkere kod pacijenata sa multiplom sklerozom

4.4.1. Uticaj DMT na biomarkere oksidativnog stresa kod pacijenata sa multiplom sklerozom koji su primali DMT i pacijenata koji nisu primali DMT

Analiza uticaja DMT na biomarkere oksidativnog stresa ispitana je u dve grupe MS-pacijenata. Jednu grupu su činili MS-pacijenti koji nisu primali DMT (n=65,38%), a drugu grupu su činili pacijenti koji su primali sledeću DMT: modulatori sfingozin-1-fosfat receptora (Ponesimod[®], Ozanimod[®], Fingolimod[®], n=64, 37%), interferon beta-1b (Betaferon[®]; n=20,11%), interferon beta-1a (Rebif[®], n=16%) i glatiramer-acetat (Copaxone[®] n=10,6%). Karakteristike MS-pacijenata u odnosu na terapiju prikazani su u Tabeli 26.

Pacijenti koji nisu primali DMT imali su viši MSSS skor (p<0,001), niži nivo biomarkera TAS (p=0,033) i viši nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin (p=0,003) u odnosu na MS-pacijente koji su primali DMT. Viši nivo TAS je dobijen kod muškaraca u odnosu na žene nezavisno od primanja DMT (pacijenti bez DMT, p=0,006; pacijenti sa DMT, p<0,001). Međutim, viši nivoi biomarkera TOS i OSI su dobijeni kod žena nego kod muškaraca, takođe nezavisno od terapije (TOS: pacijenti bez DMT, p=0,017; pacijenti sa DMT, p=0,003; OSI: pacijenti bez DMT, p=0,017; pacijenti

sa DMT, $p < 0,001$). Nivoi urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin bili su značajno viši kod žena bez DMT nego kod žena koje su primale DMT ($p = 0,014$).

Tabela 26. Karakteristike i biomarkeri oksidativnog stresa kod svih MS-pacijenata i u zavisnosti od DMT i pola

Karakteristika/ biomarker	Svi		Muškarci		Žene	
	Bez DMT (N=64)	Sa DMT (N=111)	Bez DMT (N=20)	Sa DMT (N=56)	Bez DMT (N=44)	Sa DMT (N=55)
Starost, godine	39,5±11,1	41,9±9,2	38,7±8,6	42,6±8,4	39,9±12,1	41,2±9,9
Terapija (%)						
Rebif		8,6		11		4
Betaferon,	-	11,4		12		8
Copaxone		5,7	-	8	-	2
Mod.S1-P-R		36,6		24		40
Pušači (%)	17,2	14,4	10	16,1	20,5	12,7
BMI (kg/m ²)	24,51±4,45	24,78±3,65	25,97±2,75 ^b	25,68±3,39 ^c	23,85±4,92	23,86±3,69
EDSS	2,84±1,56	2,53±1,22	2,78±1,89	2,45±1,22	2,85±1,43	2,60±1,21
MSSS	5,14±2,23 ^a	3,66±2,18	5,01±2,41 ^d	3,39±2,23	5,19±2,17 ^e	3,95±2,09
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	1,96±0,18 ^a	2,03±0,22	2,04±0,19 ^b	2,11±0,21	1,92±0,16	1,94±0,19
TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv/L)	9,14±1,88	8,95±1,70	8,38±1,81 ^b	8,61±1,62 ^c	9,49±1,83	9,31±1,71
OSI (arbitralne jedinice)	0,47±0,11	0,45±0,10	0,41±0,11 ^b	0,41±0,08 ^c	0,50±0,10	0,48±0,10
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	2,12±2,12 ^a	1,39±0,76	1,59±0,53	1,41±0,75	2,32±2,46 ^e	1,38±0,77

Kvantitativne promjenjive su prikazane kao srednja vrednost±standardna devijacija; BMI: indeks telesne mase; TOS: ukupni oksidativni status; TAS: ukupni antioksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin. EDSS: *Expanded Disability Status Scale*, MSSS: *Multiple Sclerosis Severity Score*, Mod.S1-P-R: modulatori S1P receptora; ^a razlike između pacijenata na terapiji i bez terapije; ^b razlike između muškaraca i žena koji nisu na terapiji; ^c razlike između muškaraca i žena koji su na terapiji; ^d razlike između pacijenata bez i sa terapijom u populaciji muškaraca; ^e razlike između pacijenata bez i sa terapijom u populaciji žena.

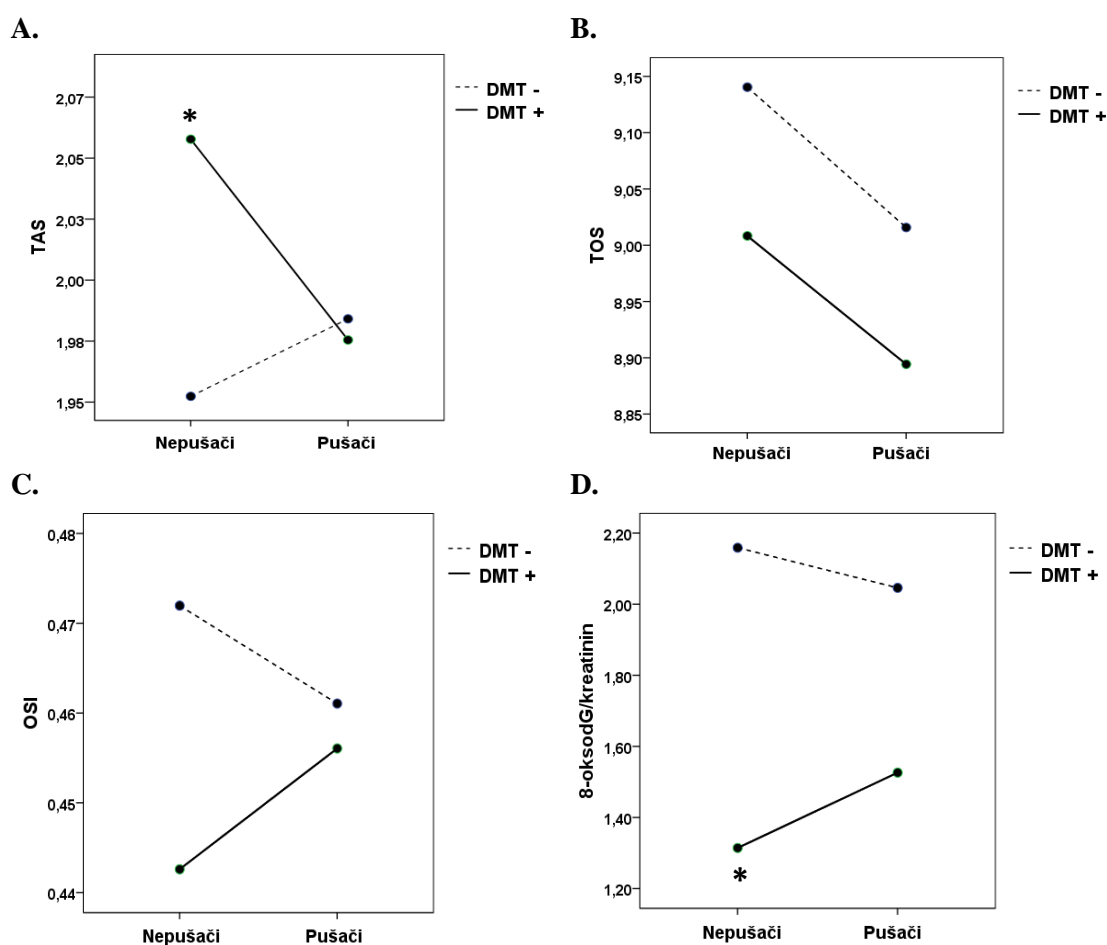
4.4.2. Uticaj DMT na biomarkere oksidativnog stresa kod pacijenata sa multiplom sklerozom koji su primali DMT i pacijenata koji nisu primali DMT u odnosu na pušački status

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA ispitan je uticaj pušačkog statusa i terapije na nivo parametara OS i rezultati su prikazani u Tabeli 27. i Slici 24. Iako, udružen uticaj terapije i pušenja nije značajno uticao na nivo biomarkera OS (TAS: $p = 0,082$, eta kvadrat=0,018; TOS: $p = 0,915$, eta kvadrat=0; OSI: $p = 0,550$, eta kvadrat=0,002; 8-oksodG/kreatinin: $p = 0,556$, eta kvadrat=0,003), analiza pomoću Sidak testa je pokazala da je grupa nepušača koji su primali terapiju imala značajno viši nivo TAS, a niži nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na one koji nisu primali terapiju (TAS: $p = 0,007$, eta kvadrat=0,044; 8-oksodG/kreatinin: $p = 0,004$, eta kvadrat=0,060) (Tabela 27., Slika 24.).

Tabela 27. Uticaj DMT i pušačkog statusa na biomarkere oksidativnog stresa kod MS-pacijenata

Biomarker	Udruženi uticaji terapije i pušačkog statusa	P	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	terapija: pušački status	0,104	0,016
	Post hoc test po Sidak-u		
	nepušač i terapija	0,007	0,044
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	terapija: pušački status	0,986	0
OSI (arbitrarne jedinice)	terapija: pušački status	0,503	0,003
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	terapija: pušački status	0,556	0,003
	Post hoc test po Sidak-u		
	nepušač i terapija	0,004	0,060

TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin; Terapija: da ili ne; pušački status: pušači ili nepušači.



Slika 24. Procenjene srednje vrednosti za biomarkere OS u odnosu na primenjenu DMT terapiju i pušački status. A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin (nmol/mmol); * razlika u odnosu na pacijente bez terapije.

4.4.3. Uticaj DMT na biomarkere oksidativnog stresa kod pacijenata sa multiplom sklerozom u zavisnosti od pola i pušačkog statusa

Biomarkeri OS su analizirani u grupi pacijenata podeljenih prema polu u odnosu na pušački status i u odnosu na to da li su primali terapiju. Primenom testa tro-faktorska ANOVA analiziran je udružen uticaj terapije, pušačkog statusa i pola na nivoe biomarkera TAS u grupi pacijenata obolelih od MS i nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0,175$, eta kvadrat= $0,012$), ali je Sidak test pokazao da su u grupi nepušača, muškarci na terapiji imali viši nivo biomarkera TAS u odnosu na muškarce bez terapije ($p=0,029$, eta kvadrat= $0,030$). Takođe, među nepušačima koji su bili na terapiji, žene su imale niži nivo biomarkera TAS u poređenju sa muškarcima ($p<0,001$, eta kvadrat= $0,116$) (Tabela 28., Slika 25A.).

Primenom testa tro-faktorska ANOVA analiziran je udružen uticaj terapije, pušačkog statusa i pola na nivoe biomarkera TOS u grupi pacijenata obolelih od MS i nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0,069$, eta kvadrat= $0,021$), ali je Sidak test pokazao da su među pacijentima koji su pušači i nisu bili na terapiji, žene imale veći nivo biomarkera TOS u odnosu na muškarce ($p=0,002$, eta kvadrat= $0,057$) (Tabela 28., Slika 25B.).

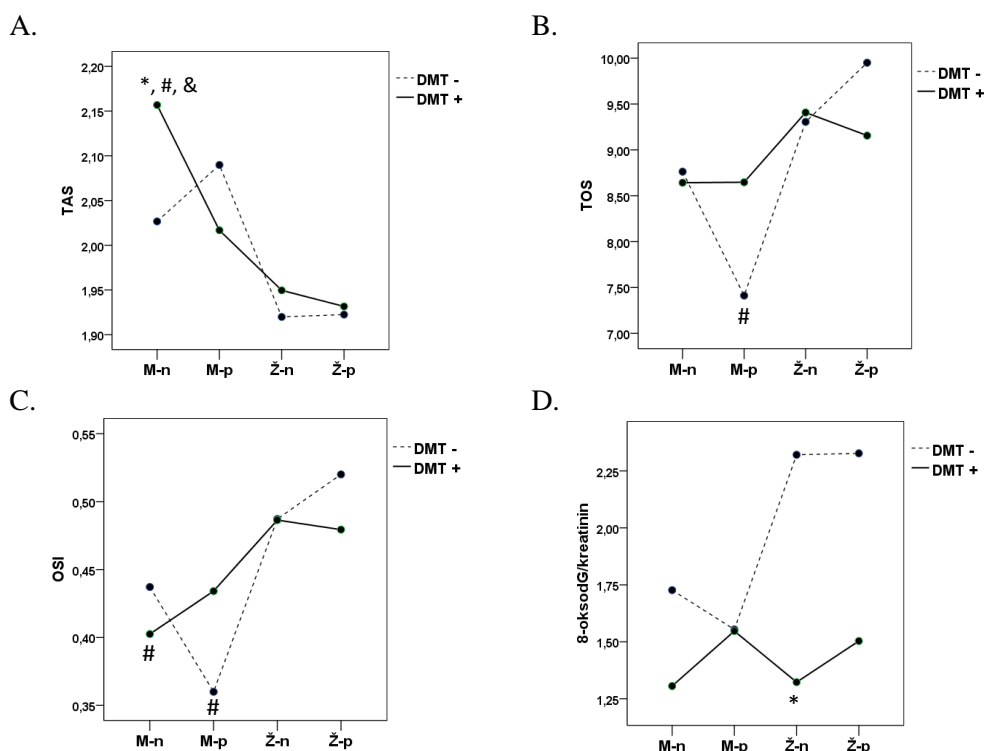
Primenom testa tro-faktorska ANOVA kojim je analiziran udružen uticaj terapije, pušačkog statusa i pola dobijen je značajan uticaj ovih faktora na nivo indeksa OSI ($p=0,035$, eta kvadrat= $0,028$). Primenom Sidak testa pokazano je da među pacijentima koji su nepušači i koji primaju terapiju, žene imaju viši nivo indeksa OSI od muškaraca ($p<0,001$, eta kvadrat= $0,074$). Takođe, među pacijentima koji su pušači i nisu na terapiji, žene imaju veći indeks OSI od muškaraca ($p=0,001$, eta kvadrat= $0,069$) (Tabela 28., Slika 25C.).

Primenom testa tro-faktorska ANOVA kojim je analiziran udružen uticaj terapije, pušačkog statusa i pola nije dobijen značajan uticaj ovih faktora na nivo biomarkera 8-oksodG/kreatinin ($p=0,836$, eta kvadrat= 0). Primenom Sidak testa pokazano je da u grupi žena koje su nepušači, one žene koje su na terapiji su imale niži nivo biomarkera 8-oksodG/kreatinin u odnosu na žene koje nisu primale terapiju ($p=0,007$, eta kvadrat= $0,053$) (Tabela 28., Slika 25D.).

Tabela 28. Ispitivanje udruženog uticaja terapije, pola i pušačkog statusa na biomarkere oksidativnog stresa kod MS-pacijenata

Biomarker	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	terapija : pušenje : pol	0,175	0,012
	Post hoc test po Sidak-u		
	nepušači i muškarci: terapija	0,029	0,030
	muškarci i sa terapijom: pušački status	0,012	0,039
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	nepušači i sa terapijom: pol	<0,001	0,116
	terapija : pušenje : pol	0,069	0,021
	Post hoc test po Sidak-u		
OSI (arbitrarne jedinice)	bez terapije i pušači : pol	0,002	0,057
	terapija : pušenje : pol	0,035	0,028
	Post hoc test po Sidak-u		
	sa terapijom i nepušači: pol	<0,001	0,074
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	bez terapije i pušači: pol	0,001	0,069
	terapija i pušači: pol	0,836	0
	Post hoc test po Sidak-u		
	nepušači i žene: terapija	0,007	0,053

TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin; pol: muškarci ili žene; terapija: da ili ne; pušački status: pušači ili nepušači.



Slika 25. Procenjene srednje vrednosti za biomarkere oksidativnog stresa u odosu na primenjenu DMT (+ oni koji su primali terapiju i – oni koji nisu primali terapiju), pušački status (pušači i nepušači) i pol (muškarci i žene). A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin (nmol/mmol); M-n: muškarci nepušači; M-p: muškaci pušači; Ž-n: žene nepušači; Ž-p: žene pušači. * razlika u odnosu na pacijente koji nisu na terapiji; # razlika u odnosu na žene; & razlika u odnosu na pušače.

4.4.4. Uticaj DMT i progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS na biomarkere oksidativnog stresa

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA ispitan je uticaj terapije i progresije bolesti na nivo biomarkera OS i rezultati su prikazani u Tabeli 29. i Slici 26.

Statistički značaj imao je udruženi uticaj terapije i progresije bolesti na nivo biomarkera TAS ($p=0,039$; eta kvadrat= $0,047$) i indeksa OSI ($p=0,045$; eta kvadrat= $0,045$).

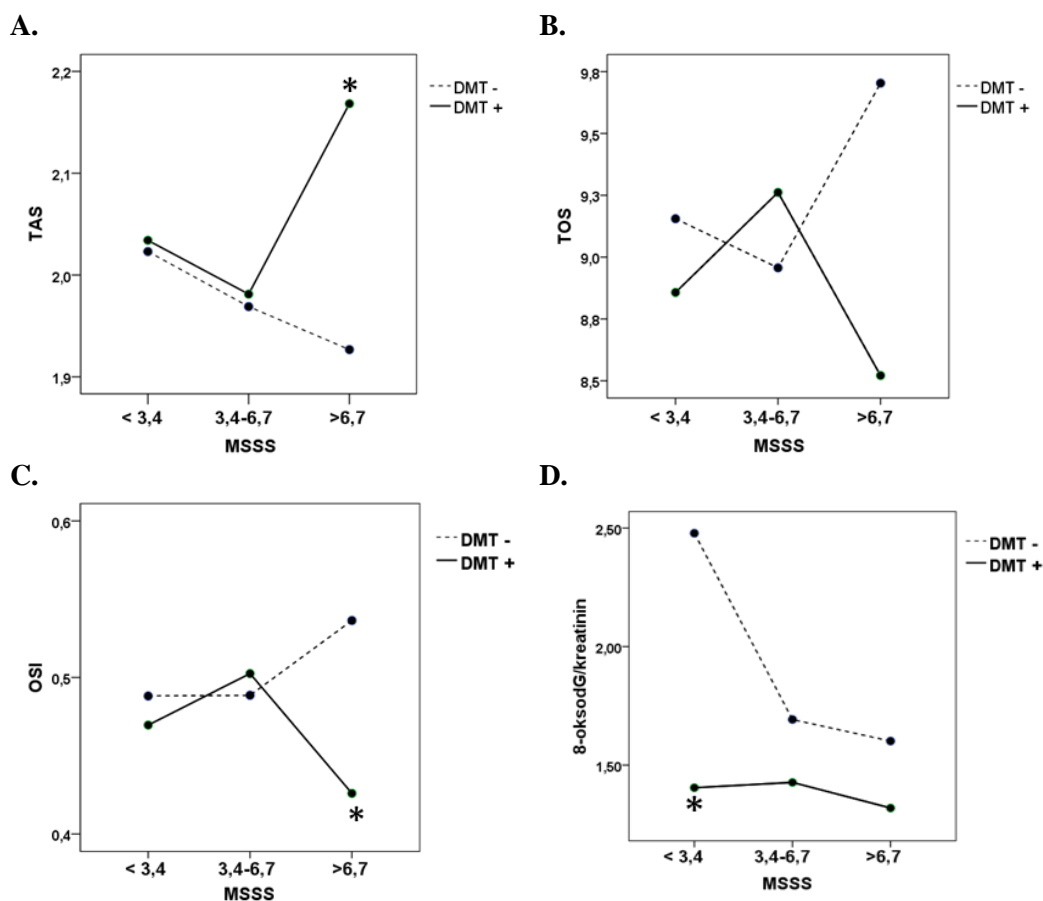
Kod pacijenata sa teškim oblikom MS ($MSSS>6,7$), pacijenti bez terapije su imali značajno niži nivo TAS i viši indeks OSI u odnosu na pacijente koji su bili na terapiji (TAS: $p=0,012$, eta kvadrat= $0,064$; OSI: $p=0,007$, eta kvadrat= $0,052$) (Tabela 29., Slika 26A. i Slika 26C.).

Pacijenti sa lakšim oblikom bolesti ($MSSS<3,4$) koji nisu primali terapiju, imali su značajno viši nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin u odnosu na pacijente koji su bili na terapiji ($p=0,001$; eta kvadrat= $0,089$) (Tabela 29., Slika 26D.).

Tabela 29. Uticaj DMT na biomarkere oksidativnog stresa kod MS-pacijenata u odnosu na progresiju bolesti procenjenu na osnovu MSSS

Biomarker	Udruženi uticaji terapije i progresije bolesti	P	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	terapija : MSSS	0,039	0,047
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS 3,4-6,7 i MSSS>6,7: terapija	0,012	0,064
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	terapija : MSSS	0,229	0,022
OSI (arbitrarne jedinice)	terapija : MSSS	0,045	0,045
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS >6,7: terapija	0,007	0,052
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	terapija : MSSS	0,128	0,036
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS < 3,4: terapija	0,001	0,089

TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin; Terapija: da ili ne; MSSS-*Multiple Sclerosis Severity Score*: MSSS< 3,4, MSSS 3,4-6,7, MSSS>6,7.



Slika 26. Procenjene srednje vrednosti za biomarkere oksidativnog stresa u odnosu na primenjenu DMT i težinu bolesti (prema MSSS skoru): A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin (nmol/mmol); * razlika u odnosu na pacijente bez terapije.

4.4.5. Uticaj DMT i progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS skora na biomarkere oksidativnog stresa u zavisnosti od pola

4.4.5.1. Uticaj DMT i progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS skora sa graničnom vrednošću od 3,4 na biomarkere oksidativnog stresa u zavisnosti od pola

Primenom testa tro-faktorska ANOVA analiziran je uticaj DMT (MS-pacijenti na terapiji i bez terapije), progresije bolesti (blaži oblik bolesti $\text{MSSS} < 3,4$ i srednji/teži oblik bolesti $\text{MSSS} > 3,4$) i pola na nivoe biomarkera oksidativnog stresa u grupi pacijenata obolelih od MS, a rezultati su prikazani u Tabeli 30. i Slici 27. Udruženi uticaj ovih faktora nije imao značaja na nivo TAS ($p=0,199$, eta kvadrat= $0,019$), ali primenom Sidak testa pokazano je da u grupi pacijenata bez terapije i sa težim oblikom bolesti ($\text{MSSS} > 3,4$) žene imaju značajno niži nivo TAS u odnosu na muškarce ($p=0,027$, eta kvadrat= $0,037$). (Tabela 30., Slika 27A.). Takođe je dobijen značajno niži TAS kod žena, nezavisno od progresije bolesti, u grupi pacijenata koji su primali DMT (za grupu sa $\text{MSSS} < 3,4$ $p=0,007$, eta kvadrat= $0,053$; za grupu sa $\text{MSSS} > 3,4$ $p=0,008$, eta kvadrat= $0,053$).

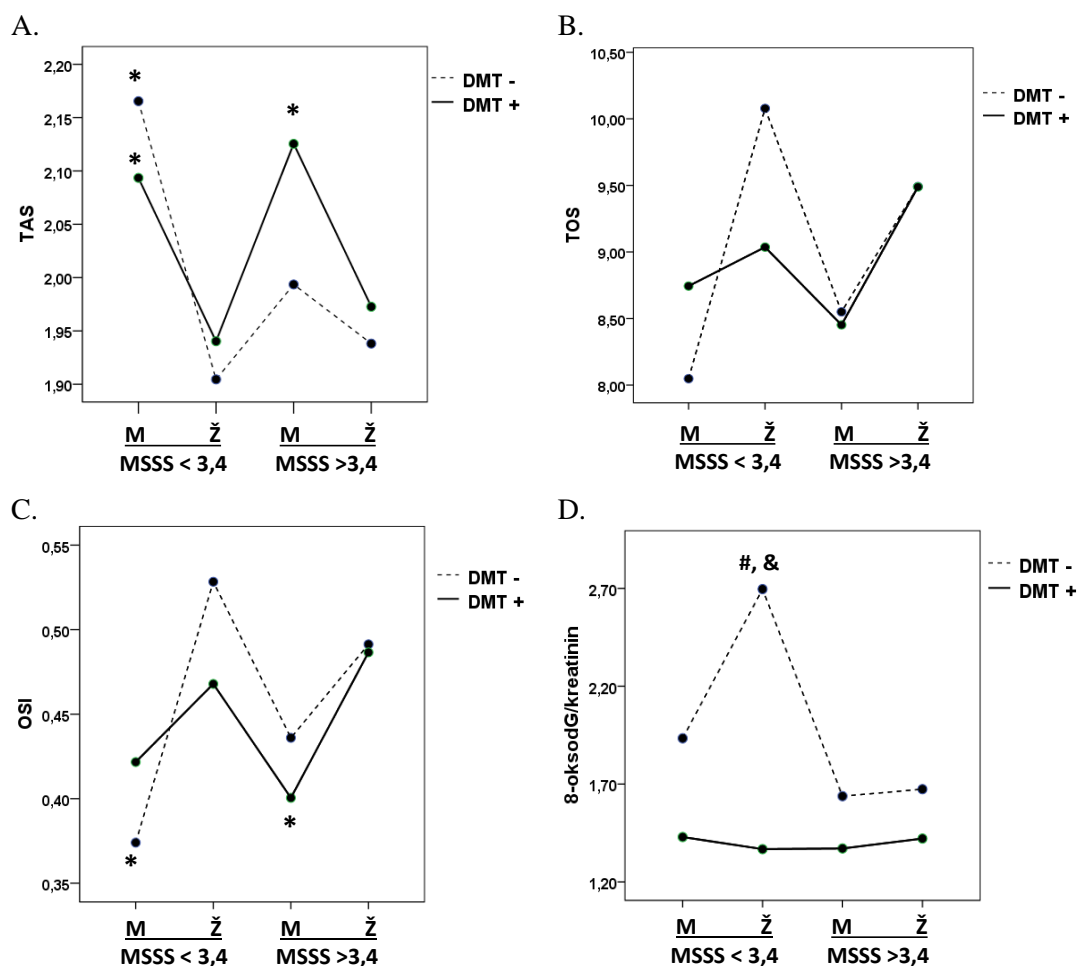
Primenom testa tro-faktorska ANOVA nije uočen značajan uticaj terapije, pola i progresije bolesti na nivo biomarkera TOS ($p=0,208$, eta kvadrat= $0,012$). Primenom Sidak testa zapaženo da među

pacijentima sa lakšim oblikom bolesti (MSSS<3,4) i koji nisu primali DMT, žene su imale značajno viši TOS u odnosu na muškarce (p=0,058, eta kvadrat=0,027) (Tabela 30., Slika 27B.). Značajno viši nivo TOS kod žena u odnosu na muškarce dobijen je u grupi pacijenata koji su primali DMT i imali su progresiju bolesti MSSS>3,4 (p=0,046, eta kvadrat=0,030). Primenom tro-faktorske ANOVE nije uočen značajan uticaj terapije, pola i progresije bolesti na nivo indeksa OSI, ali je verovatnoća bila na granici značajnosti (p=0,090, eta kvadrat=0,022). Primenom Sidak testa zapaženo da među pacijentima sa lakšim oblikom bolesti (MSSS<3,4) i koji nisu primali DMT, žene su imale viši nivo indeksa OSI u odnosu na muškarce (p=0,011, eta kvadrat=0,048) (Tabela 30., Slika 27C.). Takođe, žene su imale značajno viši indeks OSI u odnosu na muškarce u grupi pacijenata sa progresijom bolesti MSSS>3,4 (p=0,003, eta kvadrat=0,063) koji su primali DMT (Tabela 30., Slika 27C.). Na nivo 8-oksodG/kreatinina udružen uticaj pola, terapije i progresije bolesti nije imao značaj (p=0,326, eta kvadrat=0,009). Daljom primenom Sidak testa pokazano je da su žene sa lakšim oblikom bolesti (MSSS<3,4) koje su bile na DMT imale značajno niži nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na pacijentkinje bez terapije sa istom progresijom bolesti (p=0,001, eta kvadrat=0,089) (Tabela 30., Slika 27D.). Žene bez terapije i sa progresijom bolesti MSSS<3,4 su imale značajno viši nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na žene sa progresijom bolesti MSSS>3,4 (Tabela 30., Slika 27D.).

Tabela 30. Ispitivanje udruženog uticaja terapije, progresije bolesti (3,4<MSSS<3,4) i pola na biomarkere oksidativnog stresa kod MS-pacijenata

Biomarker	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	pol : terapija: MSSS	0,199	0,012
	Post hoc test po Sidak-u		
	bez terapije i MSSS>3,4: pol	0,027	0,037
	sa terapijom i MSSS<3,4: pol	0,007	0,053
TOS (µmol H ₂ O ₂ Equiv/L)	pol : terapija: MSSS	0,208	0,012
	Post hoc test po Sidak-u		
	bez terapije i MSSS<3,4: pol	0,058	0,027
	sa terapijom i MSSS>3,4: pol	0,046	0,030
OSI (arbitrarne jedinice)	pol : terapija: MSSS	0,090	0,022
	Post hoc test po Sidak-u		
	bez terapije i MSSS<3,4: pol	0,011	0,048
	sa terapijom i MSSS>3,4: pol	0,003	0,063
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	pol : terapija: MSSS	0,326	0,009
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS<3,4 i žene: terapija	0,001	0,089
	bez terapije i žene: MSSS	0,017	0,051

TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin; pol: muškarci ili žene; terapija: da ili ne; MSSS: *Multiple Sclerosis Severity Score*: MSSS< 3,4, MSSS>3,4.



Slika 27. Procenjene srednje vrednosti za biomarkere oksidativnog stresa u odnosu na primenjenu DMT, progresiju bolesti (MSSS< 3,4 i MSSS>3,4) i pol. A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status (μmol H₂O₂ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin (nmol/mmol); *razlika u odnosu na žene; # razlika u odnosu na pacijente na terapiji; & razlika u odnosu na MSSS>3,4.

4.4.5.2. Uticaj DMT i progresije bolesti procenjene na osnovu MSSS skora sa graničnom vrednošću od 6,7 na biomarkere oksidativnog stresa u zavisnosti od pola

Primenom testa tro-faktorska ANOVA analiziran je uticaj DMT (MS-pacijenti na terapiji i bez terapije), progresije bolesti (blaži i srednje teški oblik bolesti MSSS< 6,7 i teži oblik bolesti MSSS>6,7) i pola na nivoe biomarkera oksidativnog stresa u grupi pacijenata obolelih od MS, a rezultati su prikazani u Tabeli 31. i Slici 28. Udruženi uticaj ovih faktora nije uticao značajno na nivo TAS ($p=0,571$, eta kvadrat=0,02). Primenom Sidak testa pokazano je da u grupi pacijentkinja sa težim oblikom bolesti (MSSS>6,7), nivo biomarkera TAS je bio značajno niži kod pacijentkinja koje nisu primale terapiju u odnosu na žene koje su primale terapiju ($p=0,012$, eta kvadrat=0,047) (Tabela 31., Slika 28A.). Takođe je dobijen značajno niži TAS kod žena u grupi pacijenata koji su primali DMT i imali su blaži i srednji oblik bolesti (MSSS<6,7) ($<0,001$, eta kvadrat=0,020).

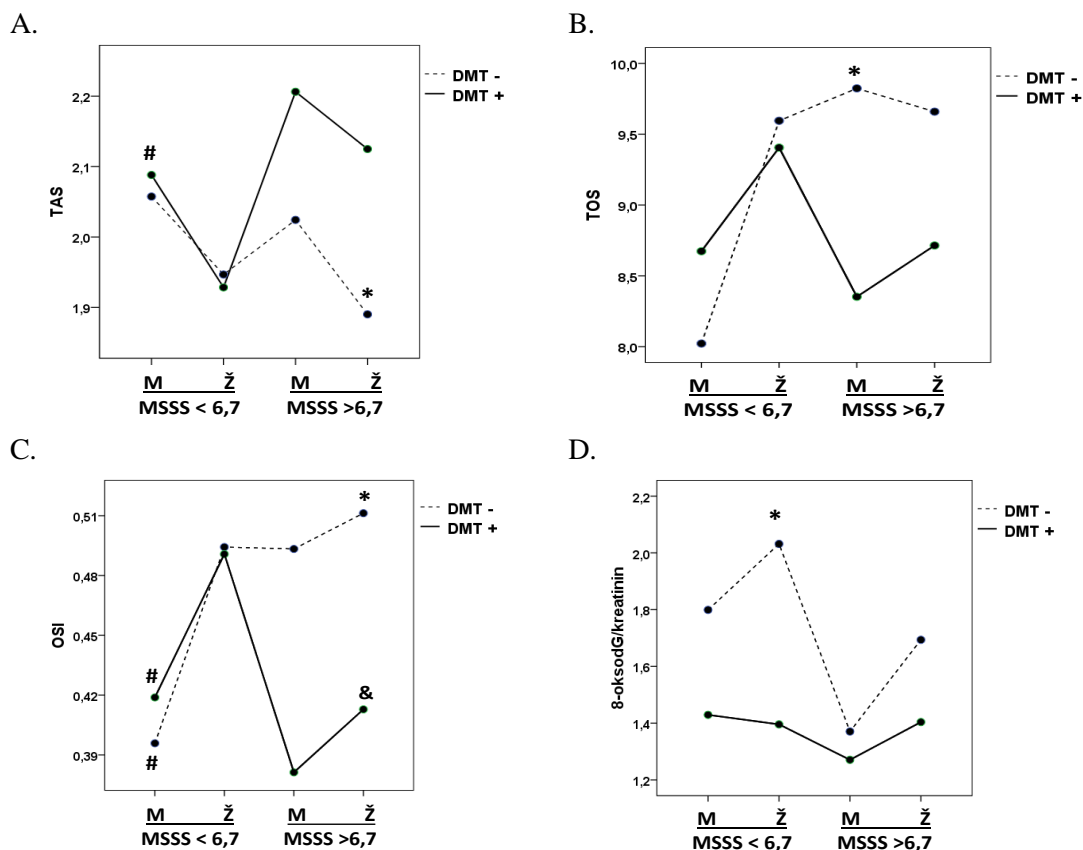
Primenom testa tro-faktorska ANOVA nije uočen značajan uticaj terapije, pola i progresije bolesti na nivo biomarkera TOS ($p=0,412$, eta kvadrat=0,005). Primenom Sidak testa zapaženo je da među pacijentima sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti (MSSS<6,7) i koji su primali DMT, žene su

imale značajno viši TOS u odnosu na muškarce ($p=0,014$, eta kvadrat= $0,045$) (Tabela 31., Slika 28B.). Primenom tro-faktorske ANOVE nije uočen značajan uticaj terapije, pola i progresije bolesti na nivo indeksa OSI ($p=0,663$, eta kvadrat= $0,001$). Primenom Sidak testa zapaženo je da među pacijentima sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti ($MSSS < 6,7$), nezavisno od terapije, žene su imale viši nivo indeksa OSI u odnosu na muškarce (za grupu koja je primala terapiju: $p=0,001$, eta kvadrat= $0,078$; za grupu koja nije primala terapiju: $p=0,006$, eta kvadrat= $0,057$) (Tabela 31., Slika 28C.). Takođe, u grupi pacijentkinja koje su primale terapiju, žene sa $MSSS > 6,7$ su imale značajno viši indeks OSI u odnosu na žene sa $MSSS < 6,7$ ($p=0,052$, eta kvadrat= $0,028$) (Tabela 31., Slika 28C.). U grupi pacijentkinja na terapiji, koje su imale $MSSS > 6,7$, nivo indeksa OSI je bio niži u odnosu na pacijentkinje bez terapije ($p=0,051$, eta kvadrat= $0,028$) (Tabela 31., Slika 28C.). Na nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin udružen uticaj pola, terapije i progresije bolesti nije imao značaj ($p=0,938$, eta kvadrat= 0). Daljom primenom Sidak testa pokazano je da su žene sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti ($MSSS < 6,7$) koje su bile na DMT imale značajno niži nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na pacijentkinje bez terapije sa istom progresijom bolesti ($p=0,016$, eta kvadrat= $0,052$) (Tabela 31., Slika 28D.).

Tabela 31. Ispitivanje udruženih uticaja terapije, progresije bolesti ($6,7 < MSSS < 6,7$) i pola na biomarkere oksidativnog stresa kod MS-pacijenata

Biomarker	Udruženi uticaji faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	pol : terapija: MSSS	0,571	0,002
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS < 6,7 i primljena terapija: pol	<0,001	0,020
	žene i MSSS > 6,7: terapija	0,017	0,042
TOS (μ mol H ₂ O ₂ Equiv/L)	pol : terapija: MSSS	0,412	0,005
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS < 6,7 i bez terapije: pol	0,014	0,045
OSI (arbitrarne jedinice)	pol : terapija: MSSS	0,663	0,001
	Post hoc test po Sidak-u		
	MSSS < 6,7 i bez terapije: pol	0,006	0,057
	MSSS < 6,7 i primljena terapija: pol	0,001	0,078
	žene i primljena terapija: MSSS	0,052	0,028
	žene i MSSS > 6,7: terapija	0,051	0,028
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	pol : terapija: MSSS	0,938	0
	Post hoc test po Sidak-u		
	Žene i MSSS < 6,7: terapija	0,016	0,052

TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin; pol: muškarci ili žene; terapija: da ili ne; MSSS: *Multiple Sclerosis Severity Score*: MSSS < 6,7, MSSS > 6,7.



Slika 28. Procenjene srednje vrednosti za biomarkere oksidativnog stresa u odnosu na primenjenu DMT, progresiju bolesti (MSSS < 6,7 i MSSS > 6,7) i pol: A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin (nmol/mmol); *razlika u odnosu na pacijente koji su primali DMT; #razlika u odnosu na žene; &razlika u odnosu na MSSS < 6,7.

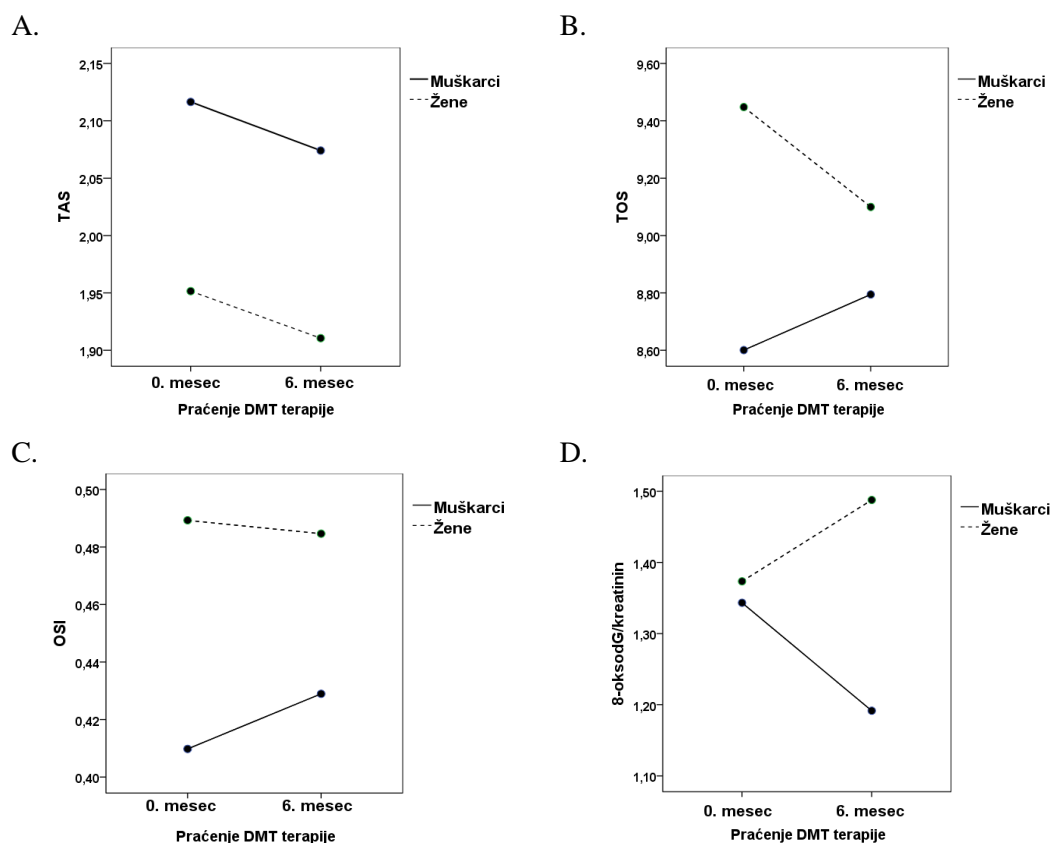
4.4.6. Uticaj šestomesečne DMT terapije i pola na biomarkere oksidativnog stresa

Testom dvo-faktorska ANOVA ponovljenog merenja (Repeated Measures analysis) ispitan je uticaj DMT (Betaferon®, n=20); Rebif®, n=15; Copaxone®, n=10; S1PR modulatori, n=66) na biomarkere oksidativnog stresa (TAS, TOS, OSI i 8-oksodG/kreatinin) nakon šest meseci terapije, u zavisnosti od pola. Nije utvrđen udruženi uticaj pola i šestomesečne terapije na biomarkere oksidativnog stresa (Tabela 32., Slika 29.).

Tabela 32. Uticaj DMT i pola na biomarkere oksidativnog stresa nakon šestomesečnog praćenja (vreme)

Faktor	TAS		TOS		OSI		8-oksodG/kreatinin	
	p	Eta kvadrat	p	Eta kvadrat	p	Eta kvadrat	p	Eta kvadrat
Vreme	0,101	0,031	0,689	0,002	0,573	0,004	0,880	0
Vreme*pol	0,978	0	0,151	0,023	0,355	0,010	0,284	0,015

TAS: ukupni antioksidativni status; B. TOS: ukupni oksidativni status; C. OSI: oksidativni indeks; D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin.



Slika 29. Procenjene srednje vrednosti za biomarkere oksidativnog stresa kod MS pacijenata koji su primali DMT u odnosu na pol nakon šestomesečnog praćenja. A. TAS: ukupni antioksidativni status (mmol Trolox Equiv/L); B. TOS: ukupni oksidativni status (μmol H₂O₂ Equiv/L); C. OSI: oksidativni indeks (arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin/kreatinin (nmol/mmol).

4.4.7. Uticaj određenog DMT leka kod MS-pacijenata na biomarkere oksidativnog stresa

Analiziran je efekat četiri vrste DMT lekova (Betaferon[®], n=20; Rebif[®], n=15; Copaxone[®], n=10; S1PR modulatori, n=66) na biomarkere oksidativnog stresa, nakon perioda od šest meseci. Primenom t-testa parova nije utvrđena statistički značajna promena biomarkera oksidativnog stresa u odnosu na lek koji su pacijenti primali (Tabela 33.).

Takođe, analiziran je uticaj ovih lekova na biomarkere oksidativnog stresa, nakon uklanjanja uticaja vrednosti koje su dobijene kod pacijenata pre uključivanja terapije, primenom testa jednofaktorska analiza kovarijanse (one-way ANCOVA) (Tabela 34. i Slika 30.). Zavisna promenljiva je bila vrednost biomarkera oksidativnog stresa dobijena nakon šestog meseca praćenja, nezavisna promenljiva je bila vrsta leka, a kovarijabla je bila vrednost biomarkera na početku praćenja. Iako je dobijena značajna razlika parametara TAS, TOS i OSI nakon šestomesečne DMT terapije (p<0,001; p<0,001; p<0,001, redom) nije otkrivena razlika u nivoima ovih parametara u odnosu na primenjen lek (Tabela 34.)

Tabela 33. Uticaj četiri vrste DMT lekova (Betaferon[®], Rebif[®], Copaxone[®], S1PR modulatori) na biomarkere oksidativnog stresa nakon šest meseci terapije kod MS-pacijenata

Parametar	Lek	0. mesec ($\bar{x} \pm SE$)	6.mesec ($\bar{x} \pm SE$)	P*
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	Betaferon	2,05 ± 0,04	2,03 ± 0,04	0,631
	Rebif	2,10 ± 0,07	1,99 ± 0,06	0,174
	Copaxone	2,11 ± 0,07	2,02 ± 0,07	0,296
	Mod.S1P-R	2,00 ± 0,03	1,98 ± 0,04	0,519
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	Betaferon	9,03 ± 0,37	9,21 ± 0,41	0,443
	Rebif	8,75 ± 0,35	9,50 ± 0,41	0,220
	Copaxone	9,74 ± 0,52	9,67 ± 0,52	0,944
	Mod.S1P-R	8,93 ± 0,25	8,60 ± 0,22	0,195
OSI (arbitrarne jedinice)	Betaferon	0,44 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,370
	Rebif	0,42 ± 0,03	0,49 ± 0,03	0,115
	Copaxone	0,46 ± 0,03	0,48 ± 0,05	0,749
	Mod.S1P-R	0,45 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,596
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	Betaferon	1,30 ± 0,01	1,54 ± 0,21	0,383
	Rebif	0,91 ± 0,25	0,98 ± 0,37	0,901
	Copaxone	1,11 ± 0,19	0,95 ± 0,19	0,483
	Mod.S1P-R	1,48 ± 0,12	1,36 ± 0,15	0,481

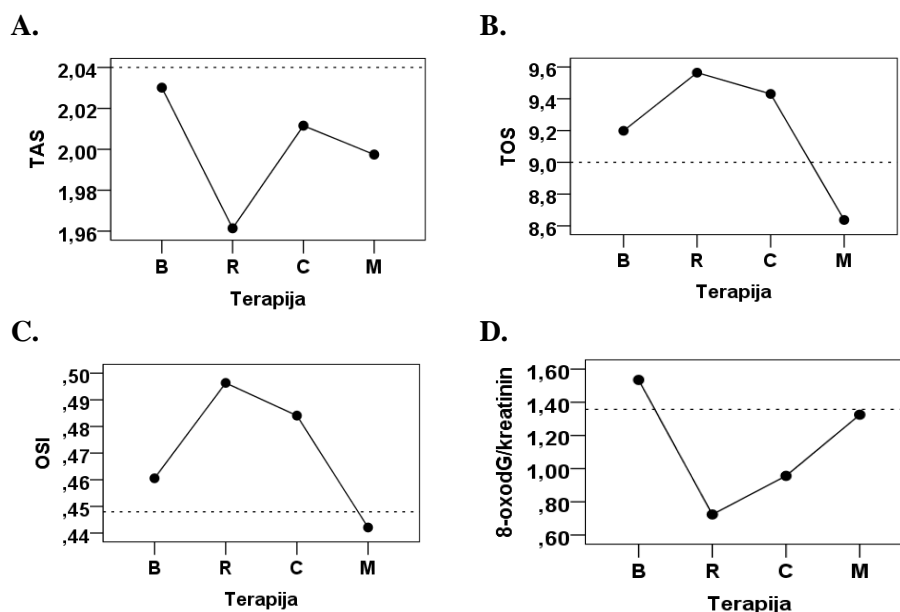
*razlike srednjih vrednosti između 0. i 6. meseca analizirane t-testom parova; rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; Mod S1PR: modulatori S1P receptora.

Tabela 34. Uticaj četiri vrste DMT lekova (Betaferon[®], Rebif[®], Copaxone[®], S1PR modulatori) na biomarkere oksidativnog stresa nakon šest meseci terapije kod MS-pacijenata kada je uklonjen uticaj vrednosti biomarkera oksidativnog stresa pre uključivanja terapije

Biomarker	Lek	6.mesec _{Adj.} ($\bar{x} \pm SE$)	P*	Eta kvadrat*	P**	Eta kvadrat**
TAS (mmol Trolox Equiv/L)	Betaferon	2,03 ± 0,05	0,829	0,011	<0,001	0,205
	Rebif	1,96 ± 0,06				
	Copaxone	2,01 ± 0,07				
	Mod.S1P-R	1,99 ± 0,03				
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L)	Betaferon	9,19 ± 0,38	0,211	0,053	<0,001	0,192
	Rebif	9,56 ± 0,85				
	Copaxone	9,43 ± 0,58				
	Mod.S1P-R	8,64 ± 0,22				
OSI (arbitrarne jedinice)	Betaferon	0,46 ± 0,03	0,471	0,030	<0,001	0,158
	Rebif	0,49 ± 0,03				
	Copaxone	0,48 ± 0,04				
	Mod.S1P-R	0,44 ± 0,02				
8-oksodG/kreatinin (nmol/mmol)	Betaferon	1,53 ± 0,22	0,481	0,033	0,236	0,019
	Rebif	0,72 ± 0,48				
	Copaxone	0,95 ± 0,36				
	Mod.S1P-R	1,32 ± 1,40				

TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin:8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; 6.mesec_{Adj.}:procenjene srednje vrednosti u 6. mesecu kada je uklonjen uticaj vrednosti koje su dobijene 0. mesecu; rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; *uticaj lekova na razlike srednjih vrednosti biomarkera oksidativnog stresa između 0. i 6. meseca kada je uklonjen uticaj početnog merenja; **promene biomarkera oksidativnog stresa između 0. i 6. meseca kada je uklonjen uticaj početnog merenja.

Iako nisu dobijene statistički značajne razlike u promenama biomarkera oksidativnog stresa nakon šestomesečne terapije DMT lekovima može se uočiti najveći pad vrednosti TAS (Slika 30.A.) i porast indeksa OSI (Slika 30.C.) kod pacijenata koji su primali lek Rebif® u odnosu na pacijente koji su primali druge lekove. Terapija istim lekom Rebif®, kao i terapija lekom Copaxone®, je bila povezana sa najvećim padom nivoa 8-oksodG/kreatinina (Slika 30D.). Izvestan pad indeksa OSI nakon šest meseci, bio je kod pacijenata koji su lečeni modulatorima S1P-R (Slika 30C.), a izvestan porast 8-oksodG/kreatinina je zapažen kod terapije Betaferonom®. Skoro nepromenjen nivo 8-oksodG/kreatinina se uočava kod terapije modulatorima S1P-R (Slika 30D.).



Slika 30. Srednje vrednosti biomarkera oksidativnog stresa nakon šestomesečne primene terapije (B: Betaferon, R: Rebif, C: Copaxone, M: modulatori S1P receptora) nakon uklanjanja uticaja početne vrednosti (isprekidana linija-procenjena srednja vrednost kovarijata): A. TAS (kovarijata: 2,04 mmol Trolox Equiv/L); B. TOS (kovarijata: 9,0 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L); C. (kovarijata: 0,45 arbitrarne jedinice); D. 8-oksodG/kreatinin (kovarijata: 1,35 nmol/mmol); TAS: ukupni antioksidativni status; TOS: ukupni oksidativni status; OSI: oksidativni indeks; 8-oksodG/kreatinin: 8-oksodG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin

4.4.8. Uticaj DMT terapije na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod pacijenata sa multiplom sklerozom

4.4.8.1. Uticaj šestomesečne DMT na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, metabolita triptofana (kinureninske kiseline i hinolinske kiseline) i indeksa hinolinska/kinureninska kiselina kod MS pacijenata u zavisnosti od pola

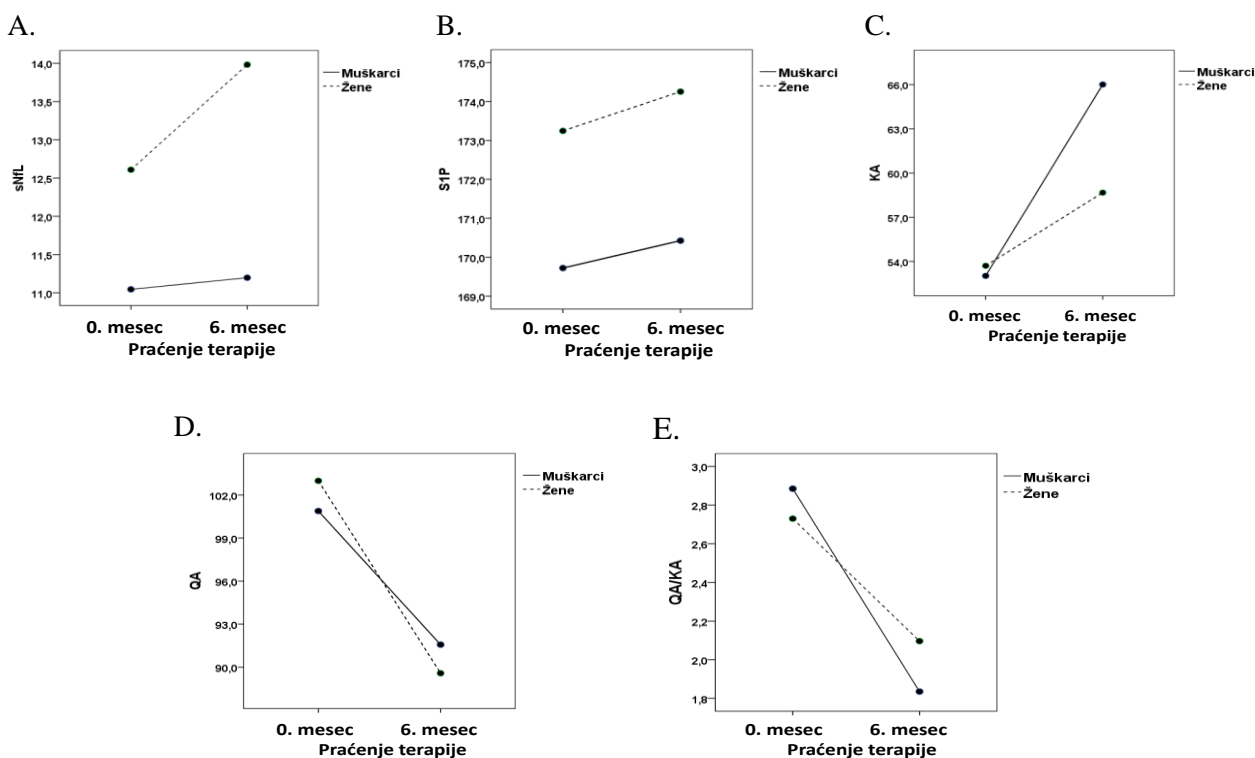
Primenom statističkog testa ponovljenog merenja (Repeated Measures analyses) ispitan je uticaj DMT nakon šest meseci primene na biomarkere: serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL), sfingozin-1-fostata (S1P), kinureninske kiseline (KA), hinolinske kiseline (QA) i indeksa hinolinska / kinureninska kiselina (QA/KA) u zavisnosti od pola (Tabela 35., Slika 31.).

Utvrđena je polna razlika na efekat DMT na promenu nivo biomarkera sNfL i kao što pokazuje grafik na Slici 31. Kod žena je nakon šestomesečne terapije došlo do porasta ovog biomarkera, dok je kod muškaraca promena bila neznatna. Iako nije dokazan uticaj DMT nakon šestomesečnog praćenja na ostale ispitivane biomarkere, na Slikama 31. C i D, primećuje se kod oba pola porast kinureninske kiseline i pad nivoa hinolinske kiseline.

Tabela 35. Uticaj DMT i pola na nivoe kinureninske kiseline, hinolinske kiseline i indeksa hinolinska/kinureninska kiselina kod MS pacijenata nakon šestomesečnog praćenja (vreme)

Faktor	sNfL		S1P		KA		QA		QA/KA	
	p	Eta kvadrat	p	Eta kvadrat	p	Eta kvadrat	p	Eta kvadrat	p	Eta kvadrat
Vreme	0,020	0,068	0,867	0	0,235	0,037	0,121	0,062	0,161	0,051
Vreme* pol	0,062	0,045	0,976	0	0,592	0,008	0,776	0,002	0,726	0,003

sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1 fosfat; KA: kinureninska kiselina, QA: hinolinska kiselina MSSS: multiple sclerosis severity score, MSSS<6.7 ili MSSS>6,7



Slika 31. Procenjene srednje vrednosti biomarkera nakon šestomesečnog praćenja DMT terapije u zavisnosti od pola. A. Serumski laki lanaci neurofilamenata (sNfL, pg/ml); B. Sfingozin-1-fosfat (S1P, ng/mL); C. Kinureninska kiselina (KA, ng/mL); D. Hinolinska kiselina (QA, ng/mL); E. Indeks QA/KA

4.4.8.2. Uticaj određenog DMT leka kod MS-pacijenata na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, kinureninske kiseline, hinolinske kiseline i indeksa hinolinska/kinureninska kiselina kod MS-pacijenata nakon šestomesečnog praćenja

Analiziran je efekat četiri vrste DMT lekova (Betaferon[®], n=20; Rebif[®], n=15; Copaxone[®], n=10; S1PR modulatori, n=66) na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL), sfingozin-1-fostata (S1P),

kinureninske kiseline (KA), hinolinske kiseline (QA) i indeksa hinolinska / kinureninska kiselina (QA/KA), nakon perioda od šest meseci. Rezultati su prikazani u Tabeli 36. Ova analiza je urađena pomoću t-testa parova. Takođe, analiziran je uticaj ovih lekova na biomarkere sNfL, S1P, KA, QA i QA/KA nakon uklanjanja uticaja vrednosti koje su dobijene kod pacijenata pre uključivanja terapije. Za ovu analizu korišćen je test jedno-faktorska analiza kovarijanse (one-way ANCOVA) i rezultati su prikazani u Tabeli 37. i Slici 32.

Primenom t-testa parova utvrđeno je da terapija lekom Copaxone[®], nakon šest meseci dovodi do značajnog porasta kinureninske kiseline (p=0,048), do značajnog porasta S1P (p=0,025) i opadanja indeksa QA/KA (p=0,006) i (Tabela 36.).

Primenom testa jedno-faktorska analiza kovarijanse (one-way ANCOVA) dobijen je statistički značajan pad indeksa QA/KA nakon šestomesečnog praćenja DMT terapije (p= 0,032) (Tabela. 37.). Takođe, utvrđena je statistički značajna razlika između četiri leka koji su ispoljili pad vrednosti indeksa QA/KA (p=0,010) (Tabela 37.)

Tabela 36. Uticaj četiri vrste DMT lekova (Betaferon[®], Rebif[®], Copaxone[®], S1PR modulatori) na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, kinureninske kiseline, hinolinske kiseline i indeksa hinolinska / kinureninska kiselina kod MS-pacijenata nakon šestomesečnog praćenja

Biomarker	Lek	0. mesec ($\bar{x} \pm SE$)	6. mesec ($\bar{x} \pm SE$)	P*
sNfL (pg/ml)	Betaferon	9,9 ± 0,16	10,5 ± 0,48	0,265
	Rebif	10,2 ± 0,30	11,4 ± 0,66	0,079
	Copaxone	10,5 ± 0,45	11,3 ± 0,68	0,282
	Mod. S1P-R	13,2 ± 1,68	13,9 ± 3,34	0,224
S1P (ng/ml)	Betaferon	162,3 ± 9,61	161,8 ± 5,96	0,966
	Rebif	170,9 ± 7,58	166,6 ± 7,04	0,562
	Copaxone	145,6 ± 9,23	168,8 ± 7,69	0,025
	Mod.S1P-R	181,3 ± 44,43	178,7 ± 45,95	0,742
KA (ng/ml)	Betaferon	46,8 ± 7,33	55,8 ± 9,18	0,559
	Rebif	66,4 ± 30,95	40,2 ± 9,77	0,585
	Copaxone	39,8 ± 6,31	80,9 ± 13,92	0,048
	Mod.S1P-R	56,9 ± 25,53	64,2 ± 33,33	0,444
QA (ng/ml)	Betaferon	127,8 ± 20,47	118,2 ± 15,34	0,539
	Rebif	124,9 ± 51,86	110,3 ± 21,92	0,797
	Copaxone	101,1 ± 13,68	74,1 ± 13,65	0,173
	Mod.S1P-R	88,1 ± 33,70	78,7 ± 31,85	0,283
QA/KA	Betaferon	3,6 ± 0,8	2,4 ± 0,9	0,598
	Rebif	2,7 ± 1,3	3,6 ± 1,7	0,790
	Copaxone	2,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,006
	Mod.S1P-R	2,5 ± 0,6	1,6 ± 0,2	0,252

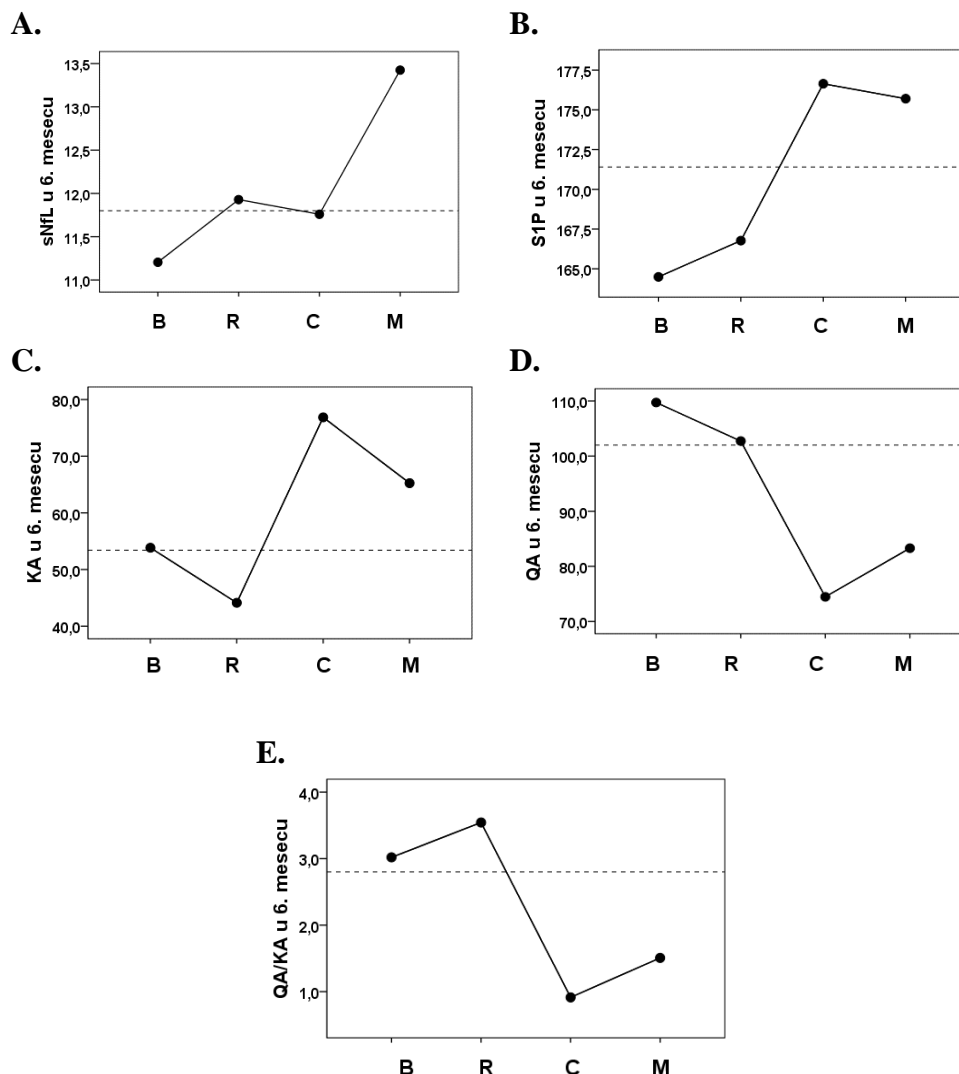
Rezultati u tabeli su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna greška; * razlike srednjih vrednosti između 0. i 6. meseca praćenja analizirane t-testom parova; sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1 fosfat; KA: kinureninska kiselina, QA: hinolinska kiselina; Mod S1PR: modulatori S1P receptora.

Tabela 37. Uticaj četiri vrste DMT lekova (Betaferon[®], Rebif[®], Copaxone[®], S1PR modulatori) na nivoe serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fostata, kinureninske kiseline, hinolinske kiseline i indeksa hinolinska / kinureninska kiselina kod MS-pacijenata nakon šestomesečnog praćenja kada je uklonjen uticaj vrednosti pre uključivanja terapije

Biomarker	Lek	6. mesec_{Adj.} ($\bar{x} \pm SE$)	P*	Eta kvadrat*	P**	Eta kvadrat**
sNfL (pg/mL)	Betaferon	11,2 ± 0,83	0,256	0,054	< 0,001	0,030
	Rebif	11,9 ± 0,86				
	Copaxone	11,8 ± 0,94				
	Mod.S1P-R	13,4 ± 0,55				
S1P (ng/mL)	Betaferon	161,7 ± 9,28	0,682	0,020	0,005	0,101
	Rebif	166,6 ± 10,32				
	Copaxone	168,8 ± 11,93				
	Mod.S1P-R	178,7 ± 5,66				
KA (ng/mL)	Betaferon	56,8 ± 9,73	0,414	0,077	0,082	0,067
	Rebif	40,1 ± 17,96				
	Copaxone	80,9 ± 15,47				
	Mod.S1P-R	64,2 ± 6,39				
QA (ng/mL)	Betaferon	118,2 ± 11,09	0,194	0,124	0,008	0,181
	Rebif	110,3 ± 19,66				
	Copaxone	74,1 ± 16,88				
	Mod.S1P-R	76,7 ± 7,22				
QA/KA	Betaferon	2,9 ± 0,6	0,010	0,273	0,032	0,126
	Rebif	3,6 ± 1,7				
	Copaxone	0,9 ± 0,2				
	Mod.S1P-R	1,6 ± 0,2				

sNfL: serumski laki lanci neurofilamenta; S1P: sfingozin-1 fosfat; KA: kinureninska kiselina, QA: hinolinska kiselina; 6.mesec_{Adj.}: procenjene srednje vrednosti u 6. mesecu kada je uklonjen uticaj vrednosti koje su dobijene u 0. mesecu; rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška; *uticaj lekova na razlike biomarkera između 0. i 6. meseca kada je uklonjen uticaj početnog merenja; **promene biomarkera između 0. i 6. meseca kada je uklonjen uticaj početnog merenja. Mod S1PR: modulatori S1P receptora

Iako nisu dobijene statistički značajne razlike u promenama biomarkera nakon šestomesečne terapije između ispitivanih lekova, nakon uklanjanja uticaja početne vrednosti pre uključivanja terapije, na Slici 32A-E može se uočiti sledeće: najveći porast sNfL je bio kod pacijenata na terapiji modulatorima S1P receptora (Slika 32A.); najveći pad indeksa QA/KA je bio kod pacijenata koji su primali lekove Copaxone i modulare sfingozin-1-fosfat receptora.

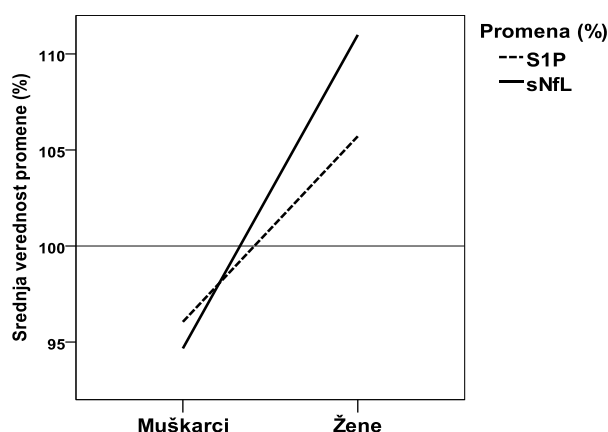


Slika 32. Srednje vrednosti biomarkera nakon šestomesečne primene terapije (B: Betaferon, R: Rebif, C: Copaxone, M: modulatori S1P receptora) nakon uklanjanja uticaja početne vrednosti (isprekidana linija-procenjena srednja vrednost kovarijate): A. Serumski laki lanci neurofilamenta (sNfL, kovarijata: 11,80 pg/mL); B. Sfingozin-1 fosfat (S1P, kovarijata: 171,43 ng/mL); C. Kinureninska kiselina (KA, kovarijata: 53,39 ng/mL); D. Hinolinska kiselina (QA, kovarijata: 102,04 ng/mL). E. QA/KA indeks (kovarijata 2,8)

4.4.8.3. Povezanost između endogenog sfingozin-1-fosfata, serumskih lakih lanaca neurofilamenata i terapije modulatorima S1P receptora u odnosu na pol

Primenom Mann-Whitney testa ispitan je uticaj pola na promene nivoa biomarkera sfingozin-1-fosfata (S1P) i serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL) kod pacijenata koji su primali modulare S1PR, pre i nakon perioda od šest meseci. Ovom analizom obuhvaćeno je 40 muškaraca i 38 žena. Promena biomarkera sNfL i S1P, nakon šestomesečne terapije modulatorima S1P receptora

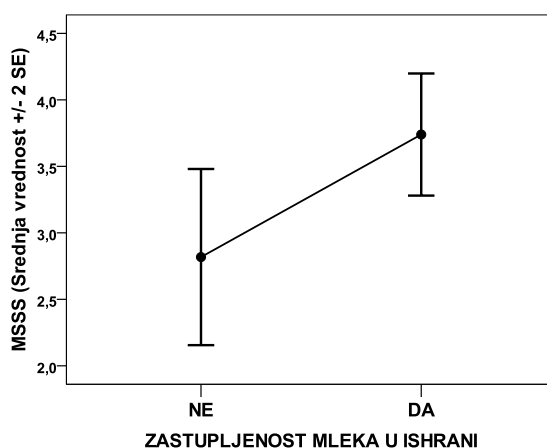
izračunata je na osnovu nivoa ovih biomarkera pre i posle uključivanja terapije: $(sNfL_{\text{posle}}/sNfL_{\text{pre}}) \times 100$ i $(S1P_{\text{posle}}/S1P_{\text{pre}}) \times 100$. Uočena je statistički značajna razlika u promeni sNfL, nakon šestomesečne terapije modulatorima S1PR ($p=0,055$). Kod žena se zapaža porast sNfL, dok je kod muškaraca zapažen pad ovog biomarkera (Slika 33.). Iako nije statistički dokazana značajna razlika promene biomarkera S1P, prema polu ($p=0,252$), na Slici 33. može se zapaziti da su kod oba pola dobijene iste promene za oba parametra. Tako je kod žena, nakon šestomesečne terapije modulatorima S1P receptora, zapažen porast S1P i sNfL, a kod muškaraca je promena bila suprotna, opadale su vrednosti za oba biomarkera, S1P i sNfL.



Slika 33. Srednje vrednosti promena biomarkera S1P i NfL nakon šestomesečne terapije modulatorima S1P receptora kod pacijenata sa MS prema polu (horizontalna linija označava izostanak promene)

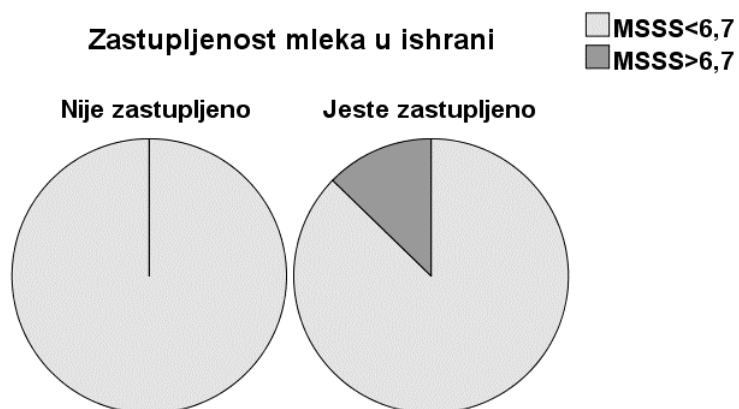
4.5. Povezanost između unosa mleka i težine MS kod pacijenata na DMT terapiji

Primenom student t-testa ispitana je povezanost unosa mleka na težinu bolesti (procenjeno preko MSSS skora) kod MS-pacijenata koji su primali DMT. Ispitivanjem je obuhvaćeno 93 pacijenta koji su konzumirali mleko i 9 pacijenata koji u svojoj ishrani nisu uopšte imali zastupljeno mleko. Pacijenti koji su u ishrani koristili mleko imali su značajno više vrednosti za MSSS skor u odnosu na pacijente koji nisu konzumirali mleko ($p=0,035$) (Slika 34.).



Slika 34. Procenjene vrednosti MSSS scora u odnosu na konzumiranje mleka

Primenom kaj kvadrat testa ispitana je razlika u učestalosti pacijenata koji konzumiraju ili ne konzumiraju mleko u odnosu na težinu bolesti (MSSS<6,7 i MSSS>6,7). Od 15 pacijenata koji su imali MSSS>6,7 svi su u ishrani imali zastupljeno mleko (100%), dok je u grupi pacijenata sa MSSS<6,7, od 87 pacijenata imalo zastupljenost mleka u ishrani 78 (84%) (Slika 35.). Analiza je pokazala trend pojave težeg oblika bolesti kod MS-pacijenata koji su konzumirali mleko u odnosu na MS-pacijente koji nisu u ishrani imali zastupljeno mleko, ali je verovatnoća bila na granici značajnosti (p=0,082).



Slika 35. Zastupljenosti mleka i ishrani kod MS pacijenata koji su primali DMT terapiju prema težini bolesti (MSSS<6,7 i MSSS>6,7)

5. DISKUSIJA

5.1. Oksidativni stres i multipla skleroza

5.1.1. Uticaj oksidativnog stresa procenjenog na osnovu biomarkera TAS, TOS i OSI na nastanak i razvoj multiple skleroze

Oksidativni stres (OS) je jedan od etioloških faktora u patofiziologiji multiple skleroze (MS) (154). Pošto funkcije centralnog nervnog sistema (CNS) zbog velike potrošnje kiseonika, zavise od efikasnosti mitohondrija, disfunkcija u radu ovih organela dovodi do prekomerne proizvodnje slobodnih radikala i nastanka OS koji je pokretač neurodegeneracije (87, 155). Istraživanja su pokazala da oksidativno oštećenje oligodendrocita i neurona, povezano sa inflamacijom, dovodi do neurodegeneracije (81). U aktivnim MS lezijama oligodendrociti pokazuju visok stepen oksidacije DNK, a oksidovani fosfolipidi koji se akumuliraju u aksonima dovode do poremećaja u prenosu impulsa (156).

Multipla skleroza je još uvek nedovoljno proučena bolest, a istraživanja su pokazala da bi mogući uzrok ove bolesti mogle biti anomalije, koje narušavaju vensku drenažu mozga i kičmene moždine, dovodeći do stanja hronične cerebrosposinalne venske insuficijencije (157). Kao posledica toga nastaje povećanje pritiska u venama mozga i kičmenoj moždini i dolazi do nakupljanja gvožđa u strukturama nervnog sistema i sekundarno do razvoja imunskog odgovora (157). Narušavanje BBB je jedan od najranijih događaja koji se primećuje kod MS, a igra značajnu ulogu u infiltraciji perifernih imunskih ćelija (158).

Jedan od ciljeva ove studije je bio da ispita ulogu OS procenjenog pomoću različitih biomarkera u nastanku i razvoju MS. Određivanjem biomarkera TOS i TAS (113, 114) dobija se uvid u redoks stanje organizma. Izračunavanjem indeksa OSI (115) može se proceniti da li je narušena ravnoteža između oksidanasa i antioksidativne zaštite, odnosno da li je došlo do razvoja oksidativnog stresa.

Rezultati naše studije su pokazali značajno viši nivo prooksidativnih biomarkera TOS i OSI u grupi svih MS-pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 6.). S obzirom da je indeks OSI pokazatelj prisustva OS kod MS-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, možemo zaključiti da su u našoj studiji pacijenti sa MS bili izloženi povišenom oksidativnom stresu, što je u saglasnosti sa rezultatima Kirbas i saradnika (159) i Acara i saradnika (160) koji su otkrili sniženje biomarkera TAS i više nivoa TOS i OSI kod MS-pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima. Smanjena antioksidativna zaštita i razvoj perifernog oksidativnog stresa kod MS-pacijenata je dokazana u nekoliko studija (161-163).

Pokazali smo da su u populaciji Srbije, MS-žene imale viši nivo biomarkera TOS i OSI u poređenju sa zdravim ženama što je pokazano u Tabelama 6. i 7. Takođe, naše istraživanje je pokazalo da su MS-muškarci imali značajno niži nivo antioksidativne zaštite u poređenju sa populacijom zdravih muškaraca (Tabela 6. i Slika 12A.). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa studijom Gironi i saradnika, koji su pokazali kod pacijenata sa MS povišeni nivo reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), uz sniženu antioksidativnu zaštitu kod žena u odnosu na muškarce (164). Osim toga, Zoccolella i saradnici (165) su u svom istraživanju dokazali nizak nivo antioksidativne zaštite (procenjen preko koncentracije

urata u serumu) uglavnom kod žena u ranoj fazi MS. Takođe, u populaciji Srbije, među zdravim ispitanicima, žene su imale niži nivo biomarkera TAS i viši indeks OSI u odnosu na muškarce (Tabela 6.).

U nekoliko studija i preglednih članaka (166-171) predstavljeni su mogući uzroci učestalije pojave MS kod žena. U ovim studijama ističu se hormonski, genetički i epigenetički faktori i njihove međusobne interakcije koje su uključene u nastanak bolesti. Takođe, studija Hewagama i saradnika (108) je pokazala diferencijalnu ekspresiju inflamatornih/citotoksičnih efektorskih molekula u restimulisanim T ćelijama koje mogu doprineti razlikama u autoimunskim bolestima između žena i muškaraca. S obzirom da rezultati naše studije ukazuju na veću osetljivost žena prema oksidativnom stresu u odnosu na muškarce, kao i da je oksidativni stres povezan sa inflamacijom, smatramo da ova polna razlika u osetljivosti prema oksidativnom stresu može doprineti rasvetljavanju uzroka veće prevalencije MS kod žena.

Primenom binarne logističke regresije u našem istraživanju, pokazali smo da je indeks OSI nezavisni prediktor nastanka multiple skleroze i da svaki porast indeksa OSI za jednu jedinicu je povezan sa 20 puta većim rizikom za nastanak MS [OR (95%CI) 20,12 (1, 82-222, 62)] (Tabela 14.). Ovaj rezultat bi mogao predstavljati potvrdu kliničkog značaja indeksa OSI u proceni rizika za nastanak multiple skleroze. Obzirom da smo pokazali da indeks OSI predstavlja dobar dijagnostički biomarker OS i da je povezan sa razvojem multiple skleroze, pogodna bi bila njegova klinička primena, posebno zbog toga što se ovaj biomarker dobija izračunavanjem parametara koji se mogu odrediti na biohemijskim analizatorima, jednostavnom metodom, uz prihvatljivu cenu reagenasa. Takođe, indeks OSI bi mogao biti klinički značajan biomarker u proceni efikasnosti terapije antioksidansima, s obzirom da je prepoznat značaj komplementarne terapije antioksidansima kod pacijenata sa multiplom sklerozom (102).

5.1.2. Uticaj sistemskih efekata oksidativnog stresa procenjenog na osnovu biomarkera 8-oksodG/kreatinin na nastanak i razvoj multiple skleroze

Akumulacija slobodnih radikala može dovesti do oksidativne modifikacije nukleobaza u molekuli DNK i stvaranja lezija koje bi mogle biti induktori mutageneze i kancerogeneze (119). Međutim, zaštita ćelija se postiže zahvaljujući reparacionim mehanizmima (eng. *Base excision repair-BER*) koga inicira enzim DNK glikozilaza koja prepoznaje i uklanja oštećenu bazu, ostavljajući abazično mesto koje se dalje obrađuje pomoću različitih proteina (172, 173). Koristan biomarker u proceni negativnih sistemskih efekata OS je 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oksodG) koji se može određivati u urinu (174). Pojava 8-oksodG u urinu je rezultat oksidativnog oštećenja DNK i intracelularnih reparacionih mehanizama koji isecaju ovu DNK leziju koja se izlučuje iz organizma urinom (122).

U našem istraživanju, povišen nivo urinarnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin kod MS-pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika (Tabela 6.) je u skladu sa rezultatima studije Tasseta i saradnika (161) koji su utvrdili viši nivo 8-oksodG u uzorcima plazme pacijenata sa RRMS u odnosu na kontrolnu grupu.

Dodatno, u našoj studiji smo pokazali primenom binarne logističke regresije, da je urinarni 8-oksodG/kreatinin nezavisni prediktor za nastanak MS. Ova analiza je pokazala da porast parametra

8-oksodG/kreatinin za jednu jedinicu, dvostruko povećava rizik za nastanak MS [OR (95%CI) 1,99 (1,35-2,92)] (Tabela 14.), što ukazuje na klinički značaj uvođenja ovog biomarkera za procenu rizika od MS, usled produženog sistemskog efekta oksidativnog stresa na organizam. Značaj našeg rezultata je u saglasnosti sa rezultatima patohistološkog nalaza koje su dobili Haider i saradnici (175) kod pacijenata sa multiplom sklerozom. Prethodno pomenuti autori su u svom istraživanju otkrili pozitivnu imunoreaktivnost 8-oksodG u oblastima sa dubokom aktivacijom mikroglije na ivici moždane lezije, na osnovu čega su zaključili da je oksidativno oštećenje oligodendrocita i neurona povezano sa aktivnom demijelinizacijom, oštećenjem aksona i neurona kod pacijenata sa MS. Takođe, povećanje prooksidativnog biomarkera 8-oksodG/kreatinin je pronađeno unutar hroničnih aktivnih plakova u poređenju sa regionima bele mase malog mozga kod pacijenata sa MS koji su patili od teških moždanih simptoma tokom bolesti (176).

Razmatrajući polne razlike, uočeno je povećanje nivoa urinarnog 8-oksodG/kreatinina kod MS-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu samo u populaciji žena, ali ne kod muškaraca (Tabela 6., Tabela 7., Slika 12D.). Takođe, u grupi zdravih ispitanika dobijeno je da su muškarci imali značajno viši nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na žene (Tabela 6.). Nasuprot ovom rezultatu, u studiji Topić i saradnika (177) sprovedenoj u zdravoj populaciji Srbije utvrđeno je da su žene imale viši nivo urinarnog 8-oksodG/kreatinina u poređenju sa muškarcima. Mogući razlog za dobijanje ovih kontradiktornih rezultata u istoj populaciji je starosna dob ispitanika. U ovoj studiji kontrolnu grupu zdravih ispitanika činile su osobe mlađe životne dobi i nije bilo značajne razlike u životnoj dobi između polova (muškarci $37,41 \pm 7,8$ godina i žene $36,62 \pm 9,2$ godina), dok je u studiji Topić i saradnika (177) populacija ispitanika bila nešto starija i žene su bile značajno starije od muškaraca (muškarci $43,1 \pm 8,9$ godina i žene $47,6 \pm 9,3$ godina). U studiji Topić i saradnika (177) dobijena je značajna pozitivna korelacija između nivoa 8-oksodG/kreatinina i godina, u celokupnoj populaciji ispitanika, a isti trend je dobijen i kod žena, ali je verovatnoća bila na granici značajnosti. Takođe, u studiji Gan i saradnika (178) izvedenoj u zdravoj populaciji Kineza, utvrđeno je da 8-oksodG u urinu može biti potencijalni biomarker za utvrđivanje fiziološke starosti i za otkrivanje rizika za pojavu bolesti povezanih sa starenjem. Naši rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem Hofer i saradnika (179) koji su ukazali na povećan nivo ovog biomarkera kod muškaraca u odnosu na žene kod zdravih osoba, mlađe životne dobi. Manji stepen oštećenja DNK kod mlađih žena, nego kod muškaraca bi se mogao objasniti studijama na životinjskim eksperimentalnim modelima, koje u pokazale uticaj estrogena na povećanje ekspresije gena koji kodiraju endogene antioksidanse (180, 181), sa posledično smanjenom produkcijom slobodnih radikala u mitohondrijama. U nedavnom preglednom članku Gorini i saradnika (182) istaknute su mutagene i epigenetičke uloge 8-oksodG preko kojih se može izazvati nestabilnost genoma i doprineti razvoju karcinoma. Takođe, uočeno je da je 8-oksodG najzastupljenija oksidativno modifikovana lezija DNK i značajno je njeno prepoznavanje i uklanjanje, jer nepotpuna i neefikasna popravka može dovesti do akumulacije oštećenja što uzrokuje nestabilnost genoma.

Imajući u vidu rezultate naše studije i navedenih literaturnih podataka, možemo zaključiti da iako je populacija muškaraca, mlađe životne dobi imala povišen 8-oksodG/kreatinin, ovaj biomarker sistemskog efekta oksidativnog stresa ukazuje na viši nivo oksidativnog stresa kod žena obolelih od multiple skleroze u odnosu na obolele muškarce. Ovaj rezultat može potencijalno doprineti otkrivanju jednog od uzroka dvostruko veće incidence pojave MS kod žena (3). Takođe, na osnovu rezultata naše studije, možemo pretpostaviti da bi klinički značaj urinarnog 8-oksodG bio u proceni rizika od

dugotrajne izloženosti oksidativnom stresu, što bi posledično moglo da dovede do razvoja multiple skleroze, posebno kod žena.

Određivanje koncentracije 8-oksodG u urinu, primenom HPLC/MS metode zahteva primenu skupe opreme, reagenasa, posebno obučeno osoblje za rad na aparatu i zbog toga nije primenljiva kao rutinska laboratorijska dijagnostika. Međutim, iako manje osetljive i specifične imunohemijske metode za merenje 8-oksodG u biološkim tečnostima, mogle bi da se primene u rutinskoj laboratorijskoj praksi, zbog jednostavnosti izvođenja. Prevencija razvoja OS, uvođenjem farmakološke antioksidativne terapije bi sprečila sistemsku oksidativnu modifikaciju nukleinskih kiselina i nastanak promotagenih DNK lezija što bi, takođe, moglo da se prati određivanjem 8-oksodG u urinu.

5.1.3. Povezanost oksidativnog stresa i pušačkog statusa sa nastankom multiple skleroze

Pušenje cigareta je jedan od etioloških faktora rizika koji je povezan sa pojavom MS (183). Ranija istraživanja su sugerisala da je rizik za nastanak MS povezan sa brojem popušanih cigareta u toku dana, tako da pušenje 20-40 cigareta dnevno predstavlja dvostruko veći rizik za razvoj MS u odnosu na nepušače (19, 184). Istraživanje uticaja pušačkog statusa na razvoj MS koje su sproveli Pekmezović i saradnici (185) u populaciji Srbije, pokazalo je da su pušači imali 2,4 puta veći rizik od pojave MS u poređenju sa nepušačima (OR=2,4, p=0,004). Takođe, studija sprovedena u Švedskoj je koristila parameter „*pack-year*“ za merenje izloženosti osobe pušenju duvana i prema tome sugerisala da pušenje od 10 „*pack-years*“ kao i dugotrajna pasivna izloženost duvanskom dimu (preko 20 godina) dovodi do tri puta većeg rizika od razvoja MS u poređenju sa nepušačima (186). Takođe, povećan rizik za razvoj OS uzrokovan smanjenjem antioksidanasa u plazmi kod pušača dokumentovan je brojnim studijama (187, 188).

U ovom istraživanju, zbog preciznijeg ispitivanja razvoja OS u odnosu na pušački status, svi ispitanici su podeljeni u četiri grupe: nepušači, aktivni pušači pasivni pušači i bivši pušači. Utvrđena je veća učestalost pasivnih i manja učestalost bivših pušača kod MS-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika (Tabela 8.). Samo kod žena, utvrđeno je da je prestanak pušenja zaštitni faktor od pojave MS [OR (95%CI) 0,29 (0,09-0,96)]. Razmatrajući uticaj pola i pasivnog pušenja rezultati pokazuju da muškarci imaju 10 puta veći rizik za nastanak MS [OR (95%CI) 10,53 (2,33-47,58)], dok je kod žena taj rizik 13 puta veći [OR (95%CI) 13,52 (4,53-40,33)] (Tabela 8.), u odnosu na druge grupe ispitanika, podeljenih prema pušačkom statusu. Osim toga, primenom binarne logističke regresije, utvrđeno je da pasivni pušači imaju 10 puta veći rizik za nastanak MS u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika [OR (95%CI) 10,83 (3,54-33,12)] (Tabela 14.). Takođe, istraživanja rađena devedesetih godina prošlog veka su pokazala da je relativni rizik (RR) za MS bio 1,8 puta veći kod žena-pušača nego kod žena-nepušača (189). Sundstrom i saradnici (20) su pokazali da je povišen nivo kotinina (metabolit nikotina), prisutan kod pasivnih pušača povezan sa povećanim rizikom za MS, pretežno kod žena, tako da su rezultati o povećanom riziku za MS kod pasivnih pušača u skladu sa ovom studijom. Kao neočekivan rezultat u našem istraživanju, dobijeno je da aktivno pušenje nije povezano sa povećanim rizikom za nastanak MS. S obzirom na način dobijanja podataka o pušačkom statusu putem upitnika, podatak o težini pušenja i pušačkom stažu nije bio dostupan za ovo istraživanje, što je možda uticalo na dobijanje neočekivanog rezultata.

Rezultati ove studije ukazuju da su među ženama-pušačima, pacijentkinje imale viši TOS u odnosu na zdrave žene (Slika 14B.), dok su među ženama-nepušačima, pacijentkinje imale viši indeks OSI u

odnosu na zdrave žene, sa sličnom tendencijom i u grupi žena pušača (Slika 14C.). Iz ovog se može zaključiti da je kod žena, bez obzira na pušački status, pojava MS povezana sa OS.

Takođe, rezultati ukazuju na povećanje koncentracije urinarnog 8-oksodG/kreatinina kod MS-pacijenata koji su bili aktivni, bivši i pasivni pušači u odnosu na zdrave ispitanike istog pušačkog statusa (Tabela 9, Slika 13.). Osim toga, pacijenti sa MS koji su bili bivši i pasivni pušači su imali viši nivo 8-oksodG od pacijenata sa MS koji su bili nepušači. Ovo ukazuje na to da sistemski efekti OS na DNK izazvane štetnim prooksidansima iz duvanskog dima mogu biti faktor rizika za pojavu MS.

Iako efekti pušačkog statusa na pojavu MS još uvek nisu potpuno razjašnjeni, smatra se da komponente duvanskog dima imaju potencijalno neurotoksično dejstvo i da dovode do demijelinizacije (185). Takođe, istraživači sugerišu da toksične supstance u duvanskom dimu, utiču na funkcije mozga i kičmene moždine i dovode do demijelinizacije i gubitka aksona (190). Štaviše, studija Emre i De Dekera (191) sprovedena devedesetih godina prošlog veka pokazala je da nikotin koji se brzo resorbuje, lako prolazi BBB i distribuira se po celom mozgu, dovodi do prolaznog pogoršanja motoričkih funkcija kod MS-pacijenata.

U našem istraživanju u grupi zdravih ispitanika nije primećen uticaj pušenja na nivo biomarkera 8-oksodG/kreatinin, što bi verovatno moglo biti objašnjeno adekvatnom antioksidativnom zaštitom i funkcionisanjem reparacionih mehanizama (192). Za razliku od našeg istraživanja, studija Mesaros i saradnika (127) utvrdila je u grupi zdravih ispitanika povećane nivoe 8-oksodG/kreatinina kod pušača i predložili ga kao koristan biomarker u proceni OS izazvanog pušenjem.

S obzirom da su brojne studije dokazale da izlaganje duvanskom dimu povećava rizik za nastanak OS (187, 188), i rezultati ovog ispitivanja ukazuju na opravdanost uvođenja urinarnog 8-oksodG/kreatinina u kliničku praksu kao značajnog biomarkera u proceni uticaja izlaganja duvanskom dimu na razvoj sistemskog OS povezanog sa nastankom i razvojem MS.

U daljem istraživanju uticaja OS na razvoj MS u odnosu na pušački status, ispitan je nivo biomarkera OS, ako se uključi i faktor progresije bolesti, MSSS skor (50). Pokazano je da su u grupi pacijenata sa težim oblikom bolesti (MSSS>6,7) muškarci-nepušači imali veći nivo antioksidativne zaštite u odnosu na muškarce-pušače i u odnosu na žene-pušače. Međutim, muškarci-pušači koji su imali teži oblik bolesti (MSSS>6,7) imali su niži OS (procenjen pomoću biomarkera TOS i OSI) u poređenju sa ženama (Tabela 11., Slika 15.). Kod pušača koji su imali MSSS>6,7, žene su bile ugroženije jer su imale veći TOS i OSI koji govori o stepenu OS.

Povećanje OS kod žena-pušača moglo bi biti posledica uticaja estradiola na ubrzanje metabolizma duvanskog dima i stvaranja slobodnih radikala koji dovode do OS (193). Sa druge strane, veći rizik za nastanak MS imaju žene kod kojih verovatno zbog sniženja koncentracije estradiola dolazi do povećane proizvodnje proinflamatornih citokina koji dovode do razvoja OS (194). Rezultati našeg istraživanja doprinose rasvetljavanju polnih razlika uticaja OS izazvanog duvanskim dimom na nastanak MS. Ovi rezultati potencijalno mogu doprineti rasvetljavanju polne razlike u prevalenci MS, koja pokazuje da su žene podložnije ovoj bolesti.

5.1.4. Povezanost oksidativnog stresa i izlaganja sunčevom zračenju sa nastankom multiple skleroze

Ranija istraživanja su sugerisala da ultraljubičasto B zračenje (UVB) koje potiče od sunca i vitamin D predstavljaju značajne zaštitne faktore u nastanku MS (195), tako da niska izloženost ovim zracima i nedostatak vitamina D povećava rizik od nastanka ove bolesti (196). Takođe, povećano izlaganje suncu u toku detinjstva i adolescencije povezani su sa smanjenim rizikom od razvoja MS (197-200). Međutim, u našoj studiji je primećeno da su MS-pacijenti, bez obzira na pol, bili više izloženi sunčevom zračenju nego kontrolna grupa ispitanika (Tabela 6.). Nedostatak podatka o izlaganju suncu pre pojave MS i to što se pacijentima savetuje da se više izlažu suncu može biti razlog dobijanja ovakvog rezultata. Osim toga, u kontrolnoj grupi ispitanika izloženoj suncu dobijena je veća antioksidativna zaštita (procenjena pomoću biomarkera TAS) u odnosu na zdrave ispitanike koji se nisu sunčali (Slika 16A.). Takođe, pacijenti koji se nisu sunčali imali su veće vrednosti TOS u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 16B.). Žene su nezavisno od izlaganja suncu više izložene prooksidansima i na slici 17A. vidi se tendencija nižeg nivoa TAS u odnosu na muškarce iako nije bilo statističke značajnosti. Međutim, među MS pacijentima koji su se izlagali suncu, žene su imale značajno viši nivo TOS u odnosu na muškarce (Slika 17B.). Iako nismo dobili statistički značajnu razliku kod indeksa OSI, na Slici 17C. uočava se ista tendencija porasta OSI kod žena sa MS u odnosu na muškarce sa MS, što je verovatno posledica razvoja OS. Bez obzira na izloženost suncu, na Slici 17D. može se videti povećani nivo 8-oksodG kod MS-žena u odnosu na zdrave žene, ali bez statističke značajnosti, što bi moglo biti posledica malog broja uzoraka u našem istraživanju. Ovaj rezultat ukazuje na to da izlaganje suncu čini žene obolele od MS pod većim rizikom za razvoj OS u odnosu na obolele muškarce. Prema našim saznanjima, u literaturi nije zabeležena polna razlika u osetljivosti prema OS kod pacijenata sa MS koji su izloženi sunčevom zračenju. Buduće istraživanje na većem broju uzoraka, sa preciznijim podacima o stepenu izloženosti suncu, uticaju UV indeksa, pre i nakon oboljevanja bi doprineli rasvetljavanju povezanosti uticaja sunčevog zračenja, razvoja OS i MS.

5.2. Povezanost polimorfizma gena za 8-oksoguanin DNK glikozilazu 1 (OGG1 rs1052133) sa nastankom multiple skleroze

Najvažniji enzim koji ima centralnu ulogu u regulaciji odgovora na OS i reparaciji oštećene DNK je 8-oksoguanin DNK glikozilaza 1 (OGG1). Ovaj enzim vrši prepoznavanje, isecanje i uklanjanje modifikovane nukleobaze 8-okso-7,8-dihidrogvanina (8-oksoG) i modifikovanog nukleozida 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oksodG) nakon oštećenja (117,118). OGG1 sprečava akumulaciju mutacija i učestvuje u regulaciji transkripcije gena uključenih u odgovoru na OS (128). Najčešće istražena genetička varijanta humanog OGG1 je rs1052133, koja predstavlja zamenu nukleotida citozina u guanin (C → G), što dovodi do zamene serina u cistein na poziciji 326 (Ser326Cys) (128). Prirodni („wild type”) alel je C (326Ser), mutirani je G alel (326Cys), a genotipovi OGG1 rs1052133 su C/C (Ser326Ser), G/G (Cys326Cys) i C/G (Ser326Cys). Prema dostupnim literaturnim podacima, u ovoj studiji je prvi put ispitana genetička varijanta OGG1 rs1052133 u populaciji Srbije, kao i povezanost ove genetičke varijante sa rizikom od nastanka MS. Pošto je OS jedan od patofizioloških mehanizama koji je odgovoran za nastanak i razvoj MS, ispitivanje genetičke varijante OGG1 rs1052133 bi moglo imati klinički značaj. S obzirom da 8-oksodG odražava ravnotežu između

oksidativnog oštećenja DNK i efikasnosti ćelijskih procesa reparacije, gde je aktivno uključen enzim OGG1 njegova genetička varijanta bi mogla imati potencijalni klinički značaj u proceni rizika od nastanka i progresije MS.

Dosadašnja istraživanja povezanosti genetičke varijante OGG1 rs1052133 su se uglavnom odnosila na rizik od pojave karcinoma mokraćne bešike, gastrointestinalnog trakta, jednjaka, prostate i pluća (201-205). Kang i saradnici (206) su primenom meta analize utvrdili da su nosioci G alela (Ser326Cys) imali veći rizik od nastanka različitih vrsta karcinoma nego nosioci C alela. Šta više, studija Corella i saradnika (207) je dokumentovala veći kardiovaskularni mortalitet kod OGG1 genotipa GG u odnosu na mortalitet od malignih bolesti. Međutim, u drugoj, veoma obimnoj studiji Zou i saradnika (208) koja je uključivala podatke iz 152 studije, zaključeno je da iako su ukupni rezultati ove meta-analize pokazali pozitivnu povezanost između genotipova OGG1 varijanti (CG ili GG) i osetljivosti na karcinom, analize podgrupa prema tipu karcinoma, veličini uzorka i izvoru kontrolne populacije dale su nedosledne rezultate. Stoga, autori zaključuju da rezultati iz ove meta-analize ne podržavaju hipotezu o genetičkoj varijanti OGG1 Ser326Cis kao faktoru rizika za razvoj karcinoma.

U našem istraživanju, učestalosti genotipova i alela OGG1 rs1052133 u kontrolnoj grupi ispitanika i kod MS-pacijenata nisu odstupale od Hardy-Weinbergove (H-W) ravnoteže (Tabela 16.). Prema bazi podataka Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP) Američkog nacionalnog centra za biotehnoške informacije (209) geografska distribucija G alela je najniža na Afričkom kontinentu (0,1771), zatim u Evropi (0,2214), a najučestalija je u Aziji (0,5710). Naša studija utvrdila je frekvenciju G alela u zdravoj populaciji Srbije od 0,2386 (kod muškaraca 0,2432 i kod žena 0,2341). Možemo zaključiti da je u populaciji Srbije učestalost mutiranog G alela, genetičke varijante OGG1 rs1052133, u saglasnosti sa podacima za Evropsku populaciju.

Ispitujući povezanost genetičke varijante OGG1 rs1052133 sa pojavom MS u populaciji Srbije, uočili smo izvesno povećanje učestalosti homozigota CC kod MS-muškaraca (0,6984) u odnosu na zdrave muškarce (0,5541), ali je verovatnoća bila na granici značajnosti ($p=0,083$) (Tabela 16. i Slika 18B.). Takođe, u populaciji muškaraca zapaženo je izvesno smanjenje učestalosti CG heterozigota kod pacijenata (0,2698) u odnosu na zdrave muškarce (0,4056), ali je verovatnoća bila na granici značajnosti ($p=0,096$) (Tabela 16. i Slika 18B.). Može se uočiti tendencija da je muška populacija Srbije, koja nosi G alel (CG i GG) zaštićena od pojave MS (frekvencija nosilaca G alela: u kontrolnoj grupi=0,4459; u grupi MS pacijenata=0,3016), ali je verovatnoća bila na granici značajnosti ($p=0,082$) (Tabela 16. i Slika 18D.). Karahalil i saradnici (210) su pokazali da u populaciji Turske, nosioci G alela (CG i GG) imaju 1,8 puta veći rizik od nastanka MS u odnosu na CC homozigote. S obzirom da u našoj populaciji nije pronađena povezanost između genetičke varijante OGG1 rs1052133 sa pojavom MS, što je različito u odnosu na pomenutu studiju sprovedenu u Turskoj populaciji, mogući razlog je razlika u učestalosti ređeg, mutiranog G alela u etnički različitim populacijama.

Sa ciljem da se ispita povezanost između genetičke varijante OGG1 rs1052133 i funkcionalnosti enzima reparacije OGG1 (genotip-fenotip interakcija), ispitan je nivo urinarnog 8-oksodG/kreatinina u odnosu na OGG1 genotipove. Rezultati naše studije su pokazali da su MS-pacijenti nosioci C alela (CC homozigoti i CG heterozigoti) imali viši nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na zdrave ispitanike istog OGG1 genotipa (Tabela 17., Slika 19A.), dok u grupi GG homozigota, ova razlika nije postojala. Iako smo pokazali da je nivo 8-oksodG/kreatinina povišen kod MS-pacijenata u odnosu na zdrave

ispitanike (Tabela 6.), možemo pretpostaviti da je u obe grupe ispitanika (MS-pacijenti i kontrolna grupa) koji su GG homozigoti, nivo reparacije DNK snižen, tako da praćenje nivoa 8-oksodG ne ukazuje samo na sistemske efekte OS, već i na efikasnost reparacije. Osim toga, u grupi MS-pacijenata, oni koji su nosioci G alela (genotipovi CG i GG) imaju značajno viši 8-oksodG/kreatinin u odnosu na pacijente koji su CC homozigoti (Slika 19B.). Dobijeni rezultati mogu ukazati na mogućnost veće izloženosti sistemskim efektima OS kod nosilaca G alela, nasuprot smanjenoj sposobnosti reparacije DNK kod ovog alela. Drugim rečima, ako su osobe nejednako izložene OS, u slučaju naše studije to su zdravi ispitanici i MS-pacijenti, veći nivo urinom izlučenog 8-oksodG kod funkcionalnog C alela može biti posledica smanjene sposobnosti G alela da vrši isecanje i reparaciju oksidativno modifikovane DNK lezije. Suprotno ovome, u našoj populaciji MS-pacijenata, oni koji su nosioci G alela imaju viši 8-oksodG u odnosu na CC homozigote, uprkos potencijalno smanjenoj sposobnosti reparacije DNK lezija. Na ovu činjenicu je ukazala studija (211), gde je pokazano da GG OGG1 genotip ispoljen kao fenotip, deficijantan u reparaciji 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina, ali samo pod uslovom da je prisutan OS u ćelijama. U obimnom revijskom članku Weiss i saradnici (212) su prikazali kontradiktorne literaturne podatke koji se odnose na uticaj genetičke varijante OGG1 rs1052133 na funkciju ovog proteina da reparira oksidativno modifikovane DNK lezije. Autori su identifikovali da u većem broju studija nije otkriven uticaj OGG1 rs1052133 i njegove biološke uloge (213-216), dok su neke studije pokazale smanjenu sposobnost reparacije kod osoba koje su nosioci G alela i samim tim ovaj mutirani alel je neefikasan u prevenciji mutageneze (217-219).

Ispitujući efekat pušačkog statusa i genetičke varijante OGG1 rs1052133, uočeno je da je nivo 8-oksodG/kreatinin bio viši kod pacijenata nego kod zdravih ispitanika u grupi nepušača, nosilaca G alela (CG i GG). Osim toga, rezultati ukazuju da su u grupi MS-pacijenata-nepušača, nosioci G alela imali viši nivo 8-oksodG/kreatinin u odnosu na CC homozigote (Tabela 18., Slika 20.). U grupi pacijenta koji su bili CC homozigoti i pušači nivo 8-oksodG/kreatinina je bio viši, u odnosu na zdrave ispitanike istog genotipa i pušačkog statusa. Takođe smo utvrdili da u grupi CC homozigota, MS-pacijenti-pušači imaju viši nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na MS-pacijente nepušače. Poslednja dva rezultata ukazuju na povećanu osetljivost CC homozigota prema sistemskom efektu OS koji je povezan sa pušenjem, što doprinosi nastanku i razvoju MS.

5.3. Klinički značaj serumskih lakih lanaca neurofilamenata, sfingozin-1-fosfata i metabolita triptofana (kinureninske i hinolinske kiseline) kod pacijenata sa multiplom sklerozom

Poslednjih godina, veliki broj istraživanja se bavio proučavanjem molekularnih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera za MS kao i biomarkera koji bi pomogli u praćenju efekta primenjene terapije, ali je mali broj njih našao kliničku primenu.

5.3.1. Povezanost lakih lanaca neurofilamenata sa multiplom sklerozom

Rezultati nedavnih istraživanja su istakli značaj lakih lanaca neurofilamenata (eng. *Neurofilament light chains*, NfL) u dijagnostici MS i praćenju terapijskog odgovora (144, 220). Literaturni podaci pokazuju da nivo NfL u serumu (sNfL) predstavlja dobar marker za rano otkrivanje bolesti, s obzirom da se NfL specifično oslobađa tokom oštećenja aksona (221). Štaviše, dokazana je povezanost sNfL sa stepenom oštećenja neurona u MS i njegov značaj u ranom otkrivanju bolesti, nekoliko godina pre pojave prvih kliničkih simptoma (222).

S obzirom da su istraživanja pokazala značajnu korelaciju između nivoa NfL u serumu i likvoru, smatra se da je NfL osetljiv i specifičan neinvazivan biomarker u dijagnostici MS i praćenju progresije bolesti (223, 224). Takođe je utvrđeno da se povećanje sNfL dovodi u vezu sa povećanim rizikom od pogoršanja invaliditeta kod MS-pacijenata (148). Maggi i saradnici (146) su otkrili da je hronična upala bele mase mozga povezana sa povećanim nivoima sNfL i ozbiljnošću bolesti kod neakutne MS. Pored toga Ziemssen i saradnici (147) su potvrdili da osnovni nivoi sNfL predstavljaju dobar prognostički indikator formiranja lezija i atrofije mozga kod MS-pacijenata.

U našem istraživanju, u zavisnosti od pola, rezultati ukazuju u grupi MS-pacijenata na veće koncentracije biomarkera sNfL kod žena u odnosu na muškarce (Tabela 19.). Takođe, u grupi nepušača, pacijentkinje su imale značajno viši nivo sNfL u odnosu na muškarce (Slika 21A.). Osim toga, uočeno je da su žene sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti (MSSS<6,7) imale viši sNfL u poređenju sa muškarcima (Tabela 24., Slika 22.). Dobijeni rezultati ukazuju na veće oštećenje aksona kod žena, što ukazuje na to da bi rano uvođenje terapije kod njih, verovatno odložilo pogoršanje bolesti. Za razliku od naših rezultata, neke studije nisu otkrile uticaj pola na nivo sNfL kod MS-pacijenata (145, 220).

Dodatnom analizom nivoa sNfL kod MS-pacijenata, u zavisnosti od pola i starosne dobi, dobijene su značajno više koncentracije sNfL kod pacijenata mlađih od 30 godina u celokupnoj populaciji ($p=0,001$) i kod žena ($p=0,005$), dok je kod muškaraca uočen sličan trend, ali je verovatnoća bila na granici značajnosti ($p=0,066$) (Tabela 21.). Osim toga, uočeno je da su žene starije od 30 godina imale viši nivo sNfL u poređenju sa muškarcima iste starosne dobi (Tabela 21.). Suprotno od naših rezultata, Bridel i saradnici (225) nisu utvrdili povezanost između godina starosti i nivoa sNfL kod pacijenata sa MS. Interesantno je da su ovi autori pokazali visoku korelaciju između godina starosti i nivoa sNfL u populaciji zdravih ispitanika. U studiji van der Vuurst de Vries i saradnika (226) utvrđen je viši nivo NfL kod dece u odnosu na adultne pacijente sa MS, što su autori objasnili time da, ne samo da

je inflamacija teža u dečijem uzrastu, već da deca imaju veće oštećenje aksona u ranoj fazi bolesti MS nego odrasli pacijenti. S obzirom da je i naša studija pokazala viši nivo sNfL u mlađoj životnoj dobi, možemo pretpostaviti da bi rano uvođenje terapije kod mladih osoba sa dijagnostikovanom MS bilo neophodno u prevenciji oštećenja aksona. Naši preliminarni rezultati bi trebalo da budu ispitani na većem broju uzoraka, različitih starosnih grupa.

S obzirom da je nivo sNfL u korelaciji sa stepenom oštećenja aksona, jedan od ciljeva naše studije je bio i ispitivanje uticaja genetičke varijante OGG1 rs1052133 (CC homozigoti vs. nosioci G alela: CG i GG) na nivo serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL) u zavisnosti od pola. Rezultati naše studije su otkrili da su u grupi pacijenata, nosilaca G alela (CG i GG), žene imale značajno viši nivo sNfL u odnosu na muškarce (Tabela 25., Slika 23.). Takođe, pacijentkinje koje su nosioci G alela (CG i GG) su imale značajno viši nivo sNfL u odnosu na pacijentkinje koje su bile homozigoti CC (Tabela 25., Slika 23.). Ovo sugerise da je G alel povezan sa rizikom od oštećenja aksona kod žena koje su obolele od MS. Ovaj rezultat naše studije može biti klinički značajan, s obzirom da su Siller i saradnici pokazali da sNfL ukazuje na oštećenja neurona u ranoj fazi MS i na predstojeću atrofiju mozga (227). Osim toga, porast nivoa sNfL u MS dovodi se u vezu sa povećanim rizikom od pogoršanja bolesti (148), tako da nivo sNfL može poslužiti kao prognostički biomarker za procenu rizika od razvoja invaliditeta u MS kod žena nosilaca G alela.

5.3.2. Povezanost nivoa sfingozin-1- fosfata i multiple skleroze

Sfingozin-1-fosfat (S1P) kao bioaktivni lipidni molekul i S1P receptori (S1PR) koji su široko eksprimirani u ljudskom organizmu imaju važnu ulogu u imunološkom sistemu. Iako je S1P-S1PR signalizacija dobro okarakterisana, kako u urođenom tako i u stečenom imunološkom sistemu, njihov značaj u patogenezi autoimunskih poremećaja, kakav je i MS je još nepoznat. Sfingozin-1-fosfat (S1P) inhibira apoptozu i uključen je u proliferativnu i inflamatornu signalizaciju koja ima važnu ulogu u aktivaciji ćelija mikroglije i oligodendrocita (59).

Razmatrajući uticaj pola i pušačkog statusa u našem istraživanju nije dobijena statistički značajna razlika, ali je postojala tendencija porasta S1P među pacijentima nepušačima, oba pola (Slika 21.). Dobijen je značajno viši nivo S1P kod muškaraca mlađih od 30 godina u odnosu na starije ($p=0,015$, Tabela 21.). Takođe kod muškaraca sa MS, uočen je izvestan stepen pozitivne korelacije između sNfL i S1P, ali je verovatnoća bila na granici značajnosti (Pearson $r=0,272$; $p=0,089$, Tabela 22.). Potencijalno klinički značajna dobijena je visoka pozitivna korelacija između biomarkera sNfL i S1P kod pacijenata sa teškim oblikom bolesti ($MSSS>6,7$) ($r=0,696$; $p=0,008$; Tabela 23.). Ovaj rezultat naše studije ukazuje na moguću primenu S1P u serumu, kao biomarkera progresije MS, uz već ustanovljeni biomarker sNfL. S tim u vezi, pretpostavljamo da je korelacija između S1P i markera progresije MS, sNfL, patološka intravaskularna hemoliza (228) s obzirom da je membrana eritrocita glavni izvor cirkulišućeg S1P (229). Pošto su sfingolipidi uključeni u razvoj i funkciju CNS i perifernog nervnog sistema, promene u njihovoj koncentraciji mogu ugroziti integritet nervnog sistema (230). Studija Miller i saradnika (231) je utvrdila povišenje sfingozina u plaku i beloj masi mozga kod MS-pacijenata u poređenju sa normalnim moždanim tkivom. Oni su ukazali na toksičnost sfingozina i mogućnost posredovanja u degeneraciji oligodendrocita i u demijelinizaciji. U prilog potencijalne kliničke primene S1P je i studija Kułakowske i sradnika (232), koja je pokazala da bi endogeni metabolit S1P mogao biti značajan biomarker u dijagnostici rane faze MS, s obzirom da je

utvrđen porast njegove koncentracije u likvoru kod MS-pacijenata u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Autori ove studije sugerišu da je ovaj marker povezan sa hroničnom inflamacijom u MS i da može biti koristan u razjašnjenju patofizioloških mehanizama neurodegenerativnih bolesti.

5.3.3 Povezanost nivoa metabolita triptofana (kinureninska i hinolinska kiselina) i multiple skleroze

U patogenezi MS prisutni su poremećaji metabolizma triptofana (TRP), kao i njegovih metabolita (131, 132). Tokom kinureninskog puta (KP) metabolizma triptofana (TRP) dolazi do stvaranja neurotoksičnih i neuroprotektivnih metabolita koji su korisni kao biomarkeri bolesti (233, 234) Ravnoteža između neuroprotektivnih i neurotoksičnih endogenih metabolita je od značaja za normalno funkcionisanje mozga.

Jedan od metabolita triptofana u tzv. kinureninskom putu, je neuroprotektivna kinureninska kiselina (KA). Utvrđena su neuroprotektivna svojstva ovog metabolita triptofana. KA pod fiziološkim uslovima ima svojstva antioksidansa, zahvaljujući sposobnosti da vezuje hidroksile, superoksidne anjone i druge reaktivne kiseonične vrste (235). Studija Zwilling i saradnika (236) sprovedena na animalnim modelima je utvrdila da porastom KA dolazi do pada ekstracelularnog glutamata, a da na periferiji dolazi do porasta nivoa L-kinurenina, koji zatim prolazi BBB i transformiše se u KA koja ima neuroprotektivni efekat.

Jedan od krajnjih proizvoda KP metabolizma je hinolinska kiselina (QA) (94). Veliki broj dokaza sugeriše da QA osim neurotoksičnog delovanja pokazuje povezanost i sa imunskim sistemom, jer proinflamatorni citokini stimulišu proizvodnju i toksičnost ovog metabolita (237). Istraživanja su pokazala da QA ispoljava neurotoksične efekte, između ostalog i aktivacijom lipidne peroksidacije u prisustvu Fe^{2+} jona (238). Generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta delovanjem QA nastaje sekundarno, formiranjem kompleksa $QA-Fe^{2+}$, a može se sprečiti heliranjem gvožđa (239). Interesantno je da poremećaj ravnoteže između ova dva metabolita triptofana, QA i KA, u korist QA, stimuliše proizvodnju slobodnih radikala, narušavajući BBB, uz destabilizaciju neuronskih ćelija (141).

Naša studija je pokazala da pacijentkinje sa teškim oblikom MS (MSSS>6,7) imaju značajno viši nivo QA u odnosu na žene sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti (MSSS<6,7) (Tabela 24.). Pretpostavka je da sa progresijom bolesti, usled hronične aktivacije KP došlo do povećanog stvaranja neurotoksičnih metabolita koji dovode do neurodegeneracije. Dokazano je da tokom neuroinflamacije dolazi do aktivacije KP metabolizma triptofana, sa posledično povećanim stvaranjem QA koja oštećuje moždane ćelije, neurone, astrocite i oligodendrocite (138). Nedavna studija Yan i saradnika (240) je utvrdila povezanost između porasta QA, kinurenina, neopterina i indeksa kinurenin/triptofan u likvoru i neuroinflamatornih bolesti. Zaključak ove studije je da bi QA, pored pomenutih metabolita potencijalno mogla da bude koristan dijagnostički i biomarker praćenja kod neuroinflamatornih bolesti. Studija Sundaram i saradnika (241) izvedena na modelu mišijih oligodendrocita dokazala je citotoksičnost QA u patofiziološkim koncentracijama koje se javljaju tokom hronične inflamacije, kao npr. kod produžene aktivacije KP, kod progresivne MS. U istoj studiji pokazano je *in vitro* da se smrt oligodendrocita može prevenirati primenom anti-QA monoklonskih antitela i na taj način neutralisati toksičnost QA. Uzimajući u obzir rezultat naše studije

i literaturnih podataka, merenje nivoa QA može potencijalno biti koristan prognostički biomarker, posebno kod žena.

5.4. Povezanost DMT terapije sa ispitivanim biomarkerima kod pacijenata sa multiplom sklerozom

Istraživanja su pokazala da je rana primena terapije koja modifikuje prirodni tok bolesti (DMT) kod MS-pacijenata neophodna u cilju smanjenja broja recidiva, usporavanju progresije bolesti i invaliditeta (60, 242).

Cilj našeg istraživanja je bio da rasvetlimo efekte DMT terapije, kao i pojedinih lekova nakon šest meseci primene terapije, praćenjem biomarkera OS, sNfL, metabolita KP metabolizma triptofana i sfingozin-1-fosfata, kod pacijenata sa MS. S obzirom da se još uvek ulažu napor u cilju validacije i verifikacije dijagnostičkih biomarkera koji će imati mogućnost ranog otkrivanja oštećenja neurona, procene ishoda DMT terapije i procene neželjenih efekata terapije kod MS-pacijenata, naše istraživanje dizajnirano kao klinička studija preseka, predstavlja prvu studiju koja je ispitala efekat DMT na nivo sNfL, sfingozin-1-fosfata i metabolita KP metabolizma triptofana (QA i KA) kod RRMS pacijenata u populaciji Srbije.

5.4.1. Uticaj DMT terapije na oksidativni stres

Patogeneza MS je povezana sa oksidativnim i inflamatornim procesima koji dovode do demijelinizacije i oštećenja tkiva posredstvom slobodnih radikala i proinflamatornih citokina (86). U nedavnom preglednom članku, Pegoretti i saradnici (243) su sumirali doprinos inflamacije i OS u patogenezi MS kao i o posledicama na razvoj terapije za MS. Istakli su da selektivno ciljanje na aktivnost proinflamatornih medijatora može rezultirati boljoj terapijskoj strategiji. Međutim, još uvek nema dovoljno podataka o efektima DMT na OS. Sa razvojem DMT, pacijenti imaju više mogućnosti i poboljšanu fleksibilnost u kontroli bolesti (244). Jedan od ciljeva naše studije je bio da ispita uticaj DMT terapije na razvoj OS. Ovo ispitivanje je sprovedeno sa tri aspekta: uticaj DMT terapije između pacijenata koji su primali DMT terapiju i onih koji nisu primali ovu terapiju; uticaj DMT terapije nakon šest meseci primanja ove vrste terapije i ispitivanje uticaja pojedinih DMT lekova.

Rezultati naše studije su pokazali da su pacijenti bez terapije imali viši nivo OS (procenjen biomarkerom 8-oksodG/kreatinin), niži nivo antioksidativne zaštite (procenjen biomarkerom TAS) (Tabela 26.). U populaciji pacijentkinja koje nisu primale DMT terapiju, takođe je dokazan povišen 8-oksodG/kreatinin u odnosu na pacijentkinje na DMT terapiji. Ovi rezultati ukazuju na protektivni efekat DMT terapije na negativne sistemske efekte OS, koja može biti povezana sa većom podložnosti žena prema MS.

Naši rezultati su u saglasnosti sa studijom Sadowska-Bartosz i saradnika (245), koji su pokazali postojanje oksidativnog oštećenja proteina, procenjeno na osnovu povećanog nivoa karbonilnih grupa, AOPP (eng. *Advanced Oxidation Protein Products*), kod nelečenih pacijenata sa MS. Antioksidativni efekat DMT terapije je od kliničkog značaja, s obzirom da su istraživanja pokazala porast prooksidativnih i smanjenje antioksidativnih biomarkera u aktivnom plaku, beloj i sivoj masi mozga kod MS-pacijenata (246). Takođe studija Obradović i saradnika (247) pokazala je koristan

uticaj DMT terapije na smanjenje OS (porast antioksidativne aktivnosti enzima superoksid dismutaze, pad koncentracije prooksidativnih AOPP) i bolji klinički oporavak.

Takođe, ispitano je da li pušački status menja uticaj DMT terapije na OS kod MS-pacijenata. Rezultati ukazuju da kod nepušača koji su primali DMT, postoji viši nivo biomarkera TAS, a niži nivo urinarnog 8-oksodG/kreatinin u odnosu na nepušače koji su bili bez terapije (Tabela 27., Slika 24.). Dalje je prethodno ispitivanje prošireno, ispitujući uticaj pola. Muškarci bez terapije i muškarci pušači imali su niži TAS u odnosu na muškarce koji su bili na terapiji, u odnosu na muškarce-nepušače i u odnosu na žene-nepušače (Slika 25A.). Ovi rezultati ukazuju da DMT terapija, nepušački status i muški pol utiču pozitivno na očuvanje antioksidativne zaštite kod pacijenata obolelih od MS. Međutim, žene-nepušači na DMT terapiji i žene-pušači bez DMT terapije imaju više nivoe OS, procenjeno na osnovu porasta indeksa OSI u odnosu na muškarce istog pušačkog i terapijskog statusa (Slika 25C.). Dalje, rezultati ukazuju da žene nepušači bez DMT terapije imaju viši biomarker sistemskog OS u odnosu na žene istog pušačkog statusa koje su primale DMT terapiju (Slika 25D.), a sličan trend je zapažen i u populaciji žena pušača, ali bez statističke značajnosti. Iz ovih rezultata može da se zaključi da su žene podložnije OS u odnosu na muškarce i da bi primenjena DMT terapija trebalo da bude dopunjena antioksidativnom terapijom, posebno kod žena.

Ovaj polni dimorfizam podstiče dalja istraživanja u cilju razjašnjenja kako okruženje, genetska predispozicija kao i drugi faktori povećavaju rizik za razvoj MS kod žena, što bi doprinelo i unapređenju terapijskog pristupa u odnosu na pol. Sistematski pregled literaturnih podataka od strane Lija i saradnika (248), analizirajući četrnaest studija nije utvrdio jasnu polnu razliku u ishodima DMT terapije. Međutim autori u zaključku iznose stav da je potrebno više studija da bi se bolje razjasnilo prisustvo polnih razlika na efekte DMT-a. Rezultati naše studije o polnim razlikama DMT terapije na razvoj OS mogu potencijalno doprineti rasvetljavanju ovih pitanja. Uzimajući u obzir navedeno, možemo zaključiti da DMT ima zaštitni efekat na razvoj OS posebno kod žena.

U našem istraživanju detaljno je analiziran uticaj DMT terapije na biomarkere OS u zavisnosti od progresije bolesti (procenjene na osnovu MSSS skora) i pola (Tabele 30-32; Slike 26-28.). Najvažniji rezultat je značajno snižena vrednost za indeks OSI kod žena sa teškim oblikom MS (MSSS>6,7) koje su primale DMT terapiju u odnosu na žene koje nisu primale ovu terapiju (Tabela 31., Slika 28C.), što jasno ukazuje na zaštitnu ulogu DMT od razvoja OS. Takođe, uočen je značajno niži nivo 8-oksodG/kreatinina kod pacijentkinja sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti (MSSS<6,7) koje su primale DMT terapiju u odnosu na pacijentkinje bez terapije sa istom težinom bolesti (Tabela 31., Slika 28D.). Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da je zaštitna uloga DMT terapije kod žena značajna nezavisno od faze bolesti, kako u ranoj fazi, tako i tokom progresije bolesti, što ukazuje na značaj određivanja biomarkera OS (TAS, TOS, OSI, 8-oksodG/kreatinin) u proceni razvoja OS i prevenciji teškog stadijuma MS. U prilog ovome je i studija Fischer i saradnika (249), kojom je pokazano da OS povezan sa inflamacijom u aktiviranoj mikrogliji i makrofagima ima važnu ulogu u demijelinizaciji i povredi tkiva posredovanom slobodnim radikalima u patogenezi MS.

Takođe, rano uvođenje DMT u kombinaciji sa antioksidansima bilo bi od posebnog značaja jer bi se preveniralo širenje oštećenja moždanog tkiva i odložilo pogoršanje bolesti. U preglednom članku Miller i saradnici (102) su predstavili različita antioksidativna jedinjenja i njihovu korist kao

komplementarnu terapiju kod pacijenata sa MS. Autori su istakli značaj daljeg istraživanja zaštitnih efekata antioksidanasa protiv neurodegeneracije u MS.

Jedan od ciljeva ove studije je bio da se ispita da li postoje razlike u efektima pojedinih vrsta DMT terapije (Betaferon[®], Rebif[®], Copaxone[®] i S1PR modulatori) na biomarkere OS, nakon šestomesečne primenjene terapije, s obzirom da su literaturni podaci o efektima pojedinih DMT lekova oskudni.

Nakon perioda praćenja, kada je uklonjen uticaj početne vrednosti biomarkera OS (Tabela 34.) nije otkrivena razlika u njihovim nivoima u odnosu na primenjen lek. Međutim na Slikama 30. A-C, može se uočiti izvestan trend razlike u efektima DMT lekova na promene biomarkera OS nakon šestomesečne terapije. Najznačajniji porast indeksa OSI nakon šestomesečnog praćenja zapaža se kod pacijenata na terapiji lekovima Rebif[®] i Copaxone[®] (Slika 30. C), dok su ovi isti lekovi pokazali najveći pad biomarkera 8-oksodG/kreatinin (Slika 30. D). Ovaj, na prvi pogled, kontradiktoran rezultat bi mogao da bude objašnjen time, da tokom kratkoročnog praćenja od šest meseci dolazi do prolaznog porasta OS, ali da dugoročno ovi lekovi mogu povoljno uticati na sprečavanje razvoja sistemskih efekata OS, što zavisi od dužine perioda primene terapije pojedinom vrstom leka pre uključivanja u studiju šestomesečnog praćenja. Takođe, moguć je i uticaj same težine bolesti kod pacijenata na određenoj vrsti terapije, kao i vreme uvođenja terapije u odnosu na vreme kada je bolest dijagnostikovana. Uočeno je da primenom leka Rebif[®] (Interferon beta-1a) dolazi do najvećeg pada antioksidativne zaštite u odnosu na druge lekove, što posredno može da bude u saglasnosti sa rezultatima studije Faraji i saradnika (250), koji su pokazali veću efikasnost interferona beta-1a u kombinaciji sa susamovim uljem. Studije su pokazale da susamovo ulje zbog svog antiinflamatornog i antioksidativnog delovanja dovodi do smanjenja proinflatornih citokina, ali da tačan mehanizam delovanja ulja još uvek nije poznat (251, 252). Dobijeni rezultati imaju potencijalni klinički značaj u prevenciji OS kod primene lekova Rebif[®] i Copaxone[®].

Od otkrića Fingolimoda, prvog leka iz grupe S1P-modulatora, do Siponimoda, novog molekula koji je nedavno odobren za lečenje sekundarne progresivne multiple skleroze (SPMS), došlo je do velikog napretka u razumevanju funkcija S1P i njihovog učešća u imunološkim bolestima, uključujući MS (253). U našoj studiji, jedino su lekovi iz grupe S1PR-modulatora imali efekat na pad indeksa OSI (Slika 30C.), a nisu imali efekat na promenu biomarkera 8-oksodG/kreatinin u odnosu na procenjenju srednju početnu vrednost ovog biomarkera (Slika 30D.). Na osnovu dobijenih rezultata može da se zaključi da terapija S1PR-modulatorima deluje preventivno na razvoj OS, ali i da je šestomesečni period bio verovatno kratak da bi se ispoljili efekti ove terapije na oksidativnu modifikaciju DNK. Naši rezultati su u saglasnosti sa nedavnom studijom Yevgi i saradnika (254) u kojoj je pokazano korisno dejstvo leka Fingolimod u smanjenju OS koji je procenjen sniženjem nivoa biomarkera TOS. Još uvek je nepoznat mehanizam koji je odgovoran za antioksidativna svojstva leka Fingolimod.

5.4.2. Uticaj šestomesečne DMT terapije na nivo serumskih lakih lanaca neurofilamenata (sNfL)

Serumski laki lanac neurofilamenta predstavlja biomarker oštećenja neurona u MS, posebno u slučaju „klinički tihe bolesti” kada je teško protumačiti kliničke promene (145).

Nakon šestomesečnog praćenja DMT terapije, utvrđeno je da se nivo sNfL značajno promenio i da je na tu promenu uticao pol (Tabela 35.). Na Slici 31A., može se videti da je porast sNfL, nakon šest meseci praćenja bio viši kod žena, dok je ova promena kod muškaraca bila neznatna. Ovo može ukazivati na veću podložnost žena oštećenju aksona, a samim tim i na važnost ranog uvođenja DMT kod žena sa MS. Kada je uklonjen uticaj početnih vrednosti za sNfL pre uvođenja terapije, uočen je najveći porast nivoa sNfL nakon šestomesečne terapije modulatorima S1P receptora (Slika 32A.), izvestan pad kod terapije Betaferonom[®], a izostanak promene je zabeležen kod pacijenata na terapiji lekovima Rebif[®] i Copaxone[®]. Rezultati naše studije su u suprotnosti sa studijom Kuhle i saradnika (220) koja je pokazala da lekovi Fingolimod i Interferon β -1a značajno redukuju nivo sNfL već tokom šest meseci terapije, u odnosu na grupu pacijenata koja je primala placebo. U ovoj studiji pad vrednosti sNfL nakon šest meseci je bio za oko 35%, dok je kod leka Interferon β -1a bio svega 14%. Porast nivoa sNfL nakon šestomesečne terapije lekovima iz grupe modulatora S1P receptora, dobijena u našoj studiji može biti posledica toga što je kod ovih pacijenata terapija uvedena tek kada se razvio teži oblik bolesti, tako da je izostao pozitivan efekat terapije na pad NfL. Nešto drugačiji rezultat u vezi sa efikasnošću leka Fingolimod dobijena je u studiji Piehl i saradnika (255) koji su redukciju nivoa sNfL u odnosu na početnu vrednost zabeležili u 12. mesecu od uvođenja Fingolimoda, sa stabilnim održavanjem nivoa sNfL do 24. meseca praćenja. Studija Varhaug i saradnika (256) je utvrdila nepromenjen nivo sNfL u šestom mesecu praćenja terapije Interferon β -1a, a pad ovog biomarkera je zabeležen tek u 12. i 24 mesecu nakon uvođenja terapije ovim lekom. S obzirom da u našoj studiji nije zabeležena promena sNfL nakon šestomesečne terapije lekom Rebif[®] koji predstavlja lek iz grupe Interferon β -1a, može da se zaključi da je rezultat našeg ispitivanja u skladu sa pomenutom studijom Varhaug i saradnika (256).

5.4.3. Uticaj šestomesečne terapije na nivo sfingozin-1-fosfata (S1P)

U našoj studiji, primenom t-testa parova uočen je porast sfingozin-1-fosfata (S1P) nakon šestomesečne primene leka Copaxone[®] (Tabela 36.). Kada se ukloni uticaj početnih vrednosti S1P, uočava se da nakon šestomesečne primene lekova Betaferon[®] i Rebif[®] opada nivo S1P, a primenom lekova Copaxone[®] i modulatora S1P receptora dolazi do njegovog porasta (Slika 32.). Značaj dobijenih rezultata nije moguće trenutno proceniti. Takođe nije moguće objasniti koji su mehanizmi delovanja ovih lekova eventualno odgovorni za porast, odnosno smanjenje nivoa cirkulišućeg S1P.

Interesantno da je terapija modulatorima S1P receptora ispoljila potpuno suprotne efekte na nivoe S1P i sNfL (Slika 33), posmatrano prema polu. Kod žena uočen je gotovo istovetan porast S1P (5%) i sNfL (10%) nakon šestomesečne terapije modulatorima S1P receptora, dok je kod muškaraca uočen pad S1P (3,6 %) i sNfL (5%) u odnosu na početne vrednosti ovog biomarkera. Ove polne razlike koje se javljaju nakon terapije modulatorima S1P receptora, trenutno nije moguće objasniti, ali mogu ukazati na lošiji ishod ove terapije kod žena.

5.4.4. Uticaj šestomesečne terapije na nivo metabolita triptofana (kinureninska i hinolinska kiselina)

S obzirom da su metaboliti KP, uključeni u patofiziološke mehanizme nastanka i progresije MS (257), jedan od ciljeva naše studije je bio da se ispita potencijalni efekat DMT terapije na nivo neuroprotektivne kinureninske kiseline i neurotoksične hinolinske kiseline nakon šestomesečne terapije. Nedavna studija Lim i saradnika (258) je sugerisala na značaj određivanja odnosa metabolita hinolinske i kinureninske kiseline (QA/KA), jer se ovim indeksom procenjuje ukupna ekscitotoksičnost kinureninskog metaboličkog puta. Potencijalni klinički značaj bi bio primena ovih metabolita kao biomarkera za procenu ishoda DMT terapije.

Primenom t-testa parova, analizirane su promene u nivoima KA, QA i indeksa QA/KA u odnosu na primenjenu terapiju nakon perioda od šest meseci. Utvrđeno je značajno povećanje KA i značajan pad indeksa QA/KA nakon šestomesečne terapije lekom Copaxone® (Tabela 37.). Međutim, kada se ukloni uticaj početnih vrednosti ispitivanih biomarkera, može se uočiti na Slici 32E. da je indeks QA/KA kod primene lekova Copaxone® i modulatora S1P receptora bio značajno niži nakon šestomesečne terapije u odnosu na početne vrednosti. Ovaj rezultat upućuje da bi indeks QA/KA mogao biti koristan za praćenje efikasnosti terapije lekovima Copaxone® i modulatora S1P receptora.

S druge strane, na Slici 32E., može se zapaziti da lekovi iz grupe Interferona- β (Betaferon® i Rebif®) pokazuju tendenciju porasta indeksa QA/KA. Guillemin i saradnici (259) su pokazali da lekovi iz grupe Interferona- β 1b, u terapijskim dozama mogu da indukuju sintezu QA, povećanjem ekspresije glavnog regulatornog enzima indoleamin 2,3-dioksigenaze (IDO) u makrofagama i na taj način umanje efikasnost ovih lekova. Trend porasta QA koji smo u našoj studiji uočili nakon šestomesečne terapije lekom Betaferon® iz grupe lekova Interferona- β 1b (Slika 32D.) je u saglasnosti za navedenom studijom.

Kako je period praćenja efekata lekova na metabolite triptofana bio samo šest meseci, buduća studija bi trebalo da se proširi na duži vremenski period, kako bi se potvrdili dobijeni rezultati i potencijalno otkrile nove mogućnosti za primenu biomarkera KA i QA za praćenje ishoda DMT terapije kod pacijenata sa MS.

5.5. Povezanost progresije multiple skleroze i upotrebe mleka u ishrani MS pacijenata koji su bili na DMT terapiji

U istraživanjima koja su sprovedena tokom proteklih godina zapažena je visoka korelacija između prevalencije MS i upotrebe mleka, uz pretpostavku da zbog povećanja antitela na neke od mlečnih proteina dolazi do unakrsne reakcije sa proteinima mijelina kod MS-pacijenata (260, 261). Obimna studija Malosse i saradnika (43), koja je obuhvatila podatke o povezanosti konzumacije mleka i mlečnih proizvoda iz 27 zemalja sveta, potvrdila je povezanost konzumiranja mleka i pojave klinički ispoljene MS.

Podaci o upotrebi mleka u ishrani kod MS-pacijenata u našoj studiji su prikupljeni pomoću upitnika. Analizom su obuhvaćeni pacijenti koji su primali DMT terapiju. Pacijenti koji su u ishrani koristili

mleko imali su značajno više vrednosti za MSSS skor u odnosu na pacijente koji nisu konzumirali mleko (Slika 34.). Dodatno, utvrdili smo da u grupi koja je konzumirala mleko postoji trend veće učestalosti težeg oblika MS (MSSS>6,7) u odnosu na blaži i srednje teški oblik bolesti (MSSS<6,7) (Slika 35.). Možemo pretpostaviti da mleko predstavlja faktor rizika u progresiji MS. Literaturni podaci pokazuju da dominantni protein iz mleka, kazein, ispoljava značajne antigenske osobine (262). Takođe, Chunder i saradnici (263) su pokazali da imuni odgovor na kazein može pogoršati demijelinizaciju u MS kao rezultat homologije sekvence između kazeina i mijelina. Štaviše, rezultati ove studije sugerišu da veća upotreba mleka i mlečnih proizvoda može pogoršati autoimuni odgovor u MS.

Literaturni podaci takođe povezuju drugi mlečni protein, butirofilin, sa rizikom od pojave MS, koji aktivacijom imunskog sistema oštećuje mijelin oligodendrocita (264). Munger i saradnici (261) su u svom istraživanju sugerisali da unos vitamina D u dozama od 400 IU/dan i više je povezano sa manjim rizikom od nastanka MS, dok je unos punomasnog mleka bio povezan sa povećanim rizikom od ove bolesti.

Naši rezultati ukazuju da je konzumacija kravljeg mleka povezana sa progresijom MS, što može biti od kliničkog značaja. Savetovanjem pacijenata obolelih od MS da ne konzumiraju kravlje mleko može se uticati na prevenciju pojave težeg oblika ove bolesti.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima i na osnovu analize dobijenih rezultata može da se zaključi sledeće:

1. Pacijenti sa multiplom sklerozom (MS) imaju povećan nivo oksidativnog stresa, procenjenog na osnovu povišenih biomarkera TOS, OSI i 8-oksodG/kreatinin u odnosu na zdrave ispitanike.
2. MS-žene imaju niži nivo biomarkera TAS, povećan nivo TOS i 8-oksodG/kreatinin u odnosu na MS-muškarce što ukazuje da su žene u povećanom riziku od oksidativnog stresa i učestalijoj pojavi MS u odnosu na muškarce.
3. MS-muškarci imaju niži nivo TAS u odnosu na zdrave ispitanike, dok MS-žene imaju viši nivo TOS, 8-oksodG/kreatinin i OSI u odnosu na zdrave žene.
4. Kod MS-pacijenata-pušača utvrđen je viši nivo OSI i 8-oksodG/kreatinin u odnosu na kontrolnu grupu što ukazuje na povećan rizik za razvoj MS povezan sa oksidativnim stresom kod pušača.
5. Dobijene su povišene vrednosti biomarkera 8-oksodG/kreatinin kod bivših, pasivnih i aktivnih pušača u grupi MS-pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike istih pušačkih navika, a u grupi MS-pacijenata bivši pušači i pasivni pušači imali viši nivo 8-oksodG/kreatinin u odnosu na pacijente-nepušače, što potvrđuje da štetni prooksidansi iz duvanskog dima utiču na oksidativno oštećenje DNK kod osoba koje su trenutno ili su bile izložene duvanskom dimu.
6. U ispitivanoj populaciji Srbije, pasivno pušenje je kod muškaraca povezano sa 10 puta većim rizikom za nastanak MS, dok je kod žena ovaj rizik 13 puta veći.
7. MS-muškarci-pušači sa teškim oblikom bolesti (MSSS>6,7) imali su niži nivo biomarkera TAS u odnosu na MS-muškarce-nepušače sa istom težinom bolesti, što ukazuje da duvanski smanjuje antioksidativnu zaštitu kod obolelih muškaraca sa teškim oblikom bolesti.
8. MS-žene-pušači sa teškim oblikom bolesti (MSSS>6,7) imali su viši nivo biomarkera TOS i indeksa OSI u odnosu na MS-muškarce, istog pušačkog statusa i težine bolesti, što ukazuje na povećani rizik od OS kod žena u odnosu na muškarce, obolele od teškog oblika MS.
9. Zdravi ispitanici koji su se izlagali suncu imali su viši nivo antioksidativne zaštite (procenjen pomoću biomarkera TAS) u odnosu na ispitanike koji se nisu izlagali suncu, a MS-pacijenti koji se nisu izlagali suncu imali su viši nivo pro-oksidativnog biomarkera TOS u odnosu na kontrolne ispitanike.
10. U grupi MS-pacijenata godine starosti su bile u pozitivnoj korelaciji sa biomarkerom TOS i indeksom telesne mase, a indeks telesne mase je bio u pozitivnoj korelaciji sa biomarkerima TAS i 8-oksodG/kreatinin.

11. Povišen oksidativni stres, procenjen na osnovu indeksa OSI i biomarkera 8-oksodG/kreatinin, kao i pasivno pušenje predstavljaju nezavisne prediktore u nastanku MS u populaciji Srbije, a najjaču prediktorsku moć ima indeks OSI, što ukazuje na njegov potencijalni klinički značaj u proceni rizika za nastanak MS.
12. Genetička varijanta enzima OGG1 rs1052133 u populaciji Srbije nije odstupala od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi i kod MS-pacijenata.
13. Distribucije genotipova i alela enzima OGG1 rs1052133 u populaciji Srbije između kontrolne grupe (CC=0,5709; CG=0,3846; GG=0,0445; C alel=0,7632; G alel=0,2386) i MS-pacijenata (CC=0,6447; CG=0,3158; GG=0,0395; C alel=0,8026; G alel=0,1974) nisu se razlikovale.
14. Uočen je trend (verovatnoća je bila na granici značajnosti) veće učestalosti homozigota CC kod MS-muškaraca u odnosu na zdrave muškarce.
15. MS-pacijenti nosioci C alela (CC homozigoti i CG heterozigoti) imali su viši nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na zdrave ispitanike istog genotipa, dok kod GG homozigota nije postojala razlika, što potencijalno ukazuje da praćenje nivoa 8-oksodG/kreatinin nije pokazatelj samo sistemskih efekata OS, već i efikasnosti sistema reparacije DNK.
16. MS-pacijenti koji su nosioci G alela (CG i GG) imali su viši nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na MS-pacijente koji su bili CC homozigoti, što može potencijalno ukazati na veću izloženost sistemskim efektima OS kod nosilaca G alela, nasuprot njegovoj smanjenoj reparacionoj sposobnosti.
17. MS-pacijenti koji su bili CC homozigoti i pušači imali su viši 8-oksodG/kreatinin u odnosu na MS-pacijente nepušače, istog genotipa, što potencijalno ukazuje na povećani rizik kod CC homozigota prema OS izazvanog pušenjem kod obolelih od MS.
18. MS-žene su imale više nivoa biomarkera sNfL u odnosu na MS-muškarce, što ukazuje na veće oštećenje aksona kod žena i ističe značaj ranog uvođenja terapije, posebno kod žena.
19. MS-žene koje su nosioci G alela (CG i GG) su imale viši nivo sNfL u odnosu na MS-žene koje su bile homozigoti CC, kao i u odnosu na MS-muškarce-nosioce G alela, što potencijalno ukazuje da veći rizik od oštećenja aksona imaju žene nosioci G alela.
20. MS-pacijenti mlađi od 30 godina, nezavisno od pola, imali su više vrednosti za sNfL i S1P u odnosu na starije od 30 godina, što ukazuje na potencijalno veći rizik pogoršanja bolesti kod mlađih osoba.
21. MS-žene, starije od 30 godina imale su viši nivo sNfL u odnosu na muškarce iste starosne dobi, što ukazuje na potencijalno veći rizik od pogoršanja bolesti kod žena sa starenjem.
22. Utvrđena je visoka pozitivna korelacija između biomarkera sNfL i S1P kod MS-pacijenata sa teškim oblikom bolesti (MSSS>6,7).

23. Kod MS-muškaraca utvrđena je značajna pozitivna korelacija između MSSS skora i biomarkera S1P.
24. MS-žene sa teškim oblikom MS (MSSS>6,7) su imale viši nivo hinolinske kiseline u odnosu na MS-žene sa lakšim i umereno teškim oblikom bolesti (MSSS<6,7), što potencijalno ukazuje da kod žena hronična aktivacija KP i povećano stvaranje neurotoksične hinolinske kiseline povećava rizik od neurodegeneracije.
25. MS-pacijenti bez DMT terapije su imali viši MSSS skor, viši nivo 8-oksodG/kreatinina i niži nivo TAS u odnosu na MS-pacijente koji su primali DMT, što ukazuje na zaštitni efekat DMT od razvoja OS.
26. U grupi pacijenata na DMT terapiji žene-nepušači imaju viši nivo indeksa OSI u odnosu na muškarce istog pušačkog i terapijskog statusa, što potvrđuje veću podložnost žena OS u odnosu na muškarce i da bi DMT terapija kod žena trebalo da bude dopunjena antioksidativnom terapijom.
27. MS-žene-nepušači koje su bile na DMT terapiji imale su niži nivo biomarkera 8-oksodG/kreatinin u odnosu na MS-žene nepušače koje nisu primale DMT, što dodatno ukazuje na zaštitni efekat DMT terapije od sistemskih efekata OS kod žena.
28. Kod MS-pacijenata sa skorom MSSS>6,7, pacijenti bez DMT terapije imali su značajno niži nivo TAS i viši indeks OSI u odnosu na pacijente koji su primali DMT terapiju, što ukazuje na zaštitni efekat DMT terapije od sistemskih efekata OS kod teškog oblika MS.
29. MS-žene sa skorom MSSS>6,7 koje su bile na DMT terapiji imale su imale značajno viši indeks OSI u odnosu na MS-žene sa skorom MSSS<6,7, koje su takođe primale DMT terapiju, što ukazuje na ograničeni efekat DMT terapije na prevenciju razvoja OS i pojave teškog oblika MS.
30. MS-žene sa skorom MSSS>6,7 koje su bile na DMT terapiji imale su značajno niži nivo indeksa OSI u odnosu na MS-žene bez terapije i sa istom težinom bolesti, što ukazuje na zaštitni efekat DMT terapije od progresije MS kod žena, povezane sa oksidativnim stresom.
31. MS-žene sa skorom MSSS<6,7 koje su bile na DMT imale su značajno niži nivo 8-oksodG/kreatinina u odnosu na MS-žene bez terapije sa istom težinom bolesti, što ukazuje na zaštitni efekat DMT terapije od razvoja negativnih sistemskih efekata OS kod lakšeg i umereno teškog oblika bolesti.
32. MS-žene su nakon šestomesečne DMT terapije imale značajno veći porast biomarkera sNfL u odnosu na MS-muškarce, nakon istog perioda praćenja DMT terapije.
33. Nakon šestomesečne DMT terapije, kod oba pola uočen je trend porasta kinureninske kiseline, pad nivoa hinolinske kiseline i značajan pad indeksa QA/KA, što ukazuje na zaštitni efekat ove terapije od nakupljanja neurotoksičnih metabolita KP-a.

34. Terapija lekom Copaxone[®], nakon šest meseci dovodi do značajnog porasta kinureninske kiseline, značajnog porasta S1P i opadanja indeksa QA/KA.
35. Kada se ukloni uticaj početnih vrednosti biomarkera, pre uvođenja terapije, mogu se uočiti sledeći trendovi: najveći porast sNfL je bio kod pacijenata na terapiji S1PR-modulatorima; najveći pad indeksa QA/KA je bio kod pacijenata koji su primali lekove Copaxone[®] i S1PR-modulatore.
36. Terapija S1PR-modulatorima nakon šestomesečne terapije ispoljila je potpuno suprotne efekte na nivoe S1P i sNfL u odnosu na pol: kod MS-žena uočen je porast nivoa S1P (za 5%) i sNfL (za 10%), dok je kod muškaraca uočen pad nivoa S1P (za 3,6 %) i sNfL (za 5%) u odnosu na vrednosti ovih biomarkera, pre primene S1PR-modulatora.
37. MS-pacijenti koji su u ishrani koristili kravlje mleko imali su značajno više vrednosti za MSSS skor u odnosu na MS-pacijente koji nisu konzumirali mleko, što ukazuje da konzumiranje mleka predstavlja faktor rizika za progresiji MS.

7. LITERATURA

1. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):43.
2. Walton C, King R, Rechtman L, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020;26(14):1816-1821.
3. The Multiple sclerosis international federation, Atlas of MS, Epidemiology report, 3rd Edition, 2020. Link: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2020/12/Atlas-3rd-Edition-Epidemiology-report-EN-updated-30-9-20.pdf>.
4. Interactive map of Atlas of MS 2022. Link: <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>.
5. Toncev G, Miletic Drakulic S, Knezevic Z, et al. Prevalence of multiple sclerosis in the Serbian district Sumadija. *Neuroepidemiology*. 2011;37(2):102-106.
6. GBD 2016 Multiple Sclerosis Collaborators. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019;18:269-285.
7. Sadovnick AD. Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2012;11(3):163-166.
8. Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol*. 2014;72(3-4):132-141.
9. Lill CM. Recent advances and future challenges in the genetics of multiple sclerosis. *Front Neurol*. 2014;5:130.
10. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015; 64:13-25.
11. Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and environmental factors in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(4):a028944.
12. Belbasis L, Bellou V, Tzoulaki I, Evangelou E. Early-life factors and risk of Multiple Sclerosis: An MR-EWAS. *Neuroepidemiology*. 2020;54(6):433-445.
13. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Tzoulaki I. Environmental factors and risk of multiple sclerosis: findings from meta-analyses and Mendelian randomization studies. *Mult Scler*. 2020;26(4):397-404.
14. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*. 2012; 91(2): 142-149.
15. Huang MF, Lin WL, Ma YC. A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. *Indoor Air*. 2005;15:135-140.
16. Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012; 5(1):13-22.
17. Hedström AK, Hillert J, Olsson T, et al. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol*. 2013; 28 (11):867-874.
18. Carlens C, Hergens MP, Grunewald J, et al. Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(11):1217-1222.
19. Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;73 (9): 696-701.
20. Sundström P, Nyström L, Hallmans G. Smoke exposure increases the risk for multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2008;15(6):579-583.

21. Hedström AK, Bäärnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2011;17(7):788-793.
22. Shan M, Cheng HF, Song LZ, et al. Lung myeloid dendritic cells coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema. *Sci Transl Med*. 2009;1(4):4ra10.
23. Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clin Chim Acta*. 1998;276(2):173-177.
24. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases biomarkers in multiple sclerosis. *Lancet*. 2005;365(9467):1291-1293.
25. Hernán MA, Olek MJ, Ascherio A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol*. 2001;154(1):69-74.
26. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(8):1397-1406.
27. Lucas RM, Byrne SN, Correale J, Ilschner S, Hart PH. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag*. 2015;5(5):413-424.
28. Sandberg L, Biström M, Salzer J, Vågberg M, Svenningsson A, Sundström P. Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22(8):1027-1031.
29. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients*. 2018;10(11):1656.
30. Sundström P, Salzer J. Vitamin D and multiple sclerosis—from epidemiology to prevention. *Acta Neurol Scand*. 2015;132(199):56-61.
31. Breuer J, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, et al. Ultraviolet B light attenuates the systemic immune response in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol*. 2014;75(5):739-758.
32. Abad P, Pérez M, Castro E, Alarcón T, Santibáñez R, Díaz F. Prevalencia de esclerosis múltiple en Ecuador, *Neurologia*. 2010;25(5):309-313.
33. Berg-Hansen P, Moen SM, Sandvik L, et al. Prevalence of multiple sclerosis among immigrants in Norway. *Mult Scler*. 2015;21(6):695-702.
34. Ahlgren C, Lycke J, Odén A, Andersen O. High risk of MS in Iranian immigrants in Gothenburg, Sweden. *Mult Scler*. 2010;16(9):1079-1082.
35. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*. 1995;47(4-5):425-448.
36. Ahlgren C, Odén A, Lycke J. A nationwide survey of the prevalence of multiple sclerosis in immigrant populations of Sweden. *Mult Scler*. 2012;18(8):1099-1107.
37. Makhani N, Morrow SA, Fisk J, et al. MS incidence and prevalence in Africa, Asia, Australia and New Zealand: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord*. 2014;3(1):48-60.
38. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-184.
39. Procaccini C, Pucino V, Mantzoros CS, Matarese G. Leptin in autoimmune diseases. *Metabolism*. 2015;64(1):92-104.
40. Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(14):5150-5155.
41. Matarese G, Carrieri PB, Montella S, De Rosa V, La Cava A. Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(8):455-461.
42. Butcher PJ. Milk consumption and multiple sclerosis--an etiological hypothesis. *Med Hypotheses*. 1986;19(2):169-178.

43. Malosse D, Perron H, Sasco A, Seigneurin JM. Correlation between milk and dairy product consumption and multiple sclerosis prevalence: a worldwide study. *Neuroepidemiology*. 1992;11(4-6):304-312.
44. Itoh T. Neuron–oligodendrocyte interaction in neuroinflammation. *Clin. Exp. Neuroimmunol*. 2015; 6:232–244
45. Grzegorski T, Losy J. Multiple sclerosis - the remarkable story of a baffling disease. *Rev Neurosci*. 2019;30(5):511-526.
46. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-286.
47. Paty DW, Noseworthy JH, Ebers GC. Diagnosis of multiple sclerosis. In: Paty DW, Ebers GC, editors. *Multiple sclerosis*. Philadelphia: FA Davis Company. 1997:48-51.
48. Bove R, Chitnis T. The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20(5):520-526.
49. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-1452.
50. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple sclerosis severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*. 2005;64(7):1144-1151.
51. Charlson R, Herbert J, Kister I. >CME/CNE ARTICLE: Severity Grading in Multiple Sclerosis: A Proposal. *Int J MS Care*. 2016;18(5):265-270.
52. Pittock SJ, McClelland RL, Mayr WT, et al. Clinical implications of benign multiple sclerosis: a 20-year population-based follow-up study. *Ann Neurol*. 2004;56(2):303-306.
53. DeLuca GC, Ramagopalan SV, Herrera BM, et al. An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(52):20896-20901.
54. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302.
55. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173.
56. Stepanovic-Petrovic R, Micov A. Novel approaches in the treatment of multiple sclerosis. *Arhiv za farmaciju*. 2015; 65:223-236.
57. Leussink VI, Jung S, Merschdorf U, Toyka KV, Gold R. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol*. 2001;58(1):91-97.
58. Myhr KM, Mellgren SI. Corticosteroids in the treatment of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2009;(189):73-80.
59. Prager B, Spampinato SF, Ransohoff RM. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier. *Trends Mol Med*. 2015;21(6):354-363.
60. Li H, Hu F, Zhang Y, Li K. Comparative efficacy and acceptability of disease-modifying therapies in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review and network meta-analysis. *J Neurol*. 2020;267(12):3489-3498.
61. Yong VW. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology*. 2002;59(6):802-808.
62. Cohan SL, Hendin BA, Reder AT, et al. Interferons and Multiple Sclerosis: Lessons from 25 Years of Clinical and Real-World Experience with Intramuscular Interferon Beta-1a (Avonex). *CNS Drugs*. 2021;35(7):743-767.

63. McRae BL, Semnani RT, Hayes MP, van Seventer GA. Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol.* 1998;160(9):4298-4304.
64. Nagai T, Devergne O, van Seventer GA, van Seventer JM. Interferon-beta mediates opposing effects on interferon-gamma-dependent Interleukin-12 p70 secretion by human monocyte-derived dendritic cells. *Scand J Immunol.* 2007;65(2):107-117.
65. Panitch H, Miller A, Paty D, Weinshenker B; North American Study Group on Interferon beta-1b in Secondary Progressive MS. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study. *Neurology.* 2004;63(10):1788-1795.
66. Rojas JI, Romano M, Ciapponi A, Patrucco L, Cristiano E. Interferon Beta for primary progressive multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(1):CD006643.
67. Govindappa K, Sathish J, Park K, Kirkham J, Pirmohamed M. Development of interferon beta-neutralising antibodies in multiple sclerosis--a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71(11):1287-1298.
68. Biolato M, Bianco A, Lucchini M, Gasbarrini A, Mirabella M, Grieco A. The Disease-Modifying Therapies of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis and Liver Injury: A Narrative Review. *CNS Drugs.* 2021;35(8):861-880.
69. Rocco P, Eberini I, Musazzi UM, Franzè S, Minghetti P. Glatiramer acetate: A complex drug beyond biologics. *Eur J Pharm Sci.* 2019;133:8-14.
70. Aharoni R. The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond. *Autoimmun Rev.* 2013;12(5):543-553.
71. Aharoni R. Immunomodulation neuroprotection and remyelination - the fundamental therapeutic effects of glatiramer acetate: a critical review. *J Autoimmun.* 2014;54:81-92.
72. Arnon R, Aharoni R. Glatiramer Acetate: from Bench to Bed and Back. *Isr Med Assoc J.* 2019;21(3):151-157.
73. Melnikov M, Sharanova S, Sviridova A, et al. The influence of glatiramer acetate on Th17-immune response in multiple sclerosis. *PLoS One.* 2020;15(10):e0240305.
74. Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2011;69(5):759-777.
75. Loma I, Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuropharmacol.* 2011;9(3):409-416.
76. Bordet R, Camu W, De Seze J, Laplaud DA, Ouallet JC, Thouvenot E. Mechanism of action of s1p receptor modulators in multiple sclerosis: The double requirement. *Rev Neurol (Paris).* 2020;176(1-2):100-112.
77. Olsson T, Boster A, Fernández Ó, et al. Oral ponesimod in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised phase II trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014;85(11):1198-1208.
78. Dutta R, Trapp BD. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol.* 2011;93(1):1-12.
79. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354(9):942-955.
80. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:185-217.
81. Haider L. Inflammation, Iron, Energy Failure, and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:725370.
82. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol.* 2020;11:694.

83. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11-26.
84. Adamczyk B, Niedziela N, Adamczyk-Sowa M. Novel Approaches of Oxidative Stress Mechanisms in the Multiple Sclerosis Pathophysiology and Therapy. In: Zagon IS, McLaughlin PJ, eds. *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis.* Brisbane (AU): Codon Publications; 2017.
85. Tobore TO. Oxidative/Nitroxidative Stress and Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci.* 2021;71(3):506-514.
86. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Bitzer-Quintero OK, et al. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:708659.
87. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2019;24(8):1583.
88. Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 2007;19(9):1807-1819.
89. Park CW, Macinnis DJ, Priester J, Eisingerich AB, Iacobucci D. Brand attachment and brand attitude strength: conceptual and empirical differentiation of two critical brand equity drivers. *J Mark.* 2010;74: 1–17.
90. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(3):a028936.
91. Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S. Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2008;444(2):195-198.
92. Chiurchiù V, Orlacchio A, Maccarrone M. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7909380.
93. Lassmann H, van Horssen J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(3):506-510.
94. Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease?. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(1):66-79.
95. Tobore TO. On elucidation of the role of mitochondria dysfunction and oxidative stress in multiple sclerosis. *Neurology and Clinical Neuroscience.* 2019; 7:305–317.
96. Dutta R, McDonough J, Yin X, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2006;59(3):478-489.
97. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci.* 2007;257(1-2):221-239.
98. Lee JY, Taghian K, Petratos S. Axonal degeneration in multiple sclerosis: can we predict and prevent permanent disability?. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:97.
99. Pérez-De La Cruz V, Elinos-Calderón D, Carrillo-Mora P, et al. Time-course correlation of early toxic events in three models of striatal damage: modulation by proteases inhibition. *Neurochem Int.* 2010;56(6-7):834-842.
100. Lugo-Huitrón R, Ugalde Muñoz P, Pineda B, Pedraza-Chaverrí J, Ríos C, Pérez-de la Cruz V. Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:104024.

101. Winiarska-Mieczan A, Baranowska-Wójcik E, Kwiecień M, et al. The Role of Dietary Antioxidants in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases and Their Impact on Cerebral Oxidoreductive Balance. *Nutrients*. 2020;12(2):435.
102. Miller ED, Dziedzic A, Saluk-Bijak J, Bijak M. A Review of Various Antioxidant Compounds and their Potential Utility as Complementary Therapy in Multiple Sclerosis. *Nutrients*. 2019;11(7):1528.
103. Moezzi D, Dong Y, Jain RW, et al. Expression of antioxidant enzymes in lesions of multiple sclerosis and its models. *Sci Rep*. 2022;12(1):12761.
104. Andreoli TE. Free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000;108(8):650-651.
105. Winiarska-Mieczan A. Protective effect of tea against lead and cadmium-induced oxidative stress-a review. *Biometals*. 2018;31(6):909-926.
106. Pejic S, Stojikjkovic V, Todorovic A, et al. Antioxidant Enzymes in Brain Cortex of Rats Exposed to Acute, Chronic and Combined Stress. *Folia Biol (Krakow)*. 2016;64(3):189-195.
107. Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*. 1985;121(3):531-551.
108. Hewagama A, Patel D, Yarlagadda S, Strickland FM, Richardson BC. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun*. 2009;10(5):509-516.
109. Su LF, Kidd BA, Han A, Kotzin JJ, Davis MM. Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity*. 2013;38(2):373-383.
110. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *Am J Pathol*. 2008;173(3):600-609.
111. Zandman-Goddard G, Peeva E, Shoenfeld Y. Gender and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2007;6(6):366-372.
112. Ziemssen T, Akgün K, Brück W. Molecular biomarkers in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):272.
113. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277-285.
114. Erel, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-1111.
115. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*. 2005;100(1):61-64.
116. Cadet J, Davies KJA, Medeiros MH, Di Mascio P, Wagner JR. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic Biol Med*. 2017;107:13-34.
117. Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biol*. 2018;14:669-678.
118. Li H, Hao X, Zhang W, Wei Q, Chen K. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(7):1739-1745.
119. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2009;27(2):120-139.
120. Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(5):891-937.

121. Cooke MS, Olinski R, Loft S; European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(1):3-14.
122. Evans MD, Sapparbaev M, Cooke MS. DNA repair and the origins of urinary oxidized 2'-deoxyribonucleosides. *Mutagenesis.* 2010;25(5):433-442.
123. Pawlas N, Olewińska E, Markiewicz-Górka I, et al. Oxidative damage of DNA in subjects occupationally exposed to lead. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(6):939-945.
124. Lee KF, Chung WY, Benzie IF. Urine 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), a specific marker of oxidative stress, using direct, isocratic LC-MS/MS: Method evaluation and application in study of biological variation in healthy adults. *Clin Chim Acta.* 2010;411(5-6):416-422.
125. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Nielsen PE, Weimann A. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(2):801-808.
126. Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2010;78(5):486-494.
127. Mesaros C, Arora JS, Wholer A, Vachani A, Blair IA. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine as a biomarker of tobacco-smoking-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(3):610-617.
128. Dherin C, Radicella JP, Dizdaroglu M, Boiteux S. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(20):4001-4007.
129. Karahalil B, Emerce E, Koçer B, Han S, Alkiş N, Karakaya AE. The association of OGG1 Ser326Cys polymorphism and urinary 8-OHdG levels with lung cancer susceptibility: a hospital-based case-control study in Turkey. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2008;59(4):241-250.
130. Soliman AHM, Zaki NN, Fathy HM, Mohamed AA, Ezzat MA, Rayan A. Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, and XRCC3 DNA repair genes and DNA damage in radiotherapy workers. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(35):43786-43799.
131. Török N, Tanaka M, Vécsei L. Searching for Peripheral Biomarkers in Neurodegenerative Diseases: The Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9338.
132. Mor A, Tankiewicz-Kwedlo A, Krupa A, Pawlak D. Role of Kynurenine Pathway in Oxidative Stress during Neurodegenerative Disorders. *Cells.* 2021;10(7):1603.
133. Nourbakhsh B, Bhargava P, Tremlett H, Hart J, Graves J, Waubant E. Altered tryptophan metabolism is associated with pediatric multiple sclerosis risk and course. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018;5(10):1211-1221.
134. Lovelace MD, Varney B, Sundaram G, et al. Current Evidence for a Role of the Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2016;7:246.
135. Pukoli D, Polyák H, Rajda C, Vécsei L. Kynurenines and Neurofilament Light Chain in Multiple Sclerosis. *Front Neurosci.* 2021;15:658202.
136. Mándi Y, Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm (Vienna).* 2012;119(2):197-209.
137. Braidy N, Grant R, Adams S, Guillemin GJ. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *FEBS J.* 2010;277(2):368-382.

138. Guillemain GJ. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* 2012;279(8):1356-1365.
139. Hartai Z, Klivenyi P, Janaky T, Penke B, Dux L, Vecsei L. Kynurenine metabolism in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2005;112(2):93-96.
140. Vecsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(1):64-82.
141. Garrison AM, Parrott JM, Tuñon A, Delgado J, Redus L, O'Connor JC. Kynurenine pathway metabolic balance influences microglia activity: Targeting kynurenine monooxygenase to dampen neuroinflammation. *Psychoneuroendocrinology.* 2018;94:1-10.
142. Sandberg-Wollheim M, Olsson T. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: Yes. *Mult Scler.* 2013;19(6):714-716.
143. Paul A, Comabella M, Gandhi R. Biomarkers in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(3):a029058
144. Varhaug KN, Torkildsen Ø, Myhr KM, Vedeler CA. Neurofilament Light Chain as a Biomarker in Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2019;10:338.
145. Disanto G, Barro C, Benkert P, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2017;81(6):857-870.
146. Maggi P, Kuhle J, Schädelin S, et al. Chronic White Matter Inflammation and Serum Neurofilament Levels in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 2021;97(6):e543-e553.
147. Ziemssen T, Arnold DL, Alvarez E, et al. Prognostic Value of Serum Neurofilament Light Chain for Disease Activity and Worsening in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis: Results From the Phase 3 ASCLEPIOS I and II Trials. *Front Immunol.* 2022;13:852563.
148. Manouchehrinia A, Stridh P, Khademi M, et al. Plasma neurofilament light levels are associated with risk of disability in multiple sclerosis. *Neurology.* 2020;94(23):e2457-e2467.
149. Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest.* 2015;125(4):1379-1387.
150. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121-127.
151. Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(4):2137-2145.
152. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques.* 1997;22(3):474-481.
153. Marmiroli N, Maestri E. Polymerase chain reaction (PCR). *Food toxicants analysis.* Elsevier. 2007; 147-187.
154. Padureanu R, Albu CV, Mititelu RR, et al. Oxidative Stress and Inflammation Interdependence in Multiple Sclerosis. *J Clin Med.* 2019;8(11):1815.
155. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 2012;322(1-2):254-262.
156. Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, et al. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain.* 2009;132(Pt 5):1161-1174.
157. Dake MD, Zivadinov R, Haacke EM. Chronic cerebrospinal venous insufficiency in multiple sclerosis: a historical perspective. *Funct Neurol.* 2011;26(4):181-195.
158. Correale J, Marrodan M, Ysraelit MC. Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in Progressive Multiple Sclerosis. *Biomedicines.* 2019;7(1):14.

159. Kirbas A, Kirbas S, Anlar O, Efe H, Yilmaz A. Serum paraoxonase and arylesterase activity and oxidative status in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci.* 2013;20(8):1106-1109.
160. Acar A, Ugur Cevik M, Evliyaoglu O, et al. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg.* 2012;112(3):275-280.
161. Tasset I, Agüera E, Sánchez-López F, et al. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem.* 2012;45(6):440-444.
162. Gonzalo H, Nogueras L, Gil-Sánchez A, et al. Impairment of Mitochondrial Redox Status in Peripheral Lymphocytes of Multiple Sclerosis Patients. *Front Neurosci.* 2019;13:938.
163. Pasquali L, Pecori C, Lucchesi C, et al. Plasmatic oxidative stress biomarkers in multiple sclerosis: relation with clinical and demographic characteristics. *Clin Biochem.* 2015;48(1-2):19-23.
164. Gironi M, Borgiani B, Mariani E, et al. Oxidative stress is differentially present in multiple sclerosis courses, early evident, and unrelated to treatment. *J Immunol Res.* 2014;2014:961863.
165. Zoccolella S, Tortorella C, Iaffaldano P, et al. Low serum urate levels are associated to female gender in multiple sclerosis patients. *PLoS One.* 2012;7(7):e40608.
166. Bove R, Chitnis T. Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol.* 2013;149(2):201-210.
167. Tomassini V, Pozzilli C. Sex hormones, brain damage and clinical course of Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009;286(1-2):35-39.
168. Harbo HF, Gold R, Tintoré M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 2013;6(4):237-248.
169. Voskuhl RR, Patel K, Paul F, et al. Sex differences in brain atrophy in multiple sclerosis. *Biol Sex Differ.* 2020;11(1):49.
170. Magyari M, Koch-Henriksen N. Quantitative effect of sex on disease activity and disability accumulation in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2022;93(7):716-722.
171. Leffler J, Trend S, Gorman S, Hart PH. Sex-Specific Environmental Impacts on Initiation and Progression of Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2022;13:835162.
172. Jacobs AL, Schär P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma.* 2012;121(1):1-20.
173. Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a012583.
174. Graille M, Wild P, Sauvain JJ, Hemmendinger M, Guseva Canu I, Hopf NB. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):3743.
175. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2011;134(Pt 7):1914-1924.
176. Vladimirova O, O'Connor J, Cahill A, Alder H, Butunoi C, Kalman B. Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Mult Scler.* 1998;4(5):413-418.
177. Topic A, Francuski D, Markovic B, et al. Gender-related reference intervals of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in Serbian population. *Clin Biochem.* 2013;46(4-5):321-326.
178. Gan W, Liu XL, Yu T, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanosine as a Potential Biomarker of Aging. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:34.

179. Hofer T, Karlsson HL, Möller L. DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors. *Free Radic Res.* 2006;40(7):707-714.
180. Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 2010;5(4):e10164.
181. Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó FV. Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2005;2005(23):pe17.
182. Gorini F, Scala G, Cooke MS, Majello B, Amente S. Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability. *DNA Repair (Amst).* 2021;97:103027.
183. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. The Role of Environment and Lifestyle in Determining the Risk of Multiple Sclerosis. *Curr Top Behav Neurosci.* 2015;26:87-104.
184. Ghadirian P, Dadgostar B, Azani R, Maisonneuve P. A case-control study of the association between socio-demographic, lifestyle and medical history factors and multiple sclerosis. *Can J Public Health.* 2001;92(4):281-285.
185. Pekmezovic T, Drulovic J, Milenkovic M, et al. Lifestyle factors and multiple sclerosis: A case-control study in Belgrade. *Neuroepidemiology.* 2006;27(4):212-216.
186. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L. Smoking is a major preventable risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2016;22(8):1021-1026.
187. Ayaori M, Hisada T, Suzukawa M, et al. Plasma levels and redox status of ascorbic acid and levels of lipid peroxidation products in active and passive smokers. *Environ Health Perspect.* 2000;108(2):105-108.
188. Dietrich M, Block G, Norkus EP, et al. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma-tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(1):160-166.
189. Villard-Mackintosh L, Vessey MP. Oral contraceptives and reproductive factors in multiple sclerosis incidence. *Contraception.* 1993;47(2):161-168
190. van der Mei IA, Simpson S Jr, Stankovich J, Taylor BV. Individual and joint action of environmental factors and risk of MS. *Neurol Clin.* 2011;29(2):233-255.
191. Emre M, de Decker C. Effects of cigarette smoking on motor functions in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 1992;49(12):1243-1247.
192. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-126.
193. Benowitz NL, Lessov-Schlaggar CN, Swan GE, Jacob P 3rd. Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79(5):480-488.
194. Ysraelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology.* 2019;156(1):9-22.
195. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;9(6):599-612.
196. Hedström AK, Olsson T, Kockum I, Hillert J, Alfredsson L. Low sun exposure increases multiple sclerosis risk both directly and indirectly. *J Neurol.* 2020;267(4):1045-1052.
197. van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, et al. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ.* 2003;327(7410):316.
198. Bjørnevik K, Riise T, Casetta I, et al. Sun exposure and multiple sclerosis risk in Norway and Italy: The EnvIMS study. *Mult Scler.* 2014;20(8):1042-1049.

199. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol*. 2007;254(4):471-477.
200. Sebastian P, Cherbuin N, Barcellos LF, et al. Association Between Time Spent Outdoors and Risk of Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2022;98(3):e267-e278.
201. Li D, Liu H, Yan L, Tang Y, Ren J, Xu Z. Lack of association between hOGG1 Ser326Cys polymorphism and the risk of bladder cancer: a meta-analysis. *Urol Int*. 2012;88(1):88-94.
202. Wang Y, Gao X, Wei F, et al. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism contributes to digestive system cancer susceptibility: evidence from 48 case-control studies. *Tumour Biol*. 2015;36(2):1029-1038.
203. Zhang J, Zhou J, Zhang P, Wang W, Tao S, Wang M. A meta-analysis of the association between the hOGG1 Ser326Cys polymorphism and the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(6):e65742
204. Wang W, Dang S, Li Y, et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma among East Asians: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(4):e60178.
205. Xu H, Zhang M, Hao Z, Liang C. hOGG1 rs1052133 Polymorphism and Prostate Cancer Risk: A Chinese Case-Control Study and Meta-Analysis. *Med Sci Monit*. 2022;28:e938012.
206. Kang SW, Kim SK, Park HJ, Chung JH, Ban JY. Human 8-oxoguanine DNA glycosylase gene polymorphism (Ser326Cys) and cancer risk: updated meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(27):44761-44775.
207. Corella D, Ramírez-Sabio JB, Coltell O, et al. Effects of the Ser326Cys Polymorphism in the DNA Repair OGG1 Gene on Cancer, Cardiovascular, and All-Cause Mortality in the PREDIMED Study: Modulation by Diet. *J Acad Nutr Diet*. 2018;118(4):589-605.
208. Zou H, Li Q, Xia W, Liu Y, Wei X, Wang D. Association between the OGG1 Ser326Cys Polymorphism and Cancer Risk: Evidence from 152 Case-Control Studies. *J Cancer*. 2016;7(10):1273-1280.
209. National Center for Biotechnology Information, NCBI, 2022.
Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1052133>.
210. Karahalil B, Orhan G, Ak F. The impact of detoxifying and repair gene polymorphisms and the levels of serum ROS in the susceptibility to multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;139:288-294.
211. Lee AJ, Hodges NJ, Chipman JK. Interindividual variability in response to sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: role of the Ser326Cys polymorphism in the DNA-repair protein of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA glycosylase 1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):497-505.
212. Weiss JM, Goode EL, Ladiges WC, Ulrich CM. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog*. 2005;42(3):127-141.
213. Shinmura K, Kohno T, Kasai H, Koda K, Sugimura H, Yokota J. Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. *Jpn J Cancer Res*. 1998;89(8):825-828.
214. Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, et al. The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21(2):167-172.
215. Park YJ, Choi EY, Choi JY, Park JG, You HJ, Chung MH. Genetic changes of hOGG1 and the activity of oh8Gua glycosylase in colon cancer. *Eur J Cancer*. 2001;37(3):340-346.

216. Janssen K, Schlink K, Götte W, Hippler B, Kaina B, Oesch F. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat Res.* 2001;486(3):207-216.
217. Tarng DC, Tsai TJ, Chen WT, Liu TY, Wei YH. Effect of human OGG1 1245C-->G gene polymorphism on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels of leukocyte DNA among patients undergoing chronic hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(11):2338-2347.
218. Chen SK, Hsieh WA, Tsai MH, et al. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *J Radiat Res.* 2003;44(1):31-35.
219. Yamane A, Kohno T, Ito K, et al. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Carcinogenesis.* 2004;25(9):1689-1694.
220. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology.* 2019;92(10):e1007-e1015.
221. Edwards KR, Garten L, Button J, O'Connor J, Kamath V, Frazier C. Neurofilament light chain as an indicator of exacerbation prior to clinical symptoms in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;31:59-61.
222. Bjornevik K, Munger KL, Cortese M, et al. Serum Neurofilament Light Chain Levels in Patients With Presymptomatic Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2020;77(1):58-64.
223. Kuhle J, Barro C, Disanto G, et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler.* 2016;22(12):1550-1559.
224. Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology.* 2017;89(22):2230-2237.
225. Bridel C, Verberk IMW, Heijst JJA, Killestein J, Teunissen CE. Variations in consecutive serum neurofilament light levels in healthy controls and multiple sclerosis patients. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;47:102666.
226. van der Vuurst de Vries RM, Wong YYM, Mescheriakova JY, et al. High neurofilament levels are associated with clinically definite multiple sclerosis in children and adults with clinically isolated syndrome. *Mult Scler.* 2019;25(7):958-967.
227. Siller N, Kuhle J, Muthuraman M, et al. Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2019;25(5):678-686.
228. Lewin A, Hamilton S, Witkover A, et al. Free serum haemoglobin is associated with brain atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *Wellcome Open Res.* 2016;1:10.
229. Thuy AV, Reimann CM, Hemdan NY, Gräler MH. Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(1):158-171.
230. Hagen N, Hans M, Hartmann D, Swandulla D, van Echten-Deckert G. Sphingosine-1-phosphate links glycosphingolipid metabolism to neurodegeneration via a calpain-mediated mechanism. *Cell Death Differ.* 2011;18(8):1356-1365.
231. Miller LG Jr, Young JA, Ray SK, et al. Sphingosine Toxicity in EAE and MS: Evidence for Ceramide Generation via Serine-Palmitoyltransferase Activation. *Neurochem Res.* 2017;42(10):2755-2768.
232. Kułakowska A, Zendzian-Piotrowska M, Baranowski M, et al. Intrathecal increase of sphingosine 1-phosphate at early stage multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2010;477(3):149-152.

233. Lovelace MD, Varney B, Sundaram G, et al. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology* 2017;112(Pt B):373-388.
234. Rajda C, Galla Z, Polyák H, et al. Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Chain Is Associated with Kynurenine Pathway Metabolite Changes in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2665.
235. Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, et al. On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol.* 2011;33(5):538-547.
236. Zwillling D, Huang SY, Sathyasaikumar KV, et al. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell.* 2011;145(6):863-874.
237. Guillemín GJ, Kerr SJ, Smythe GA, et al. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem.* 2001;78(4):842-853.
238. Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(7):465-477.
239. Pláteník J, Stopka P, Vejrazka M, Stípek S. Quinolinic acid-iron(ii) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the Fenton reaction. *Free Radic Res.* 2001;34(5):445-459.
240. Yan J, Kothur K, Mohammad S, et al. CSF neopterin, quinolinic acid and kynurenine/tryptophan ratio are biomarkers of active neuroinflammation. *EBioMedicine.* 2023;91:104589.
241. Sundaram G, Brew BJ, Jones SP, Adams S, Lim CK, Guillemín GJ. Quinolinic acid toxicity on oligodendroglial cells: relevance for multiple sclerosis and therapeutic strategies. *J Neuroinflammation.* 2014;11:204.
242. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, et al.ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis [published correction appears in *Mult Scler.* 2020;26(4):517]. *Mult Scler.* 2018;24(2):96-120.
243. Pegoretti V, Swanson KA, Bethea JR, Probert L, Eisel ULM, Fischer R. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:7191080.
244. English C, Aloí JJ. New FDA-Approved Disease-Modifying Therapies for Multiple Sclerosis. *Clin Ther.* 2015;37(4):691-715.
245. Sadowska-Bartosz I, Adameczyk-Sowa M, Galiniak S, Mucha S, Pierzchala K, Bartosz G. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. *Neurochem Int.* 2013;63(5):507-516.
246. Langemann H, Kabiersch A, Newcombe J. Measurement of low-molecular-weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 1992;32(5):248-252.
247. Obradovic D, Andjelic T, Ninkovic M, Dejanovic B, Kotur-Stevuljevic J. Superoxide dismutase (SOD), advanced oxidation protein products (AOPP), and disease-modifying treatment are related to better relapse recovery after corticosteroid treatment in multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2021;42(8):3241-3247.
248. Li R, Sun X, Shu Y, et al. Sex differences in outcomes of disease-modifying treatments for multiple sclerosis: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;12:23-28.

249. 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(Pt 3):886-899.
250. Faraji F, Hashemi M, Ghiasabadi A, et al. Combination therapy with interferon beta-1a and sesame oil in multiple sclerosis. *Complement Ther Med*. 2019;45:275-279.
251. Narasimhulu CA, Selvarajan K, Litvinov D, Parthasarathy S. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory actions of sesame oil. *J Med Food*. 2015;18(1):11-20.
252. Hsu DZ, Liu CT, Li YH, Chu PY, Liu MY. Protective effect of daily sesame oil supplement on gentamicin-induced renal injury in rats. *Shock*. 2010;33(1):88-92.
253. Bravo GÁ, Cedeño RR, Casadevall MP, Ramió-Torrentà L. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway Modulators, from Current Insights to Future Perspectives. *Cells*. 2022;11(13):2058.
254. Yevgi R, Demir R. Oxidative stress activity of fingolimod in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2021;202:106500.
255. Piehl F, Kockum I, Khademi M, et al. Plasma neurofilament light chain levels in patients with MS switching from injectable therapies to fingolimod. *Mult Scler*. 2018;24(8):1046-1054.
256. Varhaug KN, Barro C, Bjørnevik K, et al. Neurofilament light chain predicts disease activity in relapsing-remitting MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017;5(1):e422.
257. Fathi M, Vakili K, Yaghoobpoor S, et al. Dynamic changes in kynurenine pathway metabolites in multiple sclerosis: A systematic review. *Front Immunol*. 2022;13:1013784.
258. Lim CK, Bilgin A, Lovejoy DB, et al. Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. *Sci Rep*. 2017;7:41473.
259. Guillemain GJ, Kerr SJ, Pemberton LA, et al. IFN-beta1b induces kynurenine pathway metabolism in human macrophages: potential implications for multiple sclerosis treatment. *J Interferon Cytokine Res*. 2001;21(12):1097-1101.
260. Jahromi SR, Toghae M, Jahromi MJ, Aloosh M. Dietary pattern and risk of multiple sclerosis. *Iran J Neurol*. 2012;11(2):47-53.
261. Munger KL, Chitnis T, Frazier AL, Giovannucci E, Spiegelman D, Ascherio A. Dietary intake of vitamin D during adolescence and risk of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2011;258(3):479-485.
262. Nentwich I, Szepfalusi ZS, Kunz C, Spuergin P, Urbanek R. Antigenicity for humans of cow milk caseins, casein hydrolysate and casein hydrolysate fractions. *Acta Vet*. 2004; 73: 291-298.
263. Chunder R, Weier A, Mäurer H, et al. Antibody cross-reactivity between casein and myelin-associated glycoprotein results in central nervous system demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(10):e2117034119.
264. Guggenmos J, Schubart AS, Ogg S, et al. Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2004;172(1):661-668.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Vasić je rođena 28.02.1978. godine u Ljuboviji. Osnovnu školu završila je u Ljuboviji, dok je srednju Medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, završila u Šapcu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar upisala je 1998. godine, a završila 2004. godine sa prosečnom ocenom 8,31 i ocenom 10 za završni rad. Po završetku fakulteta, obavila je pripravnički staž u Službi za laboratorijsku dijagnostiku, KBC “Dr. Dragiša Misović” i položila stručni ispit za diplomirane farmaceute-medicinske biohemičare u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije 2005. godine. Školske 2012/2013. upisala je specijalističke studije za potrebe zdravstva, studijski program medicinska biohemija, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i završila ih polaganjem specijalističkog ispita 24.02.2016. godine sa ocenom „odličan“. Doktorske akademske studije, modul Medicinska biohemija upisala je školske 2017/2018. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 2007. godine je zaposlena u Institutu za medicinsku biohemiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu, gde i danas radi na mestu načelnika Odseka za urgentne analize. Od 2022. godine je mentor studentske stručne prakse za studente integrisanih studija na studijskom program Farmacija-medicinska biohemija, Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta. Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije i član je Komore biohemičara Srbije. Autor je dva originalna rada objavljena u međunarodnim časopisima.

9. IZJAVE

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Васић

Број индекса 32/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај оксидативног стреса и кинуренинског пута метаболизма триптофана у настанку и развоју мултипле склерозе у популацији Србије

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 18.01.2024.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Васић

Број индекса 32/2017

Студијски програм Докторске академске студије модул Медицинска биохемија

Наслов рада Значај оксидативног стреса и кинуренинског пута метаболизма триптофана у настанку и развоју мултипле склерозе у популацији Србије

Ментор Проф. др Александра Топић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 18.01.2024.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Значај оксидативног стреса и кинуренинског пута метаболизма триптофана у настанку и развоју мултипле склерозе у популацији Србије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 18.01.2024.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.