



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**КАТАРИНА ВЕСИЋ**

**УТИЦАЈ НИВОА МОКРАЋНЕ КИСЕЛИНЕ У СЕРУМУ НА ЗАМОР**  
**КОД ПАЦИЈЕНАТА СА МУЛТИПЛОМ СКЛЕРОЗОМ**

**Докторска дисертација**

**Ментор: др сци. мед. Гордана Тончев, редовни професор**

**Крагујевац, 2019.године**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Катарина Весић
Датум и место рођења: 12.06.1980. године, Крагујевац
Садашње запослење: Истраживач сарадник за ужу научну област Неурологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Утицај нивоа мокраћне киселине у серуму на замор код пацијената са мултиплом склерозом
Број страница: 111
Број слика: 7
Број библиографских података: 254
Установа и место где је рад израђен: Клиника за неурологију, Клинички центар Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина, Неурологија
Ментор: Проф. др Гордана Тончев
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 09.06.2015
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-268/10 од 13.04.2016
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:  Проф. др Светлана Милетић Дракулић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неурологија, председник комисије  Проф. др Јелена Друловић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Неурологија, члан комисије  Доц. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан комисије
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:  Проф. др Јелена Друловић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Неурологија, председник комисије  Проф. др Слободан Војиновић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Неурологија, члан комисије  Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан комисије
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

Оксидативни стрес и неуроинфламација имају значајну улогу у патогенези мултипле склерозе (Multiple Sclerosis-MS). Код оболелих од MS замор је један од најчешћих узрока неуролошке онеспособљености. Замор се може јавити као самостални симптом али може бити и манифестација депресије.

У овој студији мерили смо ниво мокраћне киселине (Uric Acid- UA) у серуму, као маркер оксидативног стреса и ниво Ц-реактивног протеина (C – Reactive Protein - CRP) у серуму, као маркер неуроинфламације. У студију је укључено 98 MS болесника у фази релапса и ремисије. Контролну групу је сачињавало 35 здравих добровољаца. Степен депресивне симптоматологије је мерен помоћу Бекове скале депресивности (Beck's Depression Inventory - BDI) а степен замора помоћу Крупове скале замора (Fatigue Severity Scale- FSS). Главни циљ истраживања је био да се испита да ли нивои UA и CRP у серуму корелирају са депресивном симптоматологијом и замором. MS оболели у релапсу и ремисији су имали значајно ниже нивое UA у серуму у односу на здраве ( $236.97 \pm 9.25 \mu\text{mol/L}$  vs.  $268.27 \pm 0.09 \mu\text{mol/L}$  vs  $314.82 \pm 11.02 \mu\text{mol/L}$ ;  $p=0.000$ ). Ниво CRP у серуму је био значајно виши у MS групи у релапсу у поређењу са MS групом у ремисији ( $4.46 \pm 0.40 \text{mg/L}$  vs.  $1.01 \pm 0.38 \text{mg/L}$ ;  $p=0.000$ ). Средње вредности BDI скара су биле значајно веће код MS групе у релапсу ( $15.68 \pm 16.62$  vs.  $8.36 \pm 7.10$ ;  $p=0.045$ ). Опсервирана је слаба негативна корелација између нивоа UA у серуму и присуства осећаја туге, као и отежаног обављања свакодневних животних активности. Уочена је позитивна корелација између нивоа CRP у серуму и депресивне симптоматологије, као и између депресивне симптоматологије и замора ( $p<0.05$ ).

Неуроинфламација и оксидативни стрес имају утицаја на замор и депресију код MS. Ниже вредности UA у серуму могу преципитирати осећај туге и утицати на способност обављања свакодневних животних активности а свако повећање серумског нивоа CRP током релапса, на овом терену може даље преципитирати настанак депресије. Због могућности да замор представља продромални симптом депресије веома је важна његова рана детекција и примена адекватних терапијских мера, могуће чак и антидепресива.

**Кључне речи:** Мултипла склероза, мокраћна киселина, Ц-реактивни протеин, замор, депресија.

## **ABSTRACT**

Oxidative stress and neuroinflammation have a role in the pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS) and in depression. Fatigue is the most disabling symptom in patients with MS and could also be a part of depressive symptomatology.

In this study we measured the serum levels of Uric Acid (UA) as a marker of oxidative stress and C – Reactive Protein (CRP) as an inflammatory marker, in 98 patients with MS in relapse and remitting phase of illness and 35 healthy subjects. Degree of depressive symptomatology and fatigue were assessed with Beck's Depression Inventory (BDI) and Fatigue Severity Scale (FSS). Further we examined the possible correlation of these biomarkers with symptoms of depression and fatigue. Relapse and remitting MS had a lower serum UA levels than controls ( $236.97\pm 9.25\mu\text{mol/L}$  vs.  $268.27\pm 0.09\mu\text{mol/L}$  vs  $314.82\pm 11.02\mu\text{mol/L}$ ;  $p=0.000$ ), while sera levels of CRP were higher in relapse than remitting patients ( $4.46\pm 0.40\text{mg/L}$  vs.  $1.01\pm 0.38\text{mg/L}$ ;  $p=0.000$ ). Patients in relapse had higher BDI scores ( $15.68\pm 16.62$  vs.  $8.36\pm 7.10$ ;  $p=0.045$ ). Decreased UA levels showed weak negative correlation with presence of sadness and disturbed daily activities, higher CRP levels positively correlated with severe depression and the correlation between depression and fatigue was also observed ( $p<0.05$ ).

It is possible that decreased UA levels lead to sadness, disturbed daily activities and severe disability. Every attack of CRP elevation in relapse could additionally precipitate the depression onset. The clinicians must pay special attention to fatigue early detection, because it could precede depression and improve further treatment.

**Keywords:** multiple sclerosis, uric acid, C reactive protein, fatigue, depression.

## **ЗАХВАЛНИЦА**

*Желим да се захвалим својој менторки Проф. др Гордани Тончев што је најпре у мени подстакла жељу да се бавим мултиплом склерозом, на указаним приликама, на помоћи око идеје за ову докторску дисертацију као и стручним и пријатељским саветима који су у критичним моментима били од изузетног значаја.*

*Захваљујем се колегама са Клинике за неурологију Клиничког центра Крагујевац на помоћи у реализацији самог истраживања, посебно надзорној сестри Одељења за демјелинизирајуће болести Мирјани Петровић која је са мном делила ентузијазам и у великој мери ми помогла да дођем до циља. Такође велику захвалност дугујем Служби за лабораторијску дијагностику и др Снежани Радивојевић као и свим колегама Службе за снабдевање крвљу и крвним продуктима, који су ме топло прихватили и помогли у битним сегментима истраживачког процеса.*

*Захваљујем се свим болесницима оболелим од мултипле склерозе који су прихватили учешће и били део овог истраживања у за њих, веома тешким животним моментима.*

*Желим да изразим посебну захвалност својој пријатељици Доц. др Милицы Боровчанин што ми је била велика подршка, што је несебично и безусловно своје знање поделила са мном и што је својим стручним саветима и сугестијама учинила ову дисертацију бољом.*

*Највећу захвалност дугујем својим родитељима који су током мог вишедеценијског школовања увек проналазили начин и заједно са мном следили моје снове, својим сестрама Дуњи и Марини, сестричини Тамари на спремности да ме увек саслушају, истрпе али и мотивишу.*

*На крају све ово не би било могуће без безграничне подршке мог супруга Саше и моје ћерке Нађе који су својом љубављу и стрпљењем мом раду дали смисао.*

*Посвећујем својим родитељима*

# Садржај

<b>1. УВОД.....</b>	<b>9</b>
1.1. МУЛТИПЛА СКЛЕРОЗА КАО КЛИНИЧКИ ЕНТИТЕТ .....	9
1.2. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА И ЕТИОЛОГИЈА МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ.....	11
1.3. ПАТОГЕНЕЗА МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ.....	14
1.3.1. Неуроинфламација и оксидативни стрес .....	14
1.3.2. Улога мокраћне киселине у оксидативном стресу .....	20
1.4. КЛИНИЧКЕ ФОРМЕ И КЛИНИЧКА СЛИКА МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ .....	22
1.4.1. Клиничке форме мултипле склерозе .....	22
1.4.2. Симптоми и знаци мултипле склерозе .....	25
1.4.3. Замор у мултиплој склерози .....	27
1.4.4. Депресија у мултиплој склерози .....	28
1.5. ТЕРАПИЈА МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ .....	30
1.5.1 Терапија релапса .....	30
1.5.2. Имуномодулаторна терапија-интерферон бета 1а .....	31

<b>2. ЦИЉЕВИ РАДА .....</b>	<b>34</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>36</b>
3.1. Дијагноза мултипле склерозе .....	36
3.2. Испитивани узорак .....	42
3.3. Истраживачки поступк .....	43
3.3.1. Одређивање серумских концентрација мокраћне киселине и Ц реактивног протеина .....	44
3.3.2. Инструменти клиничко-неуролошке процене .....	45
3.4. Статистичка анализа података .....	48
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>49</b>
4.1. Демографске и клиничке карактеристике испитаника .....	49
4.2. Серумски нивои мокраћне киселине код испитаника .....	55
4.3. Серумски нови Ц реактивног протеина код испитаника .....	60
4.4. Скорови клиничких скала процене .....	62
4.5. Корелације мокраћне киселине са клиничким скалама процене .....	65
4.6. Корелације Ц реактивног протеина са клиничким скалама процене .....	66
4.7. Утицај социодемографских и клиничких параметара на болест, замор и депресију.....	69
4.8. Предиктори замора и депресије код испитаника.....	72



<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>74</b>
5.1. Мокраћна киселина -маркер оксидативног стреса у мултиплој склерози.....	75
5.2. Ц реактивни протеин-маркер неуроинфламације у мултиплој склерози .....	78
5.3. Замор и депресија у мултиплој склерози .....	80
5.4. Утицај оксидативног стреса и неуроинфламације на замор и депресију .....	84
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ .....</b>	<b>90</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>92</b>
<b>8. ПРИЛОЗИ .....</b>	<b>112</b>
8.1 Општи упитник.....	112
8.2 Крупова скала замора.....	114
8.3 Бекова скала депресивности.....	115
8.4 Биографија .....	119
8.5 Библиографија.....	120
8.6 Кључна документацијска информатика.....	121
8.7 Key words documentation.....	124
8.8 Образац 1.....	126
8.9 Образац 2.....	127
8.10 Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације.....	128

## 1. УВОД

### 1.1. Мултипла склероза као клинички ентитет

Мултипла склероза (Multiple Sclerosis - MS) је хронична инфламаторна болест централног нервног система која се патофизиолошки карактерише деструкцијом мијелина (демијелинизацијом), хроничном инфламацијом, глиозом, оштећењем олигодендроцита и аксона.

Један од првих, незваничних књижевних описа MS налази се у дневнику Fridriha Augusta Estea (1794-1843), у ком је описао своје симптоме у виду смањења оштрине вида, дуплих слика и слабости у ногама (1). Прве клиничке и патоанатомске описе MS су дали британски професор Robert Carswell и француски професор патолошке анатомије Jean Cruveilhier 1835. године. Cruveilhier је у свом атласу „Патолошка анатомија људског тела“ описао болест која настаје због дегенерације путева у кичменој моздини, назвавши је параплегија а патолошки процес је описао као мрљасту склерозу. 1849. године, Frerich је описао болест, коју је назвао „спинална склероза“ коју је карактерисало смењивање фаза ремисије и егзарcebације, моторне слабости и поремећај функције кранијалних нерава. Менталне промене се први пут код оболелих од MS описују 1856.године (2).

Највећи допринос у описивању клиничке слике, сагледавању природе и прогресије MS дао је оснивач модерне неурологије, француски лекар Jean-Martin Charcot који је шездесетих година 19. века дефинисао Шаркоов тријас: скандиран говор, тремор и невољне очне покрете. 1868. године патохистолошком анализом танких исечака мозга пацијенткиње коју је лечио, уочио је оштећења нервних влакана која је назвао „плаковима“,

пролиферацију глијалних влакана и периваскуларну акумулацију фагоцита уз очување аксона. Болест је назвао „sclerose en plaques“ (2, 3).

1873. године, енглески неуролог Walter Moxon по први пут издваја MS као засебан клинички ентитет. Француски научник Louis Ranvier је 1878. године открио и описао мијелински омотач, а 1879. немачки неуролог Fromann описује демијелинизацију као основну патохистолошку карактеристику MS (3).

Биотехнолошки развој током 20. века резултирао је интензивнијим истраживњима, детаљнијим описивањем и комплекснијим схватањем MS.

## 1.2. Епидемиологија и етиологија мултипле склерозе

Велики значај MS огледа се најпре у чињеници да се најчешће јавља код младих одраслих особа, а услед дугогодишњег трајања и прогресивног тока представља најчешће нетрауматско онеспособљавајуће неуролошко обољење у најпродуктивнијем животном добу што има значајне импликације на различите сегменте живота оболелих (4).

Данас се процењује да је број оболелих од MS у свету око 2,5 милиона, у Европи око 500.000, Америци 750.000 (5, 6). Инциденца MS је ниска у детињству, расте после 18. године живота, пик достиже између 25. и 35. године живота након кога постепено опада, па се болест ретко јавља након 50. године живота (7, 8, 9). Према непубликованим подацима Регистра за MS Београда, преваленција MS на крају 2010. године износила је око 60/100.000. Резултати истраживања објављеног 2011. године показали су вредност преваленције од 64,9/100.000 у Шумадијском округу а у Златиборском округу према подацима из 2006. године 57,1/100.000 (10, 11). Досадашње студије су показале да жене имају већи ризик обољевања од мушкараца (12, 13).

Вишедеценијска истраживања о етиолошким факторима указују да је MS комплексна, мултифакторијална болест која настаје као последица интеракције генетских и фактора спољашње средине (вируси, ултравиолетно зрачење, пушење) (14, 15). Генетску основу болести подржавају чињенице да је ризик обољевања већи код чланова породице оболелих од MS него у општој популацији, поједине расе и етичке групе имају мању склоност ка обољевању, већа је стопа конкорданце код монозиготних близнаца (13, 16, 17). Досадашња генетска истраживања су показала да предиспозиција за развој MS зависи од више независних полиморфних гена и њихове интеракције, при чему сваки од њих

појединачно има мали или умерен ефекат (18). HLA-DR2 и HLA-DQ алели у оквиру друге класе HLA гена на 6. хромозому су повезани са ризиком обољевања (19). Genome-wide association studies- GWAS студије које се баве испитивањем генских полиморфизама целог генома сугерише да преко 100 генских локуса ван HLA гена, који имају различите имунолошке функције и одговорни су за развој других аутоимуних болест могу имати значајну улогу у генетској основи MS (20, 21).

Код генетски предиспонираних особа, утицај одређених фактора спољашње средине може довести до аутоимуне реакције, неуроинфламације и последичне демиелинизације (22).

Деструкција мијелина у MS је последица секундарне аутоимуне реакције организма у чијој основи је механизам молекуларне мимикрије који настаје услед структурне сличности између страних, егзогених антигена и протеина у организму, те активирани имуни систем доводи до деструкције сопственог организма (23). Као егзогени тригери до сада су највише испитивани вируси међу којима највећу пажњу привлачи Epstein-Barr virus (EBV) (24, 25). Показано је да инфекција овим вирусом у одраслом животној добу представља кључни фактор ризика за настанак MS (6, 26). Недавна мета-анализа која је обухватила 18 клиничких студија је показала да релативни ризик за развој MS после прележане инфективне моноклеозе износи 2,17 (27). Оболели од MS имају повећан титар IgG антитела која делују на специфичне пептидне регионе EBNA-1 протеина, а која укрштено реагују са мијелин базним протеином (28).

Епидемиолошке студије су указале да је преваленца болести већа у регионима који су удаљенији од екватора, што је повезано са смањеном експозицијом сунчевој светлости (29). Претходна изложеност сунчевој светлости је инверзно повезана са ризиком од развоја MS (30). Такође излагање сунцу је значајан фактор у синтези витамина Д који има могућу протективну улогу у настанку болести (31). Смањена производња и мањи унос

овог витамина су главни механизми који објашњавају повећан ризик обољевања међу људима који су мање изложени ултравиолетном зрачењу (30).

Последњих година, све већи број аутора разматра пушење као значајан фактор ризика за настанак MS (32, 33). Пушачи имају 1,5-2 пута виши ризик да оболе од MS у поређењу са непушачима, већи ризик од прогресије болести и већи степен možдане атрофије (34, 35, 36). Никотин има директни штетни ефекат на крвно možдану баријеру (Blood Brain Barrier- BBB), повећава нивое инфламаторних маркера, утиче на активност матриксних протеаза, доводи до пораста концентрације азот монооксида који узрокује оштећење аксона (33, 37).

### 1.3. Патогенеза мултипле склерозе

#### 1.3.1. Неуроинфламација и оксидативни стрес

Неуроинфламација и оксидативни стрес су веома важни елементи патогенезе MS. Сматра се да иницијални догађај у настанку болести представља деловање инфективног фактора из спољашње средине након чега на периферији долази до активације аутореактивних, циркулишућих CD4+T лимфоцита, који се потом диференцирају у помоћничке T ћелије (T helper- Th ) - Th-1 и Th-17 ћелије, које имају кључну улогу у разликовању „страних тела“ од ћелија сопственог организма (38, 39, 40). Досадашња истраживања су показала, да су код оболелих од MS ове ћелије компромитоване и да лимфоцити „препознају“ протеине мијелинског омотача као стране што последично доводи до деструкције ћелија сопственог организма и демиелинизације (40, 41). Један од кључних, раних, патогенетских догађаја је поремећај пермеабилности BBB јер интактна BBB спречава улазак T лимфоцита у централни нервни систем (Central Nervous System –CNS) (42). Да би T ћелије прошле BBB неопходна је интеракција адхезионих молекула активираних лимфоцита и ендотелних ћелија крвних капилара баријере. Адхезиони молекули омогућавају приљубљивање лимфоцита који брзо пролазе крвном струјом, на ендотелне ћелије (43, 44). За трансмиграцију лимфоцита у CNS важна је и експресија протеаза, нарочито матрикс-металопротеаза за које се сматра да имају важну улогу у пермеабилности BBB (45). Продукцијом хемокина, астроцити имају улогу у привлачењу T лимфоцита у CNS. Осим тога на овим ћелијама су експримирани адхезивни молекули ICAM и VCAM што додатно омогућава миграцију лимфоцита у CNS (46). Након уласка

активираних Т ћелија у CNS, локалне антиген презентујуће ћелије као што су макрофаги и микроглија презентују аутоантиген, протеине мијелина-мијелин базни протеин, мијелин олигодендроцит гликопротеин, при чему механизмом молекуларне мимикрије долази до реактивације Т лимфоцита (47, 48). Т ћелије пролиферишу, Б ћелије сазревају у плазма ћелије које продукују антитела, док од моноцита постају активирани макрофаги. Реактивација Т ћелија у CNS узрокује продукцију проинфламаторних медијатора: интерлеукин-12 (IL-12), интерлеукин-23 (IL-23), интерферон гама (IFN-gama), фактор туморске некрозе алфа (TNF-alfa), антитела, протеазе, глутамат, азот оксид и друге проинфламаторне чиниоце који доприносе демјелинизацији и неуродегенерацији (49, 50). Истовремено, у условима неуроинфламације, CD4+ лимфоцити се диференцирају у Th2 ћелије које пролиферишу и секретују антиинфламаторне, регулаторне цитокине интерлеукин-4 (IL4), интерлеукин-5 (IL5), интерлеукин-13 (IL13) и трансформишући фактор раста бета (TGF beta) са супресивним ефектом на покренути имунски одговор (51, 52, 53) . Пролиферација проинфламаторних CD4+ и цитотоксичних CD8+ Т ћелија доводи до имунски посредованог оштећења мијелина, олигодендроцита и аксона, цитокински посредованог оштећења глијалних ћелија, дигестије површинских мијелинских антигена путем макрофага и директног оштећења олигодендроцита CD4+ и CD8+ Т ћелијама (54, 55).

Досадашња истраживања су показала да је акутно оштећење аксона најзаступљеније у почетку болести и да се смањује током времена (56), иреверзибилна оштећења аксона су најчешћа у пољима активне инфламације (57), као и да аксонално оштећење примарно одређује каснију онеспособљеност (58).



До недавно је преовладало мишљење да је MS аутоимуна болест која је посредована искључиво Т лимфоцитима. Међутим, новија истраживања су недвосмислено показала да Б лимфоцити такође имају значајну улогу у патогенези болести и неуроинфламацији (59). Све већи број доказа иде у прилог чињници да Б лимфоцити доприносе запаљенском процесу у CNS кроз различите механизме: као извор аутоантитела на различите компоненте мијелина, аксона и неурона узрокујући демјелинизацију и оштећење аксона, као антиген презентујуће ћелије за аутореактивне Т лимфоците, као регулаторне ћелије које продукују цитокине и модулирају Т ћелијски одговор (60, 61). У менингеама пацијената са MS се могу наћи лимфни агрегати који садрже Б лимфоците и фоликулске дендритске ћелије. Постојање ових структура је повезано са ранијим развојем болести и са тежом клиничком сликом (62).

Током неуроинфламације истовремено долази до повећаног стварања реактивних оксигених (ROV) и реактивних нитрогених врста (RNV) и смањења антиоксидативног капацитета мозга што резултира стањем познатим као оксидативни/нитрогени „стрес“ (ROS/RNS) (63). У овим условима долази до продукције супероксид анјона, азотног оксида (Nitric Oxide-NO) и пероксинитрита (64). CNS продукује велике количине супероксида и веома је осетљив на оксидативно оштећење (65). Олигодендроцити имају низак ниво антиоксидативне одбране што их предодређује за оксидативно оштећења, а мијелин због високог односа протеина и липида може бити мета за оксидативно оштећење (66). NO се везује за ензиме укључене у митохондријални ланац транспорта електрона, циклус трикарбонских киселина и синтезу DNA (67). Синтезише се по активацији NMDA рецептора и у митохондријама инхибира респираторни ланац чиме онемогућава ћелијама да се боре против оксидативног стреса (68). Познато је да NO и његови деривати могу

блокирати проводљивост у централним и периферним аксонима, највероватније директним ефектима на јонске канале (69). Досадашње студије сугеришу да у MS постоји повећана продукција NO унутар MS лезија (70). Услед повећане продукције, NO брзо реагује са супероксидом и ствара пероксинитрит који је значајно реактивнији оксиданс од својих прекурсора (71). Пероксинитрит оштећује бројне биолошке молекуле и сматра се маркером оксидативног оштећења (72). Механизми његовог деловања су: оштећење DNA ланца, протеина, индукује пероксидацију липида, оксидацију ензима на базалној мембрани митохондрија узрокујући поремећај пермеабилитета митохондрија што доводи до смрти ћелија апоптозом (73, 74, 75). Такође, пероксинитрит узрокује ломљење појединачних DNA ланаца унутар ћелија, а као ћелијски одговор на ово може доћи до оштећења енергетског метаболизма (73, 76). Оштећење митохондрија може довести до смрти ћелија и некрозом због прекида ћелијског метаболизма и оштећења интегритета мембране (77, 78). Заједно са другим слободним радикалима верује се да има улогу у инфламацији, демиелинизацији и оштећењу аксона који се догађају у MS (79). Реактивне оксидативне врсте такође индукују пролиферацију и активацију астроцита, микроглије и Т лимфоцита и узрокују аутоимунски посредовано оштећење ткива у MS (80, 81).

На основу досадашњих истраживања може се закључити да су неуроинфламација и оксидативни стрес два патогенетска процеса која се симулатано дешавају у MS при чему се међусобно индукују и представљају „*circulus vitiosus*“ (63). Присуство повишених вредности маркера оксидативног стреса снажно је повезано са повишеним нивоом Ц-реактивног протеина у серуму ( C Reactive Protein -CRP) (82) који представља маркер неуроинфламације (83) и маркер прогресије болести код оболелих од MS (84, 85).

Као последица наведених процеса у мозгу се јављају поља фокалне демиелинизације која се називају плакови а у којима постоји различит степен запаљења, глиозе и оштећења аксона (86). У акутним плаковима су присутне инфламаторне ћелије, преодминантно Т лимфоцити и периваскуларни едем, постоји парцијална или комплетна деструкција мијелина, углавном очувани аксони и губитак олигодендроцита (87). У хроничним активним плаковима доминира централна глиоза и олигодендроцити који су распоређени периферно (88). Овакав распоред олигодендроцита иде у прилог ремиелинизацији. Новија истраживања су показала да мозак има способност неуропластичности тј. да нервне ћелије могу да се регенеришу и да се симултано са неуроинфламацијом и неуродегенерацијом одвија и процес ремиелинизације (89). Могућност репарације мијелинских ћелија (ремиелинизација) има врло важну улогу у природном току МС у периодима ремисије, али битна чињеница је да током времена аутодеструктивни механизми преовлађују над репаративним што последично доводи до иреверзибилних оштећења мозга (90). Хронични, неактивни плакови су јасно ограничени од околног ткива, у централном делу доминира астроглиоза, олигодендроцити нису присутни а постоји значајан губитак аксона (88).

Имунопатолошке студије активних демиелинизационих лезија указују на могуће постојање више типова ткивног оштећења и на вероватну патогенетску хетерогеност у њиховом настанку. Описана су четири типа демиелинизације на основу величине и топографије плакова, губитка протеина мијелина, пропадања олигодендроцита и депоновања имуноглобулина и комплемената: Тип 1 је демиелинизација која је посредована Т лимфоцитима и макрофагима, тип 2 је посредована антителима, тип 3 карактерише дистална олигодендроглиопатија са апоптозом, као могућа последица

исхемије или деловања токсина, тип 4 карактерише примарна дегенерација олигодендроцита у чијој основи су генетска предиспозиција или могућ метаболички дефект (91). Утврђено је да код једног болесника увек постоји само један тип демиелинизације (86).

Иако се лезије различите старости и различитог патолошког профила могу наћи у било ком делу CNS, оне су углавном локализоване у белој маси мозга и кичмене мождине, мада новија истраживања указују и на захваћеност сиве масе и кортекса мозга (92). Предилекциона места су перивентрикуларни простор, јукстакортикални простор, оптички нерв, хијазма, мождано стабло, церебелум, цервикална кичмена мождина (93).

Патофизиолошки, демиелинизација доводи до смањења брзине спровођења импулса кроз аксоне. Тежа оштећења мијелинског омотача су праћена сниженом проводљивошћу нервних импулса или кондукционим блоком што за последицу има губитак функционалне способности (94).

Почетак болести претежно карактерише запаљењски процес у CNS и настанак фокалних активних лезија док у каснијим фазама доминира неуродегенерација и присуство хроничних, инактивних лезија (95).

### 1.3.2. Улога мокраћне киселине у оксидативном стресу

Мокраћна киселина (Uric Acid –UA) је важан ендогени антиоксиданс и представља прву линију одбране од оштећења насталих деловањем реактивних оксигених врста, што су и *in vitro* и *in vivo* студије показале (96, 97, 98). UA је дериват пурина, настаје деаминацијом аденина и гуанина. У организму се деаминација одвија под дејством ензима а настали продукти се оксидују до UA. У људском организму дневно настаје 0.5-1g UA. Она је слаба двобазна киселина, слабо растворљива у води, добро растворљива у базној средини када гради соли, урате (99).

Нижи сисари поседују ензим урат оксидазу који катализује претварање UA у алантоин који нема антиоксидантна својства. Код људи је еволуцијом овај ензим изгубљен тако да UA представља крајњи оксидациони продукт метаболизма пурина. У нормалним условима UA не пролази BBB (100).

Пре две деценије је показано да је UA „чистач“ пероксинитрита и да поништава његове токсичне ефекте (98). Како су у MS неуроинфламација и оксидативни стрес битни чиниоци у патогенези болести, и с обзиром на чињеницу да акутној фази болести долази до повећане продукције пероксинитрита и оштећење BBB које омогућава улазак UA у CNS претпостављено је да је код оболелих од MS ниво UA у серуму снижен. У последњих десетак година не тако велики број истраживања се бавио евалуацијом нивоа UA у серуму код оболелих од MS. Поједини аутори су опсервирани да код оболелих од MS постоји низак ниво UA у серуму као и да су њени нивои варијабилни у различитим клиничким формама болести (101, 102). Оштећење BBB је у корелацији са нижим нивоом UA у серуму, а метилпреднисолон (Methylprednisolon –MP) повећава њен ниво

(103, 104). Досадашња научна сазнања подржавају хипотезу да су MS и гихт (хиперурикемија) готово искључива обољења што би значило да повишене вредности UA штите од настанка MS (98).

## **1.4. Клинички фенотипови и клиничка слика мултипле склерозе**

Ток MS је непредвидив и варијабилан. Са једне стране налазе се пацијенти са бенигним током болести који и после 15-20 година трајања болести немају значајну неуролошку онеспособљеност, док се са друге стране налазе пацијенти код којих се после само неколико месеци јавља брза прогресија болести, тешка онеспособљеност и смртни исход. Овакав ток се дефинише као малигна MS (105, 106).

### **1.4.1. Клинички фоме мултипле склерозе**

MS се презентује кроз четири клиничка фенотипа: релапсно-ремитентна (Relapse-Remitting – RR), секундарно-прогресивна (Secondary Progressive- SP), примарно-прогресивна (Primary-Progressive- PP) и прогресивно-релапсна (Progressive Relapsing- PR) (107) MS.

RRMS се јавља код 80-90% болесника са MS. Основна клиничка карактеристика ове форме болести је смењивање периода релапса или егзарцербација и периода делимичне или потпуне ремисије болести (периоди без тегоба). Релапс (егзарцербација или атак) се дефинише као појава нових, или погоршање већ постојећих неуролошких испада у одсуству инфекције или повишене телесне температуре (псеудоатака), а који трају најмање 24 часа (108). Пароксизмални симптоми који трају краће од 24 часа се не могу сматрати атаком. Релапс обично траје од 7 до 30 дана, може трајати и дуже, а симптоми који се јављају унутар 30 дана од почетка атака су део истог релапса. Да би се два

неуролошка догађаја сматрала одвојеним релапсима, између њих мора да прође најмање 30 дана (109). Клинички симптоми који се јављају током егзарцербација су последица актуелне, активне неуроинфламације и последичног акутног демиелинизационог оштећења. Регресијом инфламације, ремиелинизацијом и пластичном реорганизацијом настаје повлачење или мировање неуролошких симптома тј. ремисија. Просечна годишња стопа релапса је 1.1 а током трајања болести има тенденцију смањивања (110). У почетним фазама MS углавном долази до потпуног опоравка болесника након напада. Међутим током времена релапси су углавном учесталији при чему долази до делимичног опоравка болесника и акумулације неуролошког дефицита. Након 6-22 година трајања болести код 40-80% оболелих болест поприма прогресивни ток. Оваква форма болести се назива SPMS, клинички се карактерише одсуством периода ремисије и прогресивном акумулацијом неуролошке онеспособљености (111). Хронични инфламаторни процес у нервном систему временом доводи до израженије неуродегенерације тј. оштећења неурона и дифузног оштећења аксона које има кључну улогу у настанку прогресије болести и акумулацији неуролошке онеспособљености (112). Болесници код којих од самог почетка болести постоји прогресивна акумулација неуролошког дефицита током најмање годину дана имају PPMS. Ова форма се јавља у око 10-15 % случајева. Ако се на терену PPMS и SPMS јављају релапси говоримо о прогресивно-релапсној форми болести која се јавља у мање од 5% оболелих (107, 112).

Клинички изоловани синдром (Clinically Isolated Syndrome- CIS) представља иницијалну епизоду мултипле склерозе, коју карактеришу промене на магнетној резонанци (Magnetic Resonance –MR) које су специфичне за инфламаторно демиелинизационо обољење CNS. По дефиницији, CIS је монофазни догађај тј. изолован је у времену. Може почети



монофокално (изолован у простору), или у 10-15% случајева може имати мултифокални почетак када је захваћено више функционалних система. CIS може дуго остати изолован у времену нарочито ако се презентује у виду идиопатског оптичког неуритиса или мијелитиса (113). Наредни релапс који сугерише клинички дефинитивну MS може се јавити за неколико месеци или након неколико година. У последњих 15 година, еволуција дијагностичких критеријума је знатно смањила време потребно да се постави дијагноза дефинитивне мултипле склерозе након CIS. Око 80% болесника са CIS, који на MR имају демиелинизациона оштећења у CNS развија MS. Вероватноћа конверзије CIS у MS износи око 60% (114). Идентификација ових болесника је од великог значаја обзиром да је од изузетне важности што пре започети лечење и спречити даљу прогресију болести. Примена терапије која модификује ток болести одлаже други клинички напад код CIS болесника и смањује ризик за развој MS, у периоду од 2-3 године (115).

### 1.4.2. Симптоми и знаци мултипле склерозе

Узимајући у обзир чињеницу да плакови демиелинизације могу бити локализовани у различитим деловима CNS и кичмене мождине јасно је да практично сваки неуролошки симптом може бити део клиничке слике MS. Почетак болести може бити монофокалан када је захваћен само један функционални систем или мултифокалан када је захваћено више функционалних система. Стога клиничку слику болести карактерише велика варијабилност као и дисеминованост у неуролошком налазу.

Најчешћи иницијални симптоми болести су поремећаји вида, сензитивни и моторни поремећаји. Оптички или ретробулбарни неуритис се јавља код око 20% пацијената. Испољава се субакутним, унилатералним смањењем оштрине или потпуним губитком вида у трајању од неколико сати до неколико дана (116). Пацијенти са епизодом оптичког неуритиса имају ризик од око 40% да развију MS (117). Код 43% пацијената сензитивни симптоми се јављају као почетни, док су у преко 90% пацијената присутни у некој фази болести. Пацијенти се најчешће жале на осећај утрнулости у пределу лица, прстима, екстремитетима или на осећај утрнулости читаве половине тела (118). Захваћеност кортикоспиналног пута у већини случајева доводи до асиметричне спастичности која је израженија на доњим него на горњим екстремитетима, појачаних мишићних рефлекса и позитивног знака Бабинског. Спастицитет се испољава осећајем укочености у ногама, боловима и отежаним ходом што у каснијој фази болести доводи до настанка контрактура тј. немогућности покретања екстремитета у зглобовима. Најчешћи моторни симптоми су слабости екстремитета у виду трипарезе, парапарезе или хемипарезе (117, 119). Симптоми

оштећења малог мозга су присутни у виду атаксије хода, трупа, екстремитета, интенционог тремора. Скандиран говор се јавља у каснијим фазама болести. Лезије локализоване у можданом стаблу доводе до поремећаја очних покрета, диплопија и нистагмуса, слабости мимичне мускулатуре, вртоглавице, дизартрије, дисфагије (117, 120).

У каснијим фазама болести код већине пацијената су присутни поремећај дефекације и мокрења који представљају најнеоспособљавајуће симптоме. Поремећаји сексуалних функција су такође чести (121). Поремећаји спавања у виду несанице, апнеје при спавању, синдрома немирних ногу, нарколепсија су често присутни. Когнитивни поремећаји у виду поремећаја памћења, пажње и концентрације се могу јавити у свим стадијумима болести, најчешћи су код SPMS, али су учестали и код RRMS, док се најређе јављају код PPMS (122, 123). У око 10% болесника се могу јавити пароксизмални симптоми у виду тоничних спазма, акинезије, дистоније, хемифацијалног спазма, миокимија, миоклонуса (117). Учесталост епилептичких напада је већа код оболелих од MS него у општој популацији. Најчешће се јављају парцијални епилептични напади који се секундарно генерализују. Показана је корелација између присуства кортико-субкортикалних лезија и епилептичких напада код оболелих од MS (124).

У групи симптома који нису везани за оштећење неке специфичне анатомске структуре CNS, најзначајније место заузима замор који се јавља код већине пацијената у некој фази болести и значајно ремети њихов квалитет живот (125). Такође ментални поремећаји се чешће јављају у MS у поређењу са општом популацијом. Досадашња истраживања указују да лечење менталних поремећаја побољшава исход лечење саме MS (126).

### 1.4.3. Замор у мултиплој склерози

Замор као симптом је значајан проблем за преко 80% оболелих од MS и идентификован је као један од три најонеспособљавајућа симптома (127). За сада не постоји консензус о прецизној дефиницији замора. De Luca дефинише замор као смањење способности у вршењу радњи, услед продуженог или неуобичајеног напора, при чему замор може бити сензорни, моторни, когнитивни или субјективни (128). The Multiple Sclerosis Council for Clinical Practice Guidelines дефинише замор као субјективни недостатак физичке и/или менталне енергије у обављању уобичајених и жељених активности (129). UK Multiple Sclerosis Society замор дефинише као изражен осећај умора који се јавља без конкретног разлога. Krupp је описала замор као изражен осећај умора који превазилази границе „нормалног“ умора (130). Mills и Young су 2007. замор описали као „реверзибилно моторно и когнитивно погоршање са редукцијом мотивације, а које настаје спонтано или је провоцирано менталном или физичком активношћу, акутном инфекцијом (131). На основу свих предложених дефиниција, могло би се закључити да замор повезан са MS представља посебан осећај слабљења, довољно тешког да болесника спречава у обављању свакодневних животних активности. Замор може бити повезан са активношћу и смањује се или чак нестаје после одмора. Такође може бити и непредвидљив, без неког посебног утицаја вежбања или напора. Израженији је у поподневним сатима, док је код неких болесника замор стално присутан и не реагује на спавање или одмор (132).

Етиологија замора је комплексна и мултифакторијална, а патофизиологија недовољно јасна. Етиолошки, замор се дели на примарни и секундарни (133, 134). Претпостављени

узроци примарног замора су многобројни. Досадашња истраживања указују да у неуроинфламаторним болестима замор може бити последица оксидативног стреса и повећане продукције реактивних оксидативних врста (135). Најчешће истраживани узроци настанка секундарног замора су депресија и поремећаји спавања (134).

#### **1.4.4. Депресија у мултиплој склерози**

Поремећаји расположења су често присутни у MS. Депресија је најчесталији психијатријски коморбидитет код пацијената са MS чија преваленца износи око 50% (136). Претходна истраживања индикују да неуроинфламација и оксидативни стрес имају важну улогу у патофизиологији депресије (137). Такође, депресија која се као коморбидитет јавља код оболелих од MS је повезана са повишеним нивоима нитро-оксидативних и инфламторних маркера у серуму (138, 139).

Депресија у оквиру MS се може јавити и као одговор на проблеме које ова болест носи са собом (утицај на друштвени живот, емотивне везе, пословни статус, проблеми са самопоштовањем). Досадашња истраживања су показала да су предиктивни фактори за настајан депресије код оболелих од MS: женски пол, млађе животно доба, позитивна породична анамнеза велике депресије и стрес (140). Често је прате поремећаји спавања и анксиозност. Такође, поједине студије су показале да се симптоми депресије могу погоршати током терапије интерфероном бета (Interferon beta- IFN beta), али ова повезаност није прихваћена на основу резултата већине истраживања (141). Рано препознавање и адекватно лечење депресије у MS је од великог значаја узимајући у обзир чињенице да може имати негативан утицај на когницију и психосоцијално

функционисање, да је она значајан предиктор морбидитета, морталитета и квалитета живота оболелих (142).

Иако је преваленца депресије у MS висока, дијагноза се врло често не постави или пацијенти добијају неадекватну терапију (143). Депресивно расположење карактерише губитак мотивације, ахедонија, повлачење болесника у себе, пад виталних динамизама, песимизам, успорени мисаони ток, осећај незнања, несаница, губитак апетита (144). Депресија се клинички може манифестовати и погрешно протумачити као замор што у клиничкој пракси отежава дистинкцију ова два ентитета, нарочито код хроничних болести као што је MS. Изузетно сложена повезаност депресије и замора код оболелих од MS индикује да можда исти неуробиолошки механизми леже у њиховој основи (142, 145).

## 1.5. Терапија мултипле склерозе

### 1.5.1. Терапија релапса

Циљ лечења релапса је опоравак од новонасталог функционалног неуролошког дефицита и спречавање акумулације оштећења заосталих после претходних релапса (спречавање таложења тегоба). Кортикостероиди (Corticosteroids- CS) представљају терапију избора у лечењу егзацербација болести због биолошких ефеката који имају: антиедематозни, антиинфламаторни, имуномодулаторни, потенцијални неуропротективни ефекат, као и утицај на опоравак функције BBB (146, 147). Златни стандард за лечење погоршања болести представља интравенска (Intravenous- IV) примена високих доза МР (148). МР је синтетички CS који пролази кроз BBB, а приликом IV примене постиже високе концентрације унутар CNS. Примењује се у трајању од три до пет дана, 500–1.000 mg дневно, у IV инфузији (такозвана „пулсна терапија“). Код тежих релапса и споријег опоравка лечење се наставља пероралном применом са постепеним смањењем дозе CS (tapering). Европска група експерата (Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group- MSTCG) дала је препоруку да се терапија изузетно високим дозама МР, од 2.000 mg дневно, у IV инфузији 100 ml физиолошког раствора, примењује током три до пет дана у случајевима веома тешких релапса када стандардна пулсна терапија није остварила очекивани ефекат. Иако током релапса може доћи до спонтаног повлачења тегоба, апсолутна је препорука да пулсну терапију треба применити што пре (али не раније од 24 сата након почетка тегоба) (148). Досадашња истраживања су показала да одложена примена CS терапије може довести до слабијег ефекта и опоравка. Примена IVMP је

углавном безбедна. Могући нежељени ефекати су: несаница и блага еуфорија, анксиозност, метални укус у устима, црвенило лица, повећан апетит, главобоља, болови у мишићима, а ретко се могу јавити депресија, еуфорија, улкус желуца, срчане аритмије и попуштања срца, тромбоемболија, инфекције. Апсолутне контраиндикације за примену ове терапије представљају активни гастритис и улкус на желуцу. Зато се код свих пацијената, заједно са CS терапијом, истовремено примењује и гастропротективна терапија (147). Такође, код болесника са хипертензијом, дијабетесом, срчаним сметњама треба пажљиво примењивати ову терапију, уз адекватан мониторинг и корекцију интернистичке терапије уколико постоји потреба. Досадашња истраживања су показала да примена високих доза IVMP доводи до значајне редукције онеспособљености (149).

### **1.5.2. Имуномодулаторна терапија-Интерферон бета 1a**

Иако се MS клинички испољава појединачним епизодама, болест представља континуирани, субклинички, дегенеративни патолошки процес. Трајно оштећење (губитак аксона) је рани догађај прогресивног карактера и рани ток болести има значаја за предикцију дугорочног исхода. Истраживања су показала да рана примена терапије која модификује природни ток болести дугорочно мења њен ток. Ова терапија има за циљ да редукује учесталост и тежину релапса, смањи запремину и активност лезија мозга, и успори развој прогресије онеспособљености (147, 150).

Лекови прве терапијске линије који модификују природни ток MS су IFN beta 1a и 1b. Постоје три различита препарата IFN-beta: IFN-beta1b који се примењује у дози од 250 mcg сваки други дан (Betaferon® у Европи или Betaseron® у САД), као и две формулације



IFN-beta 1a: Avonex® који се примењује интрамускуларно у дози од 30 mcg једном недељно, Rebif® који се примењује у дози од 22 или 44 mcg супкутано, три пута недељно (146). Ове формулације се разликују по биолошкој активности и по имуногености. IFN-beta остварује своје ефекте инхибицијом Т-ћелијске активације и пролиферације, апоптозом аутореактивних Т-ћелија, инхибицијом миграције леукоцита преко BBB, индукцијом регулаторних Т-ћелија, модулацијом цитокина (151). Најчешћа нежељена дејства су: симптоми слични грипу, пролазни поремећаји лабораторијских налаза, менструални поремећаји и повећан спастицитет. Симптоми слични грипу (енг. flu-like), као што су повишена телесна температура, мијалгија, главобоља, замор, језа и мучнина се обично јављају непосредно након примене и могу трајати неколико сати. Они се обично повлаче после првих недеља терапије. Додатно се препоручује профилактичка терапија нестероидним аналгетцима као што су ибупрофен и ацетаминофен током првих недеља терапије (152, 153). Током примене IFN-beta неопходно је праћење комплетне крвне слике, укључујући леукоцитарну формулу и број тромбоцита, биохемијске анализе крви, укључујући обавезно тестове за хепатичну функцију због могуће појаве лимфопеније, неутропеније, леукопеније и повишених вредности јетриних аминотрансфераза. Ови тестови се спроводе једном месечно током прва три месеца терапије, потом једном у три месеца до краја прве године, а потом једном у шест месеци током следеће године терапије и затим једном годишње (154). Остали нежељени ефекти који се могу јавити су: поремећај функције штитасте жлезде због чега је неопходно контролисати тиреоидни статус пацијената једном годишње, локалне реакције у виду еритема, на месту давања ињекције (153). У Србији IFN-beta је лек избора за лечење RRMS, а инклузиони критеријуми који су дефинисани од стране Републичке комисије за MS су: пацијенти старији од 18 година

живота са потврђеном дијагнозом RRMS према McDonald-овим критеријумима, који су имали најмање два документована клиничка релапса у претходне две године, способни су да самостално ходају и имају скор на проширеној скали функционалне онеспособљености (Expanded Disability Status Scale -EDSS)  $\leq 3.5$ , нема контраиндикација за примену терапије као што су трудноћа или дојење. Досадашња истраживања су показала да примена IFN-beta смањује број релапса за једну трећину, учесталост тешких атака се смањује на половину, а 20-огодишње праћење пацијената на овој терапији је показало смањење стопе морталитета (155).

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Општи циљ истраживања је да се покаже могући утицај нивоа UA у серуму, као маркера оксидативног стреса и нивоа CRP, као инфламаторног маркера на замор и депресију код пацијената са дијагностикованом MS а у различитим фазама болести.

У складу са општим циљем поставили смо посебне циљеве:

- 1) Утврдити да ли пацијенти са MS имају ниже нивое UA у серуму у односу на контролну групу коју чине здрави добровољци.
- 2) Утврдити нивое UA код пацијената са MS у различитим фазама болести тј. у релапсу и ремисији и са различитим клиничким фенотиповима.
- 3) Утврдити да ли се нивои UA у серуму разликују пре и након примене пулсне, кортикостеодне терапије код пацијената у актуелном погоршању.
- 4) Утврдити ниво CRP у серуму код пацијената у релапсу и ремисији.
- 5) Утврдити да ли се нивои CRP у серуму разликују пре и након примене пулсне, кортикостероидне терапије код пацијената у актуелном погоршању.
- 6) Утврдити учесталост и степен тј. тежину неуролошке онеспособљености, замора и депресије код пацијената у релапсу и ремисији.

- 7) Утврдити да ли се степен неуролошке онеспособљености, замора и депресивне симптоматологије разликују пре и након примене пулсне, кортикостероидне терапије код пацијената у актуелном погоршању.
- 8) Утврдити могућу корелацију нивоа UA у серуму са неуролошком онеспособљеношћу, замором и депресијом код пацијената са MS.
- 9) Утврдити могућу корелацију нивоа CRP у серуму са неуролошком онеспособљеношћу, замором и депресијом код пацијената са MS.
- 10) Испитати који социодемографски и клинички параметри могу имати могући утицај на појаву замора и депресије код оболелих од MS.
- 11) Испитати који социодемографски и клинички параметри могу бити могући предиктори степен замора и депресије.

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

Истраживање је спроведено на Клиници за неурологију, Клиничког центра Крагујевац, у периоду од фебруара 2016. године до јануара 2017. године.

Спровођење студије је одобрено од стране надлежног тела, Етичког одбора, Клиничког центра Крагујевац. Студија је одобрена као проспективна, неинтервентна и непрофитна клиничка студија која се спроводи у сврхе научног истраживања. Пре примене било које студијске процедуре, пацијенти су потписивали информисани пристанак за учешће у студији. Протокол је спроведен у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе (Good Clinical Practice-GCP).

#### **3.1. Дијагноза мултипле склерозе**

Дијагноза MS се поставља испуњавањем два основна критеријума: дисеминације у времену и дисеминације у простору, при чему се мора искључити друго објашњење за настанак тегоба. Под дисеминацијом у времену се подразумева постојање различитих неуролошких симптома у различитим временским интервалима, при чему време од појаве првих до појаве нових симптома мора бити дуже од 30 дана. Под дисеминацијом у простору се подразумева потврда постојања просторно раздвојених, мултифокалних лезија унутар централног нервног система. Да би се задовољила ова два кључна критеријума за дијагнозу неопходно је праћење одређених дијагностичких алгоритама који у себи интегришу клиничке и параклиничке параметре (156).

Интернационална комисија за дијагнозу MS је 2001. године дефинисала најшире прихваћене McDonald-ове критеријуме који су у наредним годинама више пута ревидирани (157,105,156). Ови критеријуми се углавном заснивају на клиничким

карактеристика MS, али је у циљу потврде дисеминације у времену и простору велики значај дат MR у детекцији лезија у CNS и кичменој мождини. Типичан налаз за MS је присуство мултиплих зона повишеног интензитета сигнала (хиперинтензивне зоне) на T2-weighted (T2W) секвенци и proton density (Proton Density-PD) секвенци, типичне локализације: оптички нерв, перивентрикуларна бела маса, корпус калозум, јукстакортикални региони, дубока бела маса и инфратенторијални региони као што су мождано стабло и церебелум, кичмена мождина (158). Недавне студије су показале да кортекс мозга такође представља једно од предилекционих места за настанак MS лезија (92). Ове промене су најмањег пречника 3мм, ирегуларног кружног или елипсастог облика, и асиметричног распореда. У случају оштећења BBB, након апликације контраста долази до пребојавања контрастом на T1 –weighted (T1W) секвенци активних промена, хомогено или рубно. Промене које се приказују као хипоинтензне на T1W а не пребојавају се контрастом означавају се као „црне рупе” (black holes) и сматра се да представљају промене са већим степеном деструкције ткива (158). Промене на кичменој мождини се приказују као хипердензне промене на T2W или PD секвенци, не прелазе 2 вертебрална сегмента и обухватају мање од половине попречног пресека кичмене мождине, предилекционо су локализоване у латералним и постериорним колумнама цервикалне, ређе торакалне кичме (156). MR има велику сензитивност (90-95%) али ниску специфичност јер сличне промене могу бити последица и инфламације, едема, глиозе, исхемије и губитка аксона, који се виђају не само у MS већ и код других болести CNS (159).

Према McDonald-овим критеријумима дијагноза MS се поставља на основу: 1. Клиничке слике која је карактеристична за MS. Постојање неуролошког испада који је типичан за MS мора бити доказан клиничким и неуролошким прегледом у тренутку настанка

симптома. Ранији неуролошки испади који потенцијално могу одговарати симптомима MS могу се прихватити али морају бити документовани од стране лекара, верификовани неуролошким прегледом, лезије оптичког нерва морају бити верификоване визуелним евоцираним потенцијалима или се лезије морају потврдити неурорадиолошким прегледом (160); 2. Доказивању дисеминације у времену и простору је омогућено налазима MR мозга и кичмене мождине. Преглед ликвора је задржан као један од кључних елемената у диференцијалној дијагнози MS; 3. Не сме постојати друго, боље објашњење за клиничку слику; 4. Неопходно је искључити све болести које диференцијално дијагностички долазе у обзир да би се поставила дијагноза MS (156).

Овом ревизијом да би се задовољио концепт дисеминације у простору неопходно је постојање најмање једне хиперинтензне промене у две од следеће четири локализације: 1. кичмена мождина 2. инфратенторијална 3. јукстакортикална 4. перивентрикуларна. Симптоматске лезије можданог стабла или кичмене мождине се не узимају у обзир, односно не рачунају се у две од четири локализације (161). Критеријуми за доказивање дисеминације у времену помоћу MR су: 1. појава нове T2 промене и/или промене која се пребојава контрастом без обзира на то када је урађен референтни снимак; или 2. истовремено присуство асимптоматске T2 промене која се не пребојава контрастом и симптоматске промене која се пребојава контрастом било када од почетка првог напада (довољан један MR снимак) (162).

Крајњи исход овог дијагностичког алгоритма може бити следећи:

1. Уколико су у потпуности испуњени критеријуми за дисеминацију у времену и простору, и ако су у потпуности искључене алтернативне дијагнозе, поставља се дијагноза MS.
2. Уколико један од наведена два услова није испуњен или нису искључене друге болести које диференцијално дијагностички долазе у обзир, закључује се да је реч о могућој MS.
3. Уколико ниједан од критеријума није испуњен, закључује се да се не ради се о MS.



Табела 1. McDonald-ови критеријуми за дијагнозу RRMS из 2010. године

КЛИНИЧКА СЛИКА	Додатни подаци потребни за постављање дијагнозе MS
≥2 клиничка напада; Објективни клинички знаци две или више лезија	НИКАКВИ*
≥2 клиничка напада; Објективни клинички знаци једне лезије	Потврда дисеминације у простору Један од два наведена услова: MR дисеминација ИЛИ сачекати други напад болести
1 напад (CIS); Објективни клинички знаци две или више лезија (мултифокални клинички изоловани синдром који указује на MS)	Потврда дисеминације у времену Један од два наведена услова: MR дисеминација ИЛИ сачекати други напад болести
1 напад (CIS); Објективни клинички знаци једне лезије (монофокални клинички изоловани синдром који указује на MS).	Потврда дисеминације у простору и Потврда дисеминације у времену
Критеријуми за промене на MR које говоре у прилог дисеминацији у простору у мултиплој склерози. Постојање најмање једне хиперинтензне промене у две од следеће четири локализације: 1. кичмена мождина; 2. Инфратенторијална; 3. Јукстакортикална; 4. перивентрикуларна  Напомена: Ако клиничка слика одговара лезији можданог стабла или кичмене мождине, онда се ове симптоматске промене не узимају у обзир, односно не рачунају се у две од четири локализације!	
Критеријуми за потврђивање дисеминације у времену помоћу магнетне резонанце. Постоје два начина да се докаже дисеминација у времену помоћу MR: 1. појава нове T2 промене и/или промене која се пребојава контрастом без обзира на то када је урађен референтни снимак; 2. истовремено присуство асимптоматске T2 промене која се не пребојава контрастом и асимптоматске промене која се пребојава контрастом било када од почетка првог напада (довољан један MR снимак).	

MR-Магнетна резонанца; MS-Мултипла склероза; CNS-Централни нервни систем, CIS-Клинички изоловани синдром \* Нису неопходна додатна дијагностичка испитивања, али се препоручују (MR и/или анализа ликвора) у циљу искључивања других болести CNS које диференцијално дијагностички долазе у обзир.

У дијагностици MS, анализа ликвора има значај у искључивању обољења која могу имати сличну клиничку и радиолошку презентацију. Најзначајнији ликворски параметар за дијагнозу MS је детекција интратекалне синтезе имуноглобулина G (Immunoglobuline G-IgG) која се верификује присуством олигоклоналних трака, методом изоелектричног фокусирања ликвора и серума са имунофиксацијом (163). Налаз који подржава дијагнозу MS је присуство олигоклоналних IgG трака у ликвору, али не и у серуму (164). Интратекална синтеза IgG је присутна у најранијој фази болести, а олигоклоналне траке су присутне код 90-95% болесника од MS (165). Сензитивност методе је 95% али специфичност није висока јер овај налаз је присутан и код других демјелинizacionих болести CNS – Акутног дисеминованог енцефаломијелитиса, Девикове болести, инфективних обољења CNS као и код имунски посредованих системских болести које захватају CNS. Међутим код ових стања детекција олигоклоналног IgG у ликвору може бити транзиторни феномен што се у MS не догађа (166).

Визуелни евоцирани потенцијали су задржали значај у објективизацији анамнестички добијеног податка о могућем претходном оптичком неуритису који није документован на било који други начин (156). Овај модалитет евоцираних потенцијала омогућава откривање лезија предњих оптичких путева. Електродама које се позиционирају на задњу страну поглавине региструју се потенцијали који се добијају након видне стимулације. Добијени одговор се региструје великим позитивним таласом чија латенца нормално износи 11-110 милисекунди. Патолошки налаз подразумева продужену латенцу П100 таласа уз очувану амплитуду. У различитим студијама учесталост патолошких налаза се креће од 22% до 78% код пацијената у раној фази болести (167).

### 3.2. Испитивани узорак

Студијску популацију је чинило 98 пацијената са постављеном дијагнозом MS према ревидираним McDonald критеријумима (156) који су хоспитално лечени на Клиници за неурологију услед актуелног погоршања болести, или су се пацијенти јављали амбулантно на редовни контролни неуролошки преглед. Пацијенти су класификовани у две групе: MS група у релапсу и MS група у ремисији. Релапсну групу су чинили пацијенти са различитим клиничким фенотиповима болести: CIS тј. првом клиничком манифестацијом болести која би могла да укаже на MS (пацијенти су укључени након верификације демиелинизационих промена MR прегледом ендокранијума), пацијенти са RRMS и SPMS, укупно 48 пацијената. Релапс се дефинише као појава нових или погоршање већ постојећих неуролошких испада у одсуству инфекције или повишене телесне температуре (псеудоатака), а који трају најмање 24 часа (108). MS групу у ремисији су чинили RRMS пацијенти који су у стабилној фази болести и на имуномодулаторној терапији IFN-beta 1a (примењен субкутано, три пута недељно) који су се јављали на редовни контролни преглед неурологу, укупно 50 пацијената. Контролну групу је чинило 35 здравих добровољаца, који су добровољно донирали крв у Служби за трансфузију, Клиничког центра Крагујевац. Сви испитници су по процени неуролога испунили укључујуће критеријуме: пацијенти са доказаном дијагнозом MS према актуелним дијагностичким критеријумима; старији од 18 година и ниједан искључујући критеријум. Дефинисани искључујући критеријуми су коморбидитети: мождани удар, инфаркт миокарда, бубрежна и хепатична дисфункција, дијабетес, деменција, Паркинсонова болест и други неуродегенеративни поремећаји; пацијенти са инфекцијама и хируршким интервенцијама;

пацијенти који су злоупотребљавали алкохол у последња 3 месеца; све имунски посредоване болести: фибромијалгија, генерализовани анксиозни поремећај, психозе, биполарни поремећај (биполарна депресија); пацијенти чија терапија би могла утицати на повећање нивоа мокраћне киселине у серуму: аскорбинска киселина, цисплатин, диуретици, епинефрин, леводопа, метилдопа, етамбутол, фенотиазини и теофилини или на смањење: веће дозе аспирина, азатиоприн, кортикостероиди, естрогени, раствори глукозе, манитола, пробенецид и варфарин; пацијенти на имуномодулаторној и имunosупресивној терапији у претходна 3 месеца.

### **3.3. Истраживачки поступак**

Код пацијената у акутном погоршању су дан након пријема у Клинику за неурологију реализоване следеће процедуре:

- физикални преглед,
- мерење виталних параметара (пулс, артеријска тензија, телесна температура)
- мерење телесне тежине (Body Mass Index-BMI),
- узимање узорак крви на таште за обављање рутинских лабораторијских анализа (крвна слика са леукоцитарном формулом, липидни статус, ниво гликемије, параметри функције бубрега и јетре, електролитни статус, CRP, UA),
- попуњавање упитника од стране истраживача о демографским карактеристикама пацијената,
- клиничко-неуролошка експлорација.

Након ових процедура, пацијентима је ординирана пулсна, кортикостероидна терапија у складу са важећим смерницама, у трајању од 5 дана. Све време третмана пацијенти су били хоспитализовани. Пацијенти у фази ремисије и на имуномодулаторној терапији су подвргнути истим процедурама приликом редовног, контролног неуролошког прегледа.

### **3.3.1.Одређивање серумске концентрације UA и CRP**

Нивои UA и CRP у серуму су мерени на анализатору Beckman Coulter AU 680, по одговарајућем фабричком протоколу (Beckman Coulter Inc., USA). За UA коришћена је модификована Fossati метода. Ензим уриказа разлаже UA на алантоин и водоник пероксид. Водоник пероксид реагује са 4-аминоантипурином (4-AAP) у присуству N,N-бис (4-сулфобутил)-3,5-диметиланилином, солима дисодиума (MADB) при чему настаје хромофор који се бихроматично чита на 600/800 nm. Количина формиране боје је пропорционална нивоу UA у узорку. Узорци од 5ml узимани су ујутро, пре доручка.



Референтне вредности за UA су од 154-428 mmol/L. Вредности CRP веће или једнаке од 5mg/L су сматране повишеним.

Мерење UA и CRP извођено је у Централној лабораторији КЦ Крагујевац.

### **3.3.2. Инструменти клиничко-неуролошке процене**

Са пацијентима је најпре обављен интервју (ауто и хетероanamнеза) да би се добили подаци као што су генералије, главне тегобе, садашња болест, лична и породична анамнеза и неуролошки статус. Затим су пацијенти попуњавали општи упитник који се састојао из два дела. Први део је садржао питања која су се односила на демографске карактеристике оболелих: пол, узраст, место становања, степен образовања, занимање, радни и брачни статус. Други део упитника је садржао питања о клиничким карактеристикама пацијената: узраст на почетку болести, дужина трајања болести, број релапса у претходних годину дана, терапија коју пацијент узима, присуство инфекција у претходних месец дана, дужина трајања терапије.

#### **Скала за процену степена онеспособљености**

Код сваког пацијента је процењен степен функционалне онеспособљености коришћењем EDSS скале (168). Овом скалом се квантификује неуролошки дефицит оболелих од мултипле склерозе и сваком пацијенту се додељује EDSS скор. Комплетан неуролошки преглед испитаника, као и одређивање EDSS скорa вршио је специјалиста неурологије. Скала се састоји од осам функционалих домена: визуелни систем, možдано стабло, пирамидни систем, церебеларни систем, сензорни систем, функције сфинктера, церебрални систем и способност хода, односно дужина пута коју болесник може да пређе по равном без одмора. За сваки функционални домен се добија засебан скор, а потом се укупан EDSS скор одређује на основу скорова свих функционалних домена. Укупан скор

може имати вредности у интервалу од 0 (нормалан неуролошки налаз без обзира на симптоме) до 10 (смрт као последица MS).

### **Скала за процену замора**

За процену степена замора коришћена је Скала за процену тежине замора (Fatigue Severity Scale -FSS) (169). Ова скала садржи 9 тврдњи које испитаник треба да оцени од 1 (уопште се не слажем) до 7 (у потпуности се слажем), тако да укупан скор може има вредности од 9 до 63. Збирна вредност се затим дели са 9 и на тај начин се добија средња оцена замора. Укупни FSS скор може имати вредности од 1 (потпуно одсуство замора) до 7 (изражено присуство патолошког замора). Скор преко 3 указује на присуство благог замора, а скор преко 4.5 онеспособљавајући замор.

### **Скала за процену депресије-Бекова скала депресије**

За процену степена депресивности коришћена је Бекова скала депресивности (Beck's Depression Inventory - BDI). По препорукама Америчке академије неуролога BDI је скала избора за скрининг депресивних симптома код пацијената са MS (170). Састоји се од 21 ајтема а даље су за сваки ајтем дате 4 тврдње које су по тежини градиране од 0 до 3. Скала испитује депресивност, вегетативне и соматске жалбе, односно органске манифестације депресије, што је чини погодном код болесника који немају увид у свој афективни статус.

Скалом се процењује депресивна симптоматологија у претходне две недеље. Као мера депресивности узима се укупан скор који максимално може износити 63. Градација тежине депресије према BDI скору је извршена на следећи начин: скор мањи од 10 се узима као нормалан, скор између 11-16 представља благ поремећај расположења, скор између 17-20 означава граничну клиничку депресију, скор између 21-30 указује на умерену депресију, скор између 31-40 указује на тешку и скор преко 40 на озбиљно тешку депресију.



### 3. 4. Статистичка анализа података

Статистичка анализа прикупљених података извршена је помоћу програма SPSS 20.0.

Коришћена је дескриптивна статистика-аритметичке средине (Mean), стандардне девијације (Standard Deviation- SD), стандардне грешке (Standard Error-SE), интервали поверења (Confidence Interval- CI), медијане (Mediana), перцентили (Percentiles), минимум, максимум и проценти. За поређење аритметичких средина једног обележја две популације коришћен је независни Т-тест или Ман Витнијев тест. За поређење аритметичких средина једног или више обележја више популација (UA и CRP) коришћен је генерални линеарни модел (General Linear Model- GLM). Имајући у виду утицај пола и BMI, као потенцијалних конфаундинг фактора, приликом ове анализе, вршена је контрола конфаундинга у односу на зависне варијабле. Исти модел је коришћен да се покаже утицај ових параметара на зависне променљиве. Корелација два нумеричка обележја испитивана је помоћу Пирсоновог и Спирмановог коефицијента корелације. Утицај више обележја на једно бинарно обележје испитивано је помоћу бинарне логистичке регресије. Предиктивна вредност социодемографских и клиничких обележја на вредности скорова замора и депресије процењивана је мултиплом регресионом анализом.

Резултати су представљени табеларно и фигурама.

## 5. РЕЗУЛТАТИ

### 5.1. Демографске и клиничке карактеристике испитаника

У студију је укључено 98 пацијената са дијагнозом MS. Просечан узраст испитаника је био  $39,75 \pm 8,63$ , при чему је најмлађи болесник имао 21, а најстарији 62 године. Од укупног броја испитаника, 33 (33,7%) су били мушкарци, а 65 (66,3%) жене.

MS групу у релапсу је чинило 48 пацијената (48,9%), док је у MS групу у ремисији било укључено 50 пацијената (51,1%). Демографске карактеристике испитаника и клинички параметри обе групе пацијената су сумирани у Табели 2.

Табела 2. Клиничке карактеристике групе пацијената у релапсу и ремисији

Варијабла	MS група у релапсу n=48	MS група у ремисији n=50	<i>p</i>
Године старости (године, mean±SD)	41.7±9.13	38,6±7.88	<i>p</i> =0.18
Пол (жене/мушкарци)	30/18	35/15	<i>p</i> =0.08
Трајање болести (године, mean±SD)	6,19 (1-34)	8,64 (2-18)	<b><i>p</i>=0.01</b>
Стопа релапса (mean, rang)	2,42 (0-5)	1,24 (0-6)	<b><i>p</i>=0.05</b>
BMI (кг/м <sup>2</sup> )	22,98±3,67	22,50±1,78	<i>p</i> =0.40

MS- Мултипла склероза, BMI-Body Mass Index

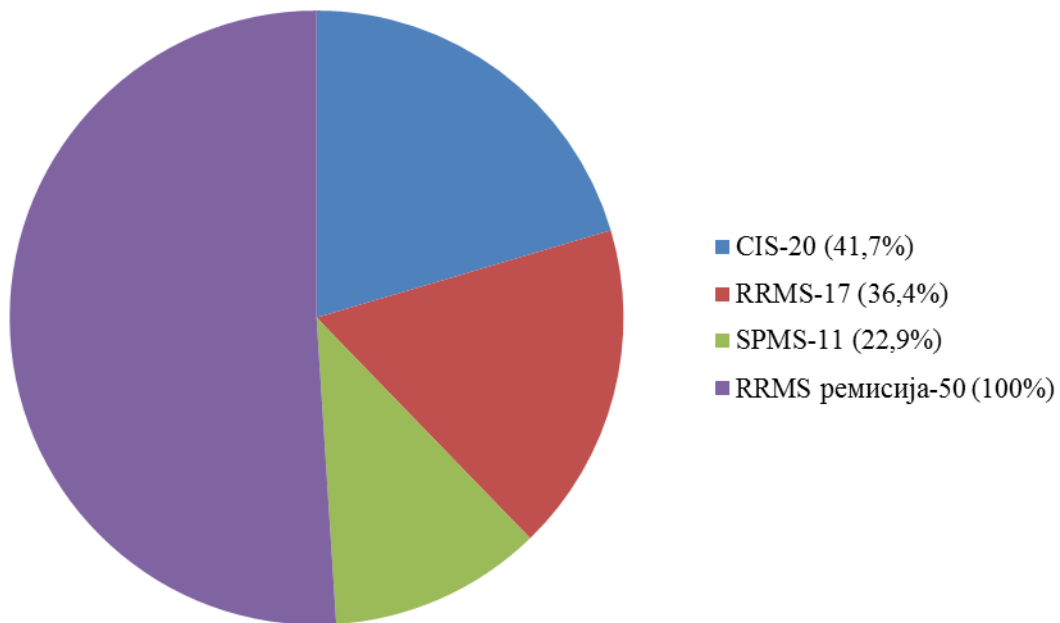
\* Ман-Витнијев тест, статистичка значајност  $p < 0,05$

Није показана статистички значајна разлика у полној дистрибуцији и узрасту између група. У MS групи у релапсу било је 30 жена и 18 мушкараца, док је у групи у ремисији било 35 жена и 15 мушкараца. Субјекти су били приближне старости: средња вредност година старости у MS групи у релапсу је износила  $41,7 \pm 9,13$ , док је у групи у ремисији била  $38,6 \pm 7,88$ . Средња вредност дужине трајања болести у кохорти пацијената у ремисији била је статистички значајно дужа него у кохорти у релапсу ( $6,19 \pm 7,11$  vs.  $8,64 \pm 4,46$ ;  $p=0.01$ ). Минимална дужина трајања болести у релапсној групи је била једна година, а максимална 38 година, док је у групи у ремисији минимална дужина трајања болести била 2 године, а максимална 18 година. Стопа релапса је била виша у групи пацијената који су тренутно били у релапсу ( $2,42 \pm 1,22$  vs.  $1,24 \pm 1,39$ ;  $p=0.05$ ). Индекс телесне масе се није статистички значајно разликовао између ове две кохорте пацијената.

На Фигури број 1 је приказана заступљеност различитих форми болести код MS испитаника. У релапсној групи заступљеност је била следећа: 20 пацијената (41,7%) је имало CIS, 17 пацијената (36,4%) је имало RRMS и 11 пацијената (22,9%) је имало SPMS. У ремитентној групи, сви пацијенти су имали RRMS. Просечна дужина трајања примене терапије у овој групи је била  $4,42 \pm 3,64$  године (ранг 1-12).

### Фигура број 1

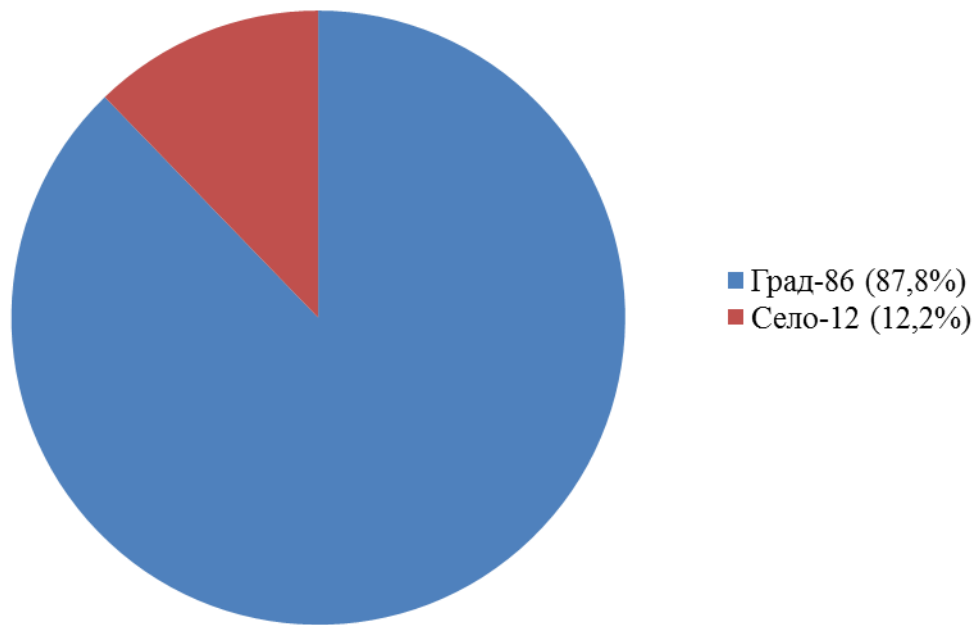
#### Заступљеност различитих форми болести по групама



На Фигури број 2 је представљена дистрибуција испитаника у односу на место становања. 86 испитаника (87,8%) је имало стално место боравка у градској средини, док је 12 испитаника (12,2%) живело на селу.

## Фигура број 2

### Дистрибуција испитаника према месту становања



На Фигури број 3 је представљена дистрибуција MS испитаника према степену образовања. Добијени су следећи подаци: 4 испитаника је завршило основну школу (4,1%), средњу школску спрему је имало 67 испитаника (68,4%), вишу школску спрему је имало 5 испитаника (5,1%), док је 22 испитаника стекло високу стручну спрему (22,4%).

### Фигура број 3

Дистрибуција MS испитаника према степену образовања



Испитивањем радног статуса учесника у студији, утврђено је да је 50 испитаника (51%) било у радном односу, 28 испитаника (28,6 %) је било незапослено док је 20 испитаника (20,4%) било пензионисано. Подаци су представљени на Фигури број 4.

#### Фигура број 4

ДистрибуцијаMS испитаника према радном статусу



## 5.2. Серумски нивои UA код MS испитаника

Испитали смо и поредили нивое UA у серуму MS пацијената у релапсу и ремисији са здравим контролама.

Табела 3. Ниво UA у серуму код MS групе у релапсу и контролне групе

Варијабла	MS група у релапсу ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE)	Здрави ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE)	<i>p</i>
<b>UA</b>	236,97 $\pm$ 9,25	314,82 $\pm$ 11,02	<b>0,000</b>

MS-Мултипла склероза, UA-Мокраћна киселина

\* GLM –Генерални линеарни модел (анализа коваријанси),  $p < 0,05$

Измерене су статистички значајно ниже вредности UA у серуму код пацијената у релапсу у односу на контролну групу (236,97 $\pm$ 9,25 vs. 314,82 $\pm$ 11,02 $\mu\text{mol/L}$ ,  $F=14,339$ ,  $df = 2/128$ ,  $p=0,000$ ).

Табела 4. Ниво UA у серуму код MS групе у ремисији и контролне групе

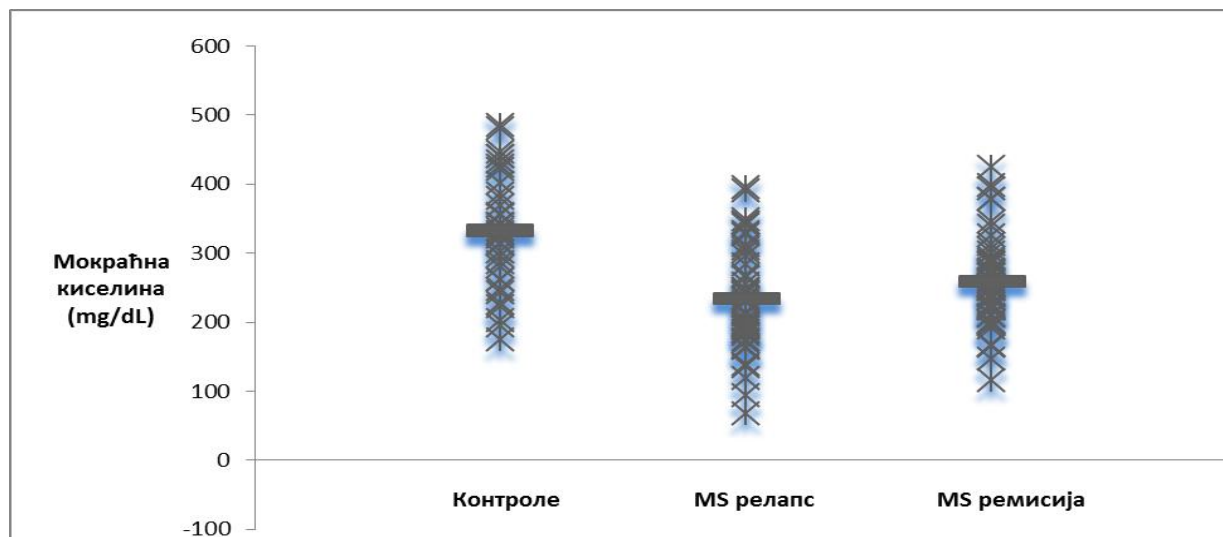
Варијабла	MS група у ремисији ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE)	Здрави ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE)	<i>p</i>
<b>UA</b>	268,27 $\pm$ 0,09	314,82 $\pm$ 11,02	<b>0,000</b>

MS-Мултипла склероза, UA-Мокраћна киселина

\* GLM –Генерални линеарни модел (анализа коваријанси),  $p < 0,05$ .



Такође су регистроване статистички значајно ниже серумске вредности UA код пацијената који су били у ремисији у поређењу са здравим добровољцима ( $268,27 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$  vs.  $314,82 \pm 11,02 \mu\text{mol/L}$ ,  $F=14,339$ ,  $df=2/128$ ,  $p=0,000$ ).



Фигура 5. Серумски нивои UA код здравих субјеката ( $n=35$ ), MS групе у релапсу ( $n=48$ ) и MS групе у ремисији ( $n=50$ ) одређивани су Beckman Coulter аутоаналајзером. Резултати су представљени као средње вредности и стандардне грешке ( $\text{mean} \pm \text{SE}$ ). Статистичка значајност је тестирана GLM моделом ( $p < 0,05$ ). Статистички значајно ниже вредности су измерене у групи пацијената са релапсом, у односу на контролну групу ( $236,97 \pm 9,25 \mu\text{mol/L}$  vs.  $314,82 \pm 11,02 \mu\text{mol/L}$ ;  $p=0,000$ ). Такође су регистроване значајно ниже вредности UA и у групи MS пацијената у ремисији у поређењу са контролном групом ( $268,27 \pm 0,09$  vs.  $314,82 \pm 11,02$ ;  $p=0,000$ ).

Затим смо упоредили ниво UA у серуму код MS пацијената у релапсу и MS пацијената у ремисији. Резултати из табеле 5 указују да постоји статистички значајна разлика у нивоу UA код пацијената у релапсу и пацијената у ремисији (230,27±8,88  $\mu\text{mol/L}$  vs. 262,26±8,70  $\mu\text{mol/L}$ , F=6,578, df=1/94, p=0.010).

Табела 5. Ниво UA у серуму код MS група у релапсу и ремисији

Варијабла	MS релапс ( $\mu\text{mol/L}$ , mean±SE)	MS ремисија ( $\mu\text{mol/L}$ , mean±SE)	<i>p</i>
UA	230,27±8,88	262,26±8,70	<b>0.010</b>

MS-Мултипла склероза, UA-Мокраћна киселина

\* GLM –Генерални линеарни модел (анализа коваријанси),  $p < 0,05$

MS групу у релапсу смо затим поделили према форми болести на CIS, RRMS, SPMS и међусобно смо их упоредили како би утврдили да ли постоје разлике у нивоу UA у различитим клиничким фенотиповима болести. Нисмо нашли статистички значајну разлику у нивоу UA између CIS, RRMS и SPMS (216,22±16,27  $\mu\text{mol/L}$  vs. 240,64±13,48  $\mu\text{mol/L}$  vs. 254,77±18,82  $\mu\text{mol/L}$ , F=1.300, df=2/43, p=0.283).

Табела 6. Нивои UA у серуму код различитих клиничких форми болести

<b>Варијабла</b>	<b>CIS</b> ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE)	<b>RRMS</b> ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE)	<b>SPMS</b> ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE)	<b><i>p</i></b>
<b>UA</b>	216,22 $\pm$ 16,27	240,64 $\pm$ 13,48	254,77 $\pm$ 18,82	0.283

CIS-Клинички изоловани синдром, RRMS-Релапно ремитентна мултипла склероза,

SPMS-Секундарно прогресивна мултипла склероза,UA-Мокраћна киселина

\* GLM –Генерални линеарни модел (анализа коваријанси),  $p < 0,05$

Пацијенти у ремисији имају статистички значајно више вредности UA у серуму од пацијената са CIS (216,36 $\pm$ 19,25 $\mu\text{mol/L}$  vs. 260,86 $\pm$ 8,74  $\mu\text{mol/L}$ , F=4,318, df=1/57,  $p=0,042$ ).

Није утврђена статистички значајна разлика у нивоу UA у серуму између пацијената са RRMS у релапсу и RRMS у ремисији (231,74 $\pm$ 13,10 $\mu\text{mol/L}$  vs. 256,21 $\pm$ 8,69 $\mu\text{mol/L}$ , F=2,419, df=1/68,  $p=0,124$ ), као ни између SPMS и пацијената у ремисији (250,06 $\pm$ 18,27 $\mu\text{mol/L}$  vs. 258,38 $\pm$ 8,46 $\mu\text{mol/L}$ , F=0,169, df=1/57,  $p=0,683$ ).

Табела 7. Нивои UA код пацијената у ремисији и различитих клиничких форми болести у релапсу

<b>Групе испитаника</b>	<b>UA</b> ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE)	<b><i>p</i></b>
<b>CIS vs. RRMS ремисија</b>	216,36 $\pm$ 19,25 vs. 260,86 $\pm$ 8,74	<b>0,042</b>
<b>RRMS релапс vs. RRMS ремисија</b>	231,74 $\pm$ 13,10 vs. 256,21 $\pm$ 8,69	0,124
<b>SPMS vs. RRMS ремисија</b>	250,06 $\pm$ 18,27 vs. 258,38 $\pm$ 8,46	0,683

CIS-Клинички изоловани синдром, RRMS-Релапно ремитентна мултипла склероза, SPMS-Секундарно прогресивна мултипла склероза,UA-Мокраћна киселина

\* GLM –Генерални линеарни модел (анализа коваријанси),  $p < 0,05$

У групи MS пацијената у релапсу, код 20 пацијената смо измерили вредности UA у серуму пре примене пулсне, кортикостероидне терапије. Потом смо 3 месеца од примене пулсне кортикостероидне терапије, код ових пацијената поновили мерења. Средња вредност нивоа UA у серуму пре примене терапије је била  $225,05 \pm 14,89 \mu\text{mol/L}$ , док је 3 месеца након терапије износила  $371,96 \pm 114,51 \mu\text{mol/L}$ .

Табела 8. Нивои UA код MS пацијената у релапсу пре и након примене пулсне терапије

	<b>Пре терапије</b> ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE) (mg/L, mean $\pm$ SE)	<b>После терапије</b> ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE) (mg/L, mean $\pm$ SE)	<b><i>p</i></b>
<b>UA</b>	225,05 $\pm$ 14,89	371,96 $\pm$ 114,51	0,222

UA- Мокраћна киселина

\*Упарени Т тест,  $p < 0,05$

Није нађена статистички значајна разлика у нивоу UA у серуму пре и након 3 месеца од прмењене пулсне кортикостероидне терапије ( $t=1,261$ ,  $df=19$ ,  $p=0,222$ ).

У овој студији испитивање нивоа UA код MS и здравих субјеката вршено је уз контролу пола и BMI као кофаундинг фактора тј. фактора за које се зна да могу имати утицај на серумски ниво UA. Наши резултати указују да пол ( $F=14,360$ ,  $df 1/86$ ,  $p=0,000$ ,  $\text{partial eta squared}=0,142$ ) и BMI ( $F=4,515$ ,  $df=1/86$ ,  $p=0,036$ ,  $\text{partial eta squared}=0,050$ ) имају статистички значајан утицај на ниво UA у серуму.

### 5.3. Серумски нивои CRP код MS испитаника

Обављање рутинских лабораторијских анализа обухватило је и мерење серумског нивоа CRP као неуроинфламаторног маркера. Обзиром да су прву групу чинили испитаници у акутном релапсу, са актуелном неуроинфламацијом а да су другу групу чинили испитаници у стабилној фази болести, испитали смо да ли постоји статистички значајна разлика у серумском нивоу CRP међу групама. Установљена је статистички значајна разлика CRP између пацијената у акутном релапсу и ремисији ( $4,46 \pm 0,40 \text{ mg/L}$  vs.  $1,01 \pm 0,38 \text{ mg/L}$ ;  $F=15,906$ ,  $df= 1/86$ ,  $p=0,000$ ).

Табела 9. Нивои CRP код MS пацијената у релапсу и ремисији

	<b>MS релапс</b> (mg/L, mean±SE)	<b>MS ремисија</b> (mg/L, mean±SE)	<b><i>p</i></b>
<b>CRP</b>	4,46±0,40	1,01±0,38	<b>0,000</b>

CRP-Ц реактивни протеин, MS-Мултипла склероза

\* GLM –Генерални линеарни модел (анализа коваријанси),  $p < 0,05$

Код 20 MS пацијената у релапсу смо измерили вредности CRP у серуму пре примене пулсне, кортикостероидне терапије. Потом смо 3 месеца од примене пулсне кортикостероидне терапије, код ових пацијената поновили мерење. Средња вредност CRP код ових пацијената пре терапије је била  $5,87 \pm 1,00$  mg/L, док је 3 месеца након примењене терапије износила  $2,83 \pm 0,76$  mg/L.

Табела 10. Нивои CRP код MS пацијената у релапсу пре и након примене пулсне терапије

	<b>Пре терапије</b> ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE) (mg/L, mean $\pm$ SE)	<b>После терапије</b> ( $\mu\text{mol/L}$ , mean $\pm$ SE) (mg/L, mean $\pm$ SE)	<b><i>p</i></b>
<b>CRP</b>	5,87 $\pm$ 1,00	2,83 $\pm$ 0,76	<b>0,024</b>

CRP-Ц реактивни протеин

\*Упарени Т тест,  $p < 0,05$

Ниво CRP у серуму је статистички значајно нижи 3 месеца након примене пулсне, кортикостероидне терапије у поређењу са нивоом пре примене терапије ( $t=2,452$ ,  $df=19$ ,  $p=0,024$ ). И у случају мерења серумског нивоа CRP вршена је контрола пола и BMI као коваријата и добијени резултати су показали да утицај пола ( $F=2,044$ ,  $df 1/86$ ,  $p=0,156$ , partial eta squared=0,023) и BMI ( $F=1,908$ ,  $df=1/86$ ,  $p=0,171$ , partial eta squared=0,025) на вредности CRP није био статистички значајан.

#### 5.4. Скорови клиничких скала процене код MS испитаника

Испитали смо учесталост замора и депресије у обе групе испитаника на основу FSS и BDI скорова. У MS групи у релапсу замор је био присутан код 32 испитаника (66.7%), док је депресивна симптоматологија детектована код 21 испитаника (43.7%). У MS групи пацијената у ремисији замор је опсервиран код 28 пацијената (56%) док је депресивна симптоматологија била присутна код 12 испитаника (24%). Затим смо одредили средње вредности скорова на EDSS, FSS и BDI скали, и упоредили да ли постоји статистички значајна разлика у средњим вредностима скорова међу групама.

Табела 11. Средње вредности FSS, BDI и EDSS скорова код MS пацијената у релапсу и ремисији

<b>Варијабле</b>	<b>MS група у релапсу</b>	<b>MS група у ремисији</b>	<b><i>p</i></b>
<b>EDSS скор</b>	4,02±1,92	2,07±1,17	<b>0,000</b>
<b>FSS скор</b>	4,91±1,18	4,80±1,06	0,711
<b>BDI скор</b>	15,68±16,62	8,36±7,10	<b>0,045</b>

MS-Мултипла склероза, EDSS-Проширена скала функционалне онеспособљености, FSS-Скала тежине замора, BDI-Бекова скала депресивности

\*Ман-Витнијев тест,  $p < 0,05$

Група пацијената у релапсу имала је статистички значајно виши EDSS скор ( $4.02 \pm 1.92$  vs.  $2.07 \pm 1.17$ ;  $p=0.000$ ) и BDI скор ( $15.68 \pm 16.62$  vs.  $8.36 \pm 7.10$ ;  $p=0.045$ ). Није уочена значајна разлика у FSS скору код пацијената у релапсу и ремисији.

Код 20 пацијената у релапсу смо измерили EDSS, FSS и BDI скор пре примене пулсне, кортикостероидне терапије. Потом смо 3 месеца након примењене терапије, тј. у фази ремисије спровели ретестирање. Средња вредност EDSS скорa пре терапије је била  $4,24 \pm 3,99$ , док је средња вредност EDSS скорa 3 месеца после примењене терапије износила  $3,72 \pm 0,44$ . Средња вредност FSS скорa пре терапије је била  $4,54 \pm 0,34$ , док је 3 месеца после примењене терапија била  $3,15 \pm 0,41$ . Средња вредност BDI скорa пре терапије је износила  $21,68 \pm 4,54$ , док је 3 месеца после примењене терапије износила  $12,80 \pm 2,75$ .



Табела 12. Средње вредности EDSS, FSS и BDI скорова код MS пацијената у релапсу, пре и након пулсне терапије

	Пре терапије	После терапије	<i>p</i>
<b>EDSS скор</b>	4,24±3,99	3,72±0,44	<b>0,005</b>
<b>FSS скор</b>	4,54±0,34	3,15±0,41	<b>0,002</b>
<b>BDI скор</b>	21,68±4,54	12,80±2,75	0,060

EDSS-Проширена скала функционалне онеспособљености, FSS-Скала тежине замора, BDI-Бекова скала депресивности

\*Упарени Т тест,  $p < 0,05$

Резултати из табеле 12 показују да је степен неуролошке онеспособљености -EDSS скор статистички значајно мањи 3 месеца након примене терапије тј. у ремисији у поређењу са скором пре примене терапије тј. у релапсу ( $t=3,199$ ,  $df=19$ ,  $p=0,005$ ). Такође, степен замора (FSS скор) је статистички значајно мањи 3 месеца након примењене терапије, тј. у ремисији у поређењу са скором замора пре терапије тј. у релапсу ( $t=3,656$ ,  $df=19$ ,  $p=0,002$ ). Није показана статистички значајна разлика у скоровима на BDI скали пре и након примене терапије ( $t=1,999$ ,  $df=19$ ,  $p=0,060$ ).

## 5.6. Корелације UA са клиничким скалама процене

Испитали смо да ли постоји корелација нивоа UA у серуму са клиничким скалама које смо користили за детекцију неуролошке онеспособљености, замора и депресије.

Табела 13. Корелације нивоа UA у серуму и скорова скала клиничке процене

Инструменти	Пирсонов коефицијент корелације ( r )	<i>p</i>
<b>EDSS скор</b>	-0,13	0,117
<b>FSS скор</b>	-0,17	0,081
<b>BDI скор</b>	-0,11	0,259

EDSS-Проширена скала функционалне онеспособљености, FSS-Скала тежине замора, BDI-Бекова скала депресивности

\*Пирсонова корелација,  $p < 0,05$

Није утврђена статистички значајна корелација нивоа UA у серуму са EDSS скором ( $p=0.117$ ), FSS скором ( $p= 0,081$ ) и укупним BDI скором ( $p=0.259$ ).

Даље смо испитали да ли ниво UA у серуму корелира са појединачним ајтемима на EDSS, FSS и BDI скалама. Није нађена статистички значајна корелација нивоа UA у серуму са поддоменима на EDSS скали. Постоји статистички значајна, негативна корелација са FSS ајтемом који се односи на утицај замора на активности свакодневног живота ( $p=0.03$ ,  $r=-$

0.21). Такође, постоји статистички значајна, негативна корелација нивоа UA у серуму са BDI ајтемом који указује на присуство симптома туге ( $p=0.008$ ,  $r=-0.30$ ).

### 5.6. Корелације CRP са клиничким скалама процене

Испитали смо да ли постоји корелација нивоа CRP у серуму са скоровима на EDSS, FSS и BDI скалама.

Табела 14. Корелације нивоа CRP у серуму и скорова скала клиничке процене

<b>Инструменти</b>	<b>Пирсонов коефицијент корелације ( r )</b>	<b><i>p</i></b>
<b>EDSS скор</b>	0,57	<b>0,000</b>
<b>FSS скор</b>	0,40	<b>0,030</b>
<b>BDI скор</b>	0,40	<b>0,000</b>

EDSS-Проширена скала функционалне онеспособљености, FSS-Скала тежине замора, BDI-Бекова скала депресивности

\*Пирсонова корелација,  $p<0,05$

Утврђена је статистички значајна, позитивна корелација нивоа CRP у серуму са EDSS скором ( $p=0.000$ ,  $r=0.57$ ), FSS скором ( $p=0.030$ ,  $r=0.40$ ) и BDI скором ( $p=0.000$ ,  $r=0.40$ ).

Даље смо испитали да ли ниво CRP у серуму корелира са појединачним ајтемима на EDSS, FSS и BDI скалама.

Табела 15. Корелације нивоа CRP у серуму са функционалним системима на EDSS скали

<b>Функционални системи</b>	<b>Пирсонов коефицијент корелације ( r )</b>	<b>p</b>
<b>Визуелни</b>	0,30	<b>0,003</b>
<b>Мождано стабло</b>	0,21	<b>0,036</b>
<b>Пирамидн</b>	0,20	<b>0,049</b>
<b>Церебеларни</b>	0,24	<b>0,014</b>
<b>Сензорни</b>	0,41	<b>0,000</b>
<b>Сфинктери</b>	0,22	<b>0,028</b>
<b>Ход</b>	0,30	<b>0,004</b>
<b>Церебрални</b>	0,07	0,478

\*Пирсонова корелација,  $p < 0,05$

Постоји статистички значајна, позитивна корелација нивоа CRP у серуму са следећим функционалним поддоменима на EDSS скали: визуелним ( $p=0,003$ ,  $r=0,30$ ), можданим стаблом ( $p=0,036$ ,  $r=0,21$ ), пирамидним ( $p=0,049$ ,  $r=0,20$ ), церебеларним ( $p=0,014$ ,  $r=0,24$ ), сензорним ( $p=0,000$ ,  $r=0,41$ ), сфинктерима ( $p=0,028$ ,  $r=0,22$ ), ходом ( $p=0,004$ ,  $r=0,30$ ) али не и церебралним ( $p=0,478$ ,  $r=0,07$ ).

Утврђена је статистички значајна, позитивна корелација нивоа CRP у серуму са ајтемом на FSS скали који означава утицај замора на активности свакодневног живота ( $p=0,05$ ,  $r=0,40$ ).

Табела 16. Корелације нивоа CRP у серуму са статистички значајним појединачним ајтемима на BDI скали

<b>Ајтеми</b>	<b>Пирсонов коефицијент корелације ( r )</b>	<b>p</b>
<b>Туга</b>	0,30	<b>0,003</b>
<b>Осећај промашености</b>	0,32	<b>0,001</b>
<b>Незадовољство собом</b>	0,23	<b>0,019</b>
<b>Неодлучност</b>	0,20	<b>0,050</b>
<b>Неспособност за рад</b>	0,30	<b>0,003</b>
<b>Несаница</b>	0,21	<b>0,034</b>
<b>Замор</b>	0,30	<b>0,012</b>
<b>Губитак апетита</b>	0,34	<b>0,001</b>
<b>Преокупација телесним тегобама</b>	0,40	<b>0,000</b>

\*Пирсонова корелација,  $p < 0,05$

На BDI скали, ниво CRP у серуму је корелирао са следећим ајтемима: ајтем 1-присуство туге ( $p=0,003$ ,  $r=0,30$ ), ајтем 3-осећај промашености ( $p=0,001$ ,  $r=0,32$ ), ајтем 7 - незадовољство собом ( $p=0,019$ ,  $r=0,23$ ), ајтем 13-неодлучност ( $p=0,050$ ,  $r=0,20$ ), ајтем 15-неспособност за рад ( $p=0,003$ ,  $r=0,30$ ), ајтем 16-несаница ( $p=0,034$ ,  $r=0,21$ ), ајтем 17-замор ( $p=0,012$ ,  $r=0,30$ ), ајтем 18-губитак апетита ( $p=0,001$ ,  $r=0,34$ ) и ајтем 20-преокупација телесним тегобама ( $p=0,000$ ,  $r=0,40$ ).

Уочена је статистички значајна, позитивна корелација између FSS и EDSS скова ( $p=0,000$ ,  $r=0,40$ ), FSS и BDI скова ( $p=0,000$ ,  $r=0,45$ ), и BDI и EDSS скова ( $p=0,000$ ,  $r=0,45$ ).

## 5.7. Утицај социодемографских и клиничких параметара на MS, замор и депресију

Да би смо испитали који социодемографски и клинички параметри утичу на појаву болести, урадили смо бинарну логистичку регресиону анализу. Имајући у виду утицај пола и BMI, као потенцијалних конфаундинг фактора, приликом ове анализе, вршена је контрола конфаундинга у односу на зависну варијаблу.

Табела 17. Утицај нивоа UA у серуму на почетак болести

Зависна варијабла	Независна варијабла	Wald	Број степени слободе	Количник вероватноће	95% интервал поверења	<i>p</i>
Почетак болести	UA	21,902	1	0,986	0,97-0,99	<b>0,000</b>

UA- Мокраћна киселина

\*Бинарна логистичка регресија,  $p < 0,05$

Ниво UA у серуму има статистички значајан утицај на појаву болести ( $\chi^2=28.933$ ,  $df=1$ ,  $p=0.000$ ; Nagelkerke=0.289; 77.4 % свих случајева је коректно класификовано са 92.9 % сензитивности и 34.3 % специфичности).

У циљу процене утицаја социодемографских и клиничких параметара (пол, године живота, ниво образовања, дужина трајања болести, EDSS и FSS скор) на појаву депресије код оболелих од MS такође је урађена бинарна логистичка регресија. MS пацијенте смо најпре поделили у 2 групе: MS групу са присутном депресивном симптоматологијом и MS групу без присутне депресивне симптоматологије. Присуство ових симптома је мерено

BDI скалом. Код пацијената са MS, скор > 13 на BDI скали се користи као доња гранична вредност која означава присуство симптома депресије, уз сензитивност од 71% и специфичност од 79% [27].

Табела 18. Утицај демографских и клиничких карактеристика на појаву депресије

Зависна варијабла	Независна варијабла	Wald	Број степени слободе	Количник вероватноће	95% интервал поверења	<i>p</i>
Депресија	Пол	0,001	1	0,984	0,39-2,48	0,973
	Године живота	2,138	1	0,960	0,90-1,01	0,144
	Образовање	0,022	1	1,038	0,63-1,70	0,883
	Дужина болести	0,037	1	0,992	0,91-1,07	0,848
	EDSS скор	10,970	1	0,636	0,48-0,83	<b>0,001</b>
	FSS скор	13,540	1	0,587	0,44-0,77	<b>0,000</b>

EDSS-Проширена скала функционалне онеспособљености, FSS-Скала тежине замора

\*Бинарна логистичка регресија  $p < 0,05$

Наши резултати указују да EDSS и FSS скор имају утицај на појаву депресије ( $\chi^2=15.214$ ,  $df=5$ ,  $p=0.009$ ; Nagelkerke=0.199; 75.5% свих случајева је коректно класификовано са 62.4% сензитивности и 92.3% специфичности).

Бинарном логистичком регресијом смо испитали утицај пола, година живота, нивоа образовања, дужине трајања болести, EDSS и BDI скор на појаву замора код оболелих од MS. Присутност замора је мерено FSS скалом на којој скор > 4 означава присуство замора.

Према овој доњој граничној вредности смо узорак поделили на две групе: група оболелих од MS који имају замор и групу оболелих од MS који немају замор.

Табела 19. Утицај демографских и клиничких карактеристика на појаву замора

Зависна варијабла	Независна варијабла	Wald	Број степени слободе	Количник вероватноће	95% интервал поверења	<i>p</i>
<b>Замор</b>	Пол	0,5003	1	1,403	0,55-3,58	0,4778
	Године живота	7,783	1	0,917	0,86-0,97	<b>0,005</b>
	Образовање	2,347	1	0,672	0,40-1,11	0,126
	Дужина болести	0,453	1	0,973	0,89-1,05	0,501
	EDSS скор	5,472	1	0,727	0,55-0,95	<b>0,019</b>
	BDI скор	8,810	1	0,916	0,86-0,97	<b>0,003</b>

EDSS-Проширена скала функционалне онеспособљености, BDI-Бекова скала депресивности

\*Бинарна логистичка регресија  $p < 0,05$

Добијени резултати показују да године живота као и вредности EDSS и BDI скорa статистички значајно утичу на појаву замора ( $\chi^2=20.059$ ,  $df=5$ ,  $p=0.001$ ; Nagelkerke=0.247; 71.4% свих случајева је коректно класификовано са 63.0% сензитивности и 78.8% специфичности).



## 5.8. Предиктори замора и депресије

Применом мултипле регресионе анализе испитали смо предиктивни значај социодемографских и клиничких параметара на FSS и BDI скор.

Табела 20. Предиктивне вредности демографских и клиничких параметара на FSS скор

Зависна варијабла	Предиктор	B	SE	$\beta$	T	<i>p</i>
FSS скор	Године живота	0,060	0,020	0,291	2,627	<b>0,004</b>
	Форма болести	1,141	0,307	0,355	3,715	<b>0,000</b>
	EDSS скор	0,364	0,091	0,380	4,030	<b>0,000</b>

EDSS- Проширена скала функционалне онеспособљености, FSS-Скала тежине замора

\*Мултипла регресиона анализа,  $p < 0,05$

На основу резултата приказани на табели 20, закључује се да године живота, клиничка форма болести ( $F(1/95) = 4.339$ ,  $p = 0.040$ ,  $R^2 = 0.164$ , Adjusted  $R = 0.146$ ) и EDSS скор ( $F(1/96) = 16.243$ ,  $p = 0.000$ ,  $R^2 = 0.145$ , Adjusted  $R = 0.136$ ) имају статистички значајну предиктивну вредност на FSS скор.

Табела 21. Предиктивне вредности демографских и клиничких параметара на BDI скор

Зависна варијабла	Предиктор	B	SE	$\beta$	T	p
BDI скор	Форма болести	8,293	2,197	0,352	3,775	<b>0,000</b>
	Имуномодулаторна терапија	-8,289	2,439	-0,339	-3,411	<b>0,001</b>
	CRP	0,850	0,419	0,200	2,032	<b>0,040</b>
	EDSS скор	2,383	0,696	0,337	3,424	<b>0,001</b>

BDI-Бекова скала депресивности, CRP-Ц реактивни протеин, EDSS- Проширена скала функционалне онеспособљености

\*Мултипла регресиона анализа  $p < 0,05$

Статистички значајни предиктори вредности скорa на BDI скали су: клиничка форма болести, примена имуномодулаторне терапије (IFN-beta1a) ( $F(1/95) = 13.236$ ,  $p = 0.000$ ,  $R^2 = 0.198$ , Adjusted  $R = 0.182$ ), вредности CRP и EDSS скорa ( $F(1/95) = 4.128$ ,  $p = 0.04$ ,  $R^2 = 0.203$ , Adjusted  $R = 0.187$ ).

## 5. ДИСКУСИЈА

Главни циљ нашег истраживања је био да се испитају нивои UA у серуму као маркера оксидативног стреса, и нивои CRP у серуму као маркера неуроинфламације, код пацијената са MS у различитим фазама и клиничким формама болести, као и њихов утицај на степен неуролошке онеспособљености, замора и депресивне симптоматологије код ових пацијената.

Показали смо да су нивои UA у серуму код оболелих од MS нижи у свим фазама болести у поређењу са здравим, контролим субјектима, као и да је ниво CRP у серуму виши код MS групе у релапсу при поређењу са MS групом у ремисији. Наши резултати индикују да серумски ниво UA може имати утицаја на појаву болести. Такође смо показали да примена пулсне, кортикостероидне терапије у фази релапса утиче на повећање нивоа UA у серуму и смањење серумског нивоа CRP. Већи степен неуролошке онеспособљености и депресивне симптоматологије су уочени код пацијената у релапсу у поређењу са пацијентима који су били у стабилној фази болести. Након примене терапије региструју се мањи степен неуролошке онеспособљености (EDSS скор), замора (FSS скор), као и снижење BDI скорa. Ниво UA у серуму корелира са присуством туге и отежаним активностима свакодневног живота, док ниво CRP у серуму корелира са EDSS, FSS и BDI скоровима. Уочена је позитивна корелација између степена неуролошке онеспособљености и замора, депресивне симптоматологије и замора, као и степена неуролошке онеспособљености и депресивне симптоматологије. Показали смо да на појаву замора утичу године живота, степен неуролошке онеспособљености, а да на појаву депресије утичу такође степен неуролошке онеспособљености и степен замора. Ниво CRP у серуму је значајан предиктор BDI скорa, а степен неуролошке онеспособљености је значајан предиктор FSS и BDI скорa.

## 5.1. UA-маркер оксидативног стреса у MS

Неуроинфламација и неуродегенерација су патогенетски механизми који су присутни у раним фазама MS (171, 172). Претходна запажања потврђују чињеницу да је оксидативни стрес значајан фактор који суделује у овим процесима и настанку демиелинизације (173,174). У условима неуроинфламације, долази до стварања велике количине NO помоћу ензима који учествује у његовој синтези, индуктивне азот оксид синтазе (iNOS). Активност овог ензима у ћелијама индукују продукти инфекције, егзотоксини као и медијатори запаљења-citoкини (175). Активирани микроглијалне ћелије и астроцити такође продукују веће количине реактивних оксиданаса који даљом интеракцијом формирају још снажнији оксиданс пероксинитрит узрокујући оштећење неурона и последичну неуродегенерацију (77, 80). На анималном моделу MS, експерименталном аутоимуном енцефалитису је показано да инхибиција iNOS и инхибиција стварања пероксинитрита супримирају настанак болести, као и да је UA ефикасни „чистач“ пероксинитрита (98).

У последње две деценије је показано да глутатион, алфа токоферол, аскорбинска киселина и UA имају улогу у антиоксидативној одбрани организма и да смањују штетне ефекте слободних радикала (176). Чињеница која подржава ову тезу је налаз снижених вредности глутатиона, алфа токоферола и UA у демиелинизационим плаковима (177). Мерење антиоксидативног капацитета организма може се вршити мерењем серумских нивоа наведених антиоксиданаса, између осталих и мерењем серумског нивоа UA (178).

Из претходно наведених чињеница је јасно да су се многе студије бавиле испитивањем нивоа UA у серуму код оболелих од MS, али су резултати неконзистентни. Поједини аутори су показали да су код MS пацијената нивои UA у серуму снижени, у појединим студијама нису опсервиране разлике у нивоу UA код оболелих од MS у поређењу са здравим контролним субјектима ( 101, 102, 179). Наши резултати су показали да оболели од MS имају ниже нивое UA у серуму. Овај налаз је конзистентан са недавно објављеном мета анализом која је показала да MS пацијенти имају значајно ниже вредности UA у серуму у поређењу са здравим, контролним субјектима (102).

Различитост резултата је тешко објаснити али је до сада указано на неколико чињеница: мали испитивани узорак, изостанак контроле кофаундинг фактора који утичу на ниво UA, погрешан избор испитаника који чине контролну групу (180). Неколико студија је истраживало разлике у серумским нивоима UA у серуму код оболелих од MS и контролних субјеката које су чинили пацијенти оболели од других неуролошких болести (181). Данас је сасвим јасно да нивои UA у серуму могу бити варијабилни и код неких других неуролошких поремећаја, какви су на пример Паркинсонова болест или мијастенија гравис што индикује да субјекти контроле групе морају бити бирани пажљиво (182, 183).

При одређивању серумске концентрације UA је неопходно узети у обзир могући утицај бројних фактора, између којих су пол и BMI, те смо испитали њихов утицај на ову зависну променљиву. Наши резултати су показали да пол и BMI значајно детерминишу ниво UA у серуму код оболелих од MS. Раније су презентовани резултати да жене имају значајно ниже вредности UA у серуму у поређењу са мушкарцима. Могуће објашњење овог феномена је смањена антиоксидативна активност и већа инциденца MS међу женама (184). Такође, низак BMI (малнутриција) доводи до смањења нивоа овог параметра у

серуму (185). И наш налаз указује да се утицај ових фактора на ниво UA не може искључити.

Даље смо евалуирали серумске нивое UA у различитим фазама и клиничким формама MS. Наши налази показују да MS пацијенти у ремисији тј. стабилној фази болести и на имуномодулаторној терапији имају значајно више вредности UA у серуму у поређењу са MS пацијентима у актуелном погоршању болести који нису на терапији. Овај резултат се са једне стране може објаснити чињеницом да је у периоду акутног погоршања интензитет неуроинфламације већи услед чега се ниво UA у серуму смањује због њеног проласка кроз оштећењу BBB и уласка у CNS где испољава своје антиоксидативно дејство као „чистач“ пероксинитрита. Са друге стране MS група у ремисији је била на терапији IFN-beta који својим антиинфламаторним механизмом дејства утиче на природни ток болести тако што смањује учесталост и тежину релапса, редукује број активних промена на MR и последично повећава серумске нивое UA (186).

Испитивањем MS пацијената дошло се до сазнања да пацијенти у раној, инфламаторној фази болести (CIS и RRMS) имају ниже нивое UA у серуму у поређењу са пацијентима у каснијим фазама (SPMS) болести што се објашњава чињеницом да у раној, инфламаторној фази MS, доминирају неуроинфламација и оксидативни стрес, док је неуродегенерација доминантан процес у прогресивним стадијумима MS (187). Наши резултати су показали да пацијенти са SPMS имају више нивое UA у серуму од испитаника са RRMS и CIS, што говори у прилог претходно наведеном запажању, међутим разлике између наведених група у нашем случају нису биле статистички значајне. Код пацијената у релапсу уочени су виши нивои UA у серуму након 3 месеца од примене пулсне, кортикостероидне терапије у поређењу са нивоима пре примене терапије што је у складу са сазнањем да MR редукује интензитет запаљенског процеса смањењем стварања антитела и многих

медијаторских ћелија инфламације као и сазнањем да овим механизмом дејства индиректно повећава ниво UA у серуму (104).

До данас још увек није у потпуности разјашњено да ли ниво UA у серуму има утицаја на патогенетске механизме болести и њен настанак, или је низак ниво UA у серуму последица прогресије болести (188). С обзиром на ове чињенице, и у нашем истраживању процењиван је утицај UA на појаву болести. Резултати сугеришу да низак ниво UA у серуму повећава ризик за појаву болести и да се може размотрити као потенцијални „trait“ marker у MS.

## **5.2. CRP-маркер неуроинфламације у MS**

MS је хронична инфламаторна болест CNS коју карактерише имунски посредовано оштећење сиве и беле масе мозга (189). На анималном моделу MS је показано да се болест може индуковати код експерименталних животиња активно, имунизацијом или пасивно преносом лимфоцита имунизоване животиње у здраве сингене примаоце, или у виду Т ћелијских клонова специфичних за неки од енцефалитогених протеина CNS (190). Иако је неуроинфламација у MS динамичан процес који је присутан у свим стадијумима болести сматра се централним догађајем у њеним раним стадијумима. У раном току болести доминира релапсно ремитентни образац код кога је примећено да поред демиелинизације која настаје активацијом Т и В лимфоцита у CNS, значајну улогу има и лимфоцитна и моноклеарна периваскуларна инфилтрација и последично оштећење аксона (191). Опсервирано је да постоји корелација између релапса и периваскуларне инфламаторне

инфилтрације и појаве нових, активних плакова, што даље импликује да сваки нови инфламаторни догађај у CNS резултује акутним погоршањем болести. Segal је указао да је иницијални догађај у настанку релапса аутоимуни одговор на антигене протеина мијелина (192).

Инфламаторни процес у CNS се може верификовати анализом ликвора у ком се региструју интратекална синтеза Ig, као и повишене вредности одређених инфламаторних маркера у ликвору али и у серуму. CRP је протеин акутне фазе који се синтетише у хепатоцитима као одговор на синтезу проинфламаторних цитокина IL-6 и-IL-1 $\beta$  те се користи као маркер системске инфламације (193). У различитим аутоимуним стањима је примећена варијабилност нивоа CRP, па се на пример овим биомаркером верификује активност болести код реуматоидног артритиса (194). Такође је показано да је CRP користан инфламаторни маркер код неких кардиоваскуларних болести које се карактеришу хроничном инфламацијом у ендотелу и његовом последичном дисфункцијом (195). Како се показало да је CRP изузетно користан маркер периферне инфламације многи истраживачи су покушали да покажу да ли се овај параметар може користити у исте сврхе и код запаљенског процеса у CNS. Досадашња сазнања указују да запаљенски процес на периферији преко инфламаторних медијатора може индуковати и неуроинфламацију (196). CRP повећава пермеабилност BBB везивањем за Fc $\gamma$  рецептор што доводи до активације микроглије у мозгу (197, 198). Giovannoni и сарадници су показали да се CRP може користити као маркер релапса и неуроинфламаторног процеса у MS (84). Један од циљева ове студије је био да се утврди да ли се нивои серумског CRP разликују код MS испитаника у релапсу тј. акутном погоршању и MS испитаника који су у стабилној фази болести. Резултати нашег истраживања указују да испитаници у релапсу имају значајно више вредности CRP у серуму у поређењу са испитаницима у ремисији.



Овај резултат је конзистентан са резултатима Hanninen и сарадника који су показали да пацијенти током релапса тј. током актуелног неуроинфламаторног одговора имају значајно више вредности CRP у серуму него током ремисије (85). Са друге стране, морамо у обзир узети и чињеницу да су наши испитаници у релапсу били на терапији INF-beta 1a и да овај лек има антиинфламаторно дејство. Sadowska-Bartosz и сардници су показали да пацијенти који примају имуномодулаторну терапију имају значајно ниже нивое CRP у серуму у поређењу са пацијентима који нису на имуномодулацији (199). Такође смо опсервирани да се код пацијената у релапсу, 3 месеца након примене пулсне кортикостероидне терапије региструју значајно нижи нивои CRP у серуму што је такође у сагласности са сазнањем да CS терапија која се примењује у MS за лечење акутног релапса утиче на смањење интензитета неуроинфламације (200).

### **5.3. Замор и депресија у мултиплој склерози**

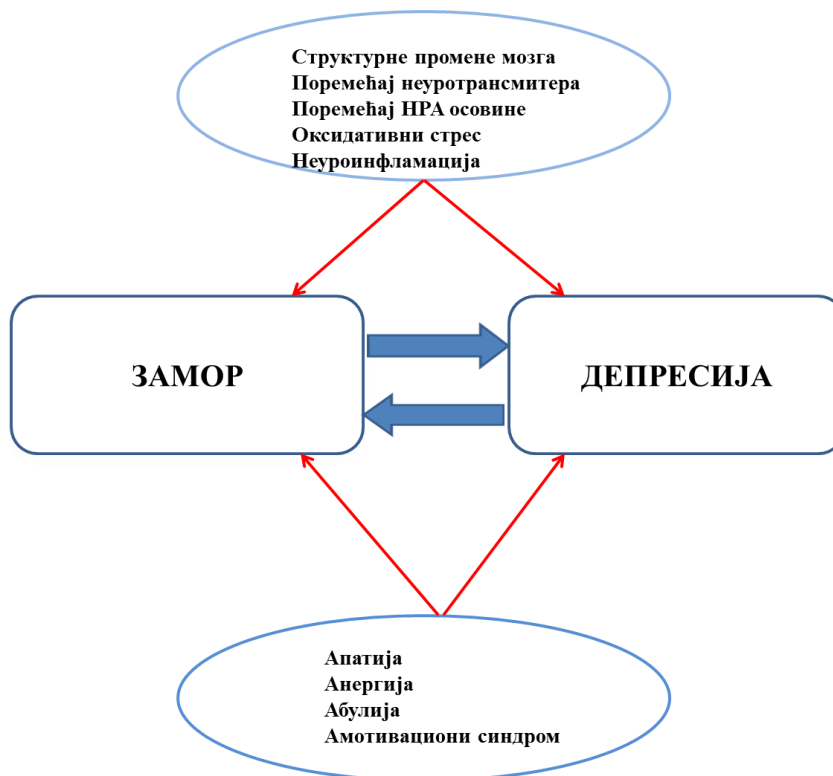
У клиничкој пракси замор је један од симптома на који се оболели од MS највише жале док је најчешћи поремећај расположења депресија. Досадашња истраживања су истакла да преваленца замора у MS износи између 53% и 80% а депресије до 50% (127, 136). Испитали смо њихову учесталост у нашој студијској популацији и дошли смо до података да је 61.2% испитаника потврдило постојање симптома замора, док је депресивна симптоматологија била присутна код 44.9% испитаника. Код MS групе у релапсу 66.7% је потврдило присуство осећаја замора док је депресивно расположење забележено код 43.7% испитаника. У MS групи у ремисији замор је регистрован код 56% а депресивно расположење код 24% испитаника. Наши резултати су показали да се код MS пацијената у релапсу и ремисији средње вредности FSS скорa и учесталост замора значајно не разликују. Могуће објашњење овог налаза можда лежи у чињеници да су пацијенти у

стабилној фази болести били на терапији IFN-beta 1a чије нежељено дејство може бити присуство осећаја замора (201). Даљим испитивањем смо установили да MS испитаници у акутном погоршању болести имају већи BDI скор и већу учесталост депресивне симптоматологије у поређењу са пацијентима у стабилној фази болести. Досадашња истраживања су показала да пацијенти у акутном погоршању имају већи степен неуролошке онеспособљености (202). Према бихејвиоралној теорији коју су 1985. године поставили Lewinsohn и сарадници, депресија код хроничних болести настаје само уколико болест значајно ремети физичко и психосоцијално функционисање оболелих (203). Испитали смо да ли се степен неуролошке онеспособљености разликује код пацијената у релапсу и ремисији и добијени резултат је показао да пацијенти у акутном погоршању болести имају већи EDSS скор од пацијената у стабилној фази болести. Бинарна логистичка регресија је показала да степен неуролошке онеспособљености значајно утиче на развој депресије али и на настанак замора код оболелих од MS. Повезаност између степена неуролошке онеспособљености, депресије и замора је до сада потврђена у многим студијама (204, 205, 206).

Наши резултати су такође показали да средња вредност FSS скорa има утицаја на развој депресије, али и да средња вредност скорa на BDI скали утиче на присуство осећаја замора. Вишегодишња истраживања су показала да је веза између замора и депресије у MS веома комплексна и бидирекциона. Сматра се да исти фактори могу утицати на настанак замора и депресије, а могуће је и да исти патогенетски механизми леже у њиховој основи. Ова два ентитета имају сличности и у клиничкој манифестацији.

## Фигура број 6

### Однос замора и депресије-патогенетски механизми и клиничке карактеристике



Досадашња сазнања упућују да су у основи замора и депресије код МС исти патогенетски механизми тј, структурне и функционалне промене које су карактеристика саме болести. Функционалне неуроимидинг студије су показале да атрофија мозга, посебно фронталног, паријеталног и темпоралног режња има утицаја на развој замора и депресије код МС (211, 212). Од значаја су и оштећење сиве масе мозга, активација одређених неуронских кругова, аксонално оштећење (58, 213). Поремећаји у неуротрансмитерским системима су такође проучавани као могући узрочници замора и депресије и досадашња истраживања су показала да од значаја за оба поремећаја могу бити допаминергичка, норадренергичка и ацетилхолинергичка дисрегулација (214, 215). Дисфункција осовине хипоталамус-

хипофиза-надбубрег и повећани нивои адренкортикотропног хормона и кортизола су регистровани код МС пацијената са замором и депресијом (216, 217). Поремећаји спавања су често присутни код оболелих од МС и често се доводе у везу са замором и депресијом (218, 219). Последњих година у фокусу истраживања су утицај неуроинфламације и оксидативног стреса на настанак замора и депресије. Утицај оба патогенетска механизма је потврђен у синдрому хроничног замора и код менталних поремећаја каква је велика депресија (135, 220).

Ова два ентитета такође карактерише и симиларност у клиничкој презентацији. Замор се може јавити самостално, може бити продромални симптом велике депресивне епизоде али и део већ развијене клиничке слике депресије (207). Замор се у најширем смислу дефинише као анергија која се може одразити на физичко, ментално или когнитивно функционисање. Физички замор је дефинисан као осећај телесне слабости који је удружен са смањеним физичким функционисањем. Емоционални и когнитивни замор се манифестују апатијом, абулијом, амотивационим синдромом (208, 209, 210). Наведени елементи су битне карактеристике и депресивног поремећаја расположења па је из ових разлога понекад у пракси веома тешко раздвојити да ли се ради само о замору или је присуство овог симптома клиничка манифестација депресивног поремећаја расположења.

#### 5.4. Утицај оксидативног стреса и неуроинфламације на замор и депресију

Наша студија је обухватила испитивање степена замора, депресије и неуролошке онеспособљености као параметра који има утицаја на испитивану психопатологију, код пацијената у релапсу и ремисији. Установили смо да већи степен неуролошке онеспособљености као и израженија депресивна симптоматологија постоје код пацијената у актуелном погоршању болести у поређењу са пацијентима који су у стабилној фази болести. Нисмо утврдили значајну разлику у тежини замора између ове две групе испитаника. Пацијенти у релапсу су 3 месеца након примене пуслне кортикостероидне терапије имали значајно нижи степен неуролошке онеспособљености (EDSS скор) и замора (FSS скор). Степен депресивне симптоматологије (BDI скор) је био нижи али без статистичке значајности. Ови налази су указали да би интензивнији степен неуроинфламације и оксидативног стреса у фази релапса могли имати утицаја на онеспособљеност, замор и депресију у МС.

Стога је један од истраживачких циљева био да се установи да ли постоји корелација између нивоа UA као маркера оксидативног стреса и CRP у серуму као неуроинфламаторног маркера са неуролошком онеспособљеношћу (EDSS скор), замором (FSS) и депресивном симптоматологијом (BDI скор).

Веза између нивоа UA у серуму и степена неуролошке онеспособљеност (EDSS скор) у неким студијама је потврђена, а у неким није (221). Наши налази нису потврдили постојање корелације између серумског нивоа UA и скор на EDSS скали. Моссиа и

сарадници сугеришу да се код пацијената који су ограничено покретни (EDSS скор  $\geq 5$ ) региструју нижи нивои UA у серуму у поређењу са пацијентима који су покретни без ограничења (EDSS  $\leq 4.5$ ) (188). Претпостављамо да у нашем случају ова корелација није опсервирана јер је већина наших пацијената имала EDSS скор  $\leq 4.5$ .

Досадашња истраживања су показала да у неким неуролошким болестима ниво UA корелира са замором (FSS скор) (222). У нашем случају није показана значајна корелиција између нивоа UA у серуму и укупног FSS скорa. Резултати показују да постоји статистички значајна негативна корелација серумског нивоа UA са поремећајем активности свакодневног живота. Kawase и сарадници су у својој студији указали да код пацијената са исхемијским можданим ударом на поремећај активности свакодневног живота утиче нижи ниво UA. Предложено је да би UA могла бити потенцијални предиктивни маркер поремећаја свакодневних животних активности (223). Могуће је да се исти приступ може применити и на пацијенте са MS.

У нашој студији није опсервирана значајна корелација између нивоа UA у серуму и укупног BDI скорa, али је регистрована значајна негативна корелација између нивоа UA у серуму и присуства осећаја туге. Слично нашим резултатима, Oliveira и сарадници у својој студији нису показали да постоји разлика у нивоу UA код MS пацијената са и без коморбидитета депресије (221). Досадашња истраживања су показала да смањење UA у серуму може да наруши антиоксидативни капацитет неурона (224). Данас је познато да је оксидативни стрес укључен у патогенетске механизме депресивних поремећаја (225) и да има значајну улогу у патофизиологији депресије (226,227). Неколико студија је указало на поремећај метаболизма пурина у депресији и смањење нивоа UA у серуму код ових пацијената (225, 228). Пурини, као што су аденозин и аденозин-три-фосфат играју кључну

улогу у неуротрансмисији и неуромодулацији (229). Повећана активност и смањен транспорт аденозина у CNS доводи до смањивања нивоа UA што последично узрокује депресивно понашање (230, 231). У недавној мета анализи Bartoli и сарадника је показано да пацијенти са депресивним поремећајем имају ниже нивое UA у серуму од здравих контролних субјеката као и да антидепресивна терапија има утицаја на повећање њеног нивоа и антиоксидативних капацитета неурона (224). Maes и сарадници сугеришу да су у генерализованом анксиозном поремећају нивои UA виши у поређењу са депресивним поремећајем. Запажено је да механизми оксидативног стреса узрокују пероксидацију липида, али да је оксидација протеина мање изражена него код депресије што повећава антиоксидативни капацитет мозга (232). Закључено је да повећани ниво UA представља компензаторни механизам у одговору на оксидативни стрес јер инхибише формирање пероксинитрита због чега је смањена оксидација протеина. Може се рећи да је виши ниво UA у серуму повезан са мањим ризиком од настанка депресије (233).

У овој студији опсервирана је позитивна корелација између нивоа CRP у сеуму и степена неуролошке онеспособљености (EDSS скор). Показана је и значајна корелација са скоро свим функционалним подсистемима на EDSS скали: визуелним, можданим стаблом, пирамидним, церебеларним, сензорним, сфинктерима, ходом. Ови налази су у сагласности са студијом Guzel-а и сарадника која је показала да пацијенти са вишим нивоом CRP у серуму имају и већи степен неуролошке онеспособљености (234). Неуроинфламација је један од кључних патогенетских механизма који доводи до аксоналног оштећења, прогресије болести и озбиљне неуролошке онеспособљености (202).

Узимајући у обзир чињенице да у основи MS лежи запаљенски процес у CNS, многи маркери неуроинфламације су испитивани и као могући узрочници замора. Серумски нивои проинфламаторних цитокина, као и замор, су повећани у MS, нарочито у фази релапса (235, 236). Претходна истраживања су показала да деловањем на одређене структуре у мозгу, проинфламаторни цитокини узрокују бихејвиоралне промене у понашању (237). Једна од предложених теорија је да, замор представља варијанту „инфламацијом индукованог болесног понашања“ које представља адаптивни механизам на инфекцију (238). Главни симптоми оваквог инфламацијом индукованог понашања су: замор, депресија, анхедонија, анорексија и повећана осетљивост на бол (239, 240). Weisdorf и сарадници су показали да егзогена администрација IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  изазива замор и поспаност код здравих појединаца (241). Flachenecker и сарадници су такође показали да оболели од MS са присутним осећајем замора имају већу експресију TNF- $\alpha$  mRNA у периферној крви (242). У овом истраживању смо као маркер неуроинфламације мерили вредности CRP у серуму и показали да постоји значајна корелација између серумског нивоа CRP и замора. Овај налаз је у складности са налазима Cho и сарадника који су истакли да ниво CRP има утицај на настанак замора (243).

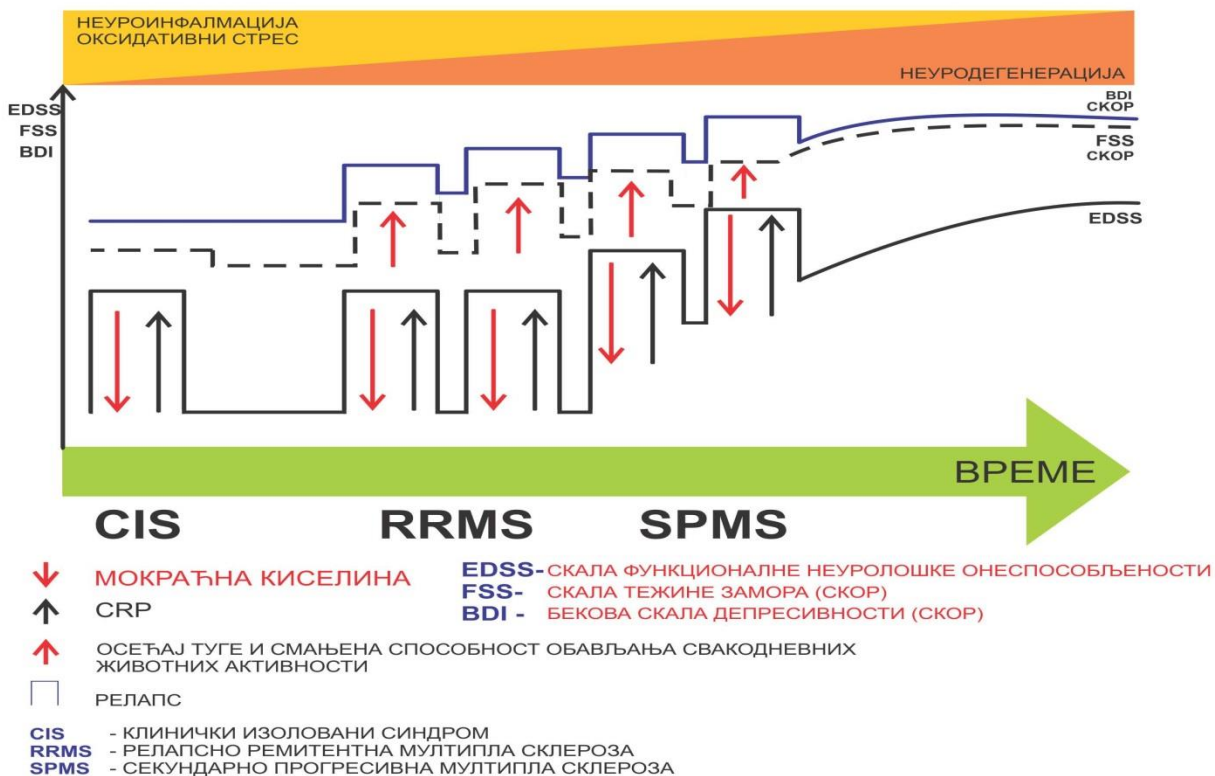
Последњих година све већи број истраживача истиче да неуроинфламација има значајну улогу и у патогенези депресивних поремећаја расположења (244, 245). Детекција повећаних нивоа проинфламаторних цитокина какви су IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  подржавају ову тезу (246, 247, 248). Такође је показано да проинфламаторни цитокини доводе до повећане продукције протеина акутне фазе запаљења као што су хаптоглобулин, церулоплазмин и CRP (249, 250). Један од циљева ове студије је био да се покаже да ли ниво CRP у серуму има утицаја на присуство депресивне симптоматологије. Показано је да постоји позитивна корелација између серумског нивоа CRP и укупног BDI



скора код MS пацијената. Наши резултати такође показују да је CRP сигнификантни предиктор BDI скора. Повећан ниво CRP доводи до промена у мозгу које се манифестују изменом у функционисању одређених неуронских кругова, базалних ганглија као и повећањем нивоа глутамата. Ове промене корелирају са анхедонијом (251, 252). Претходне клиничке студије су указале да ниво серумског CRP може бити од значаја у прогнози одговора на терапију антидепресивима (253). Наши резултати подржавају чињеницу да је IFN-beta 1a значајан предиктор BDI скора. Каррос и сарадници су показали да пацијенти који су на терапији овим препаратом имају мањи степен онеспособљености, мању стопу релапса и прогресије болести (254). На основу наших резултата и досадашњих научних сазнања може се рећи да својим антиинфламаторним механизмом дејства IFN-beta 1a смањује интензитет неуроинфламације, прогресију болести, степен неуролошке онеспособљености а самим тим и степен депресивне симптоматологије.

## Фигура број 7

### Утицај неуроинфламације и оксидативног стреса на неуролошку онеспособљеност, замор и депресивну симптоматологију код МС



У закључку, можемо рећи да хронична неуроинфламација и оксидативни стрес имају утицај на замор и депресију код MS испитаника. Ниже вредности UA у серуму могу преципитирати настанак осећаја туге и утицати на способност обављања свакодневних животних активности, а свако повећање серумског нивоа CRP током релапса, на овом терену може даље преципитирати настанак депресије. Због могућности да замор представља продромални симптом депресивног поремећаја расположења, веома је важна његова рана детекција и примена адекватних терапијских мера, могуће чак и антидепресива.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата и њихове интерпретације су изведени следећи закључци:

- 1) Код MS испитаника су установљене ниже вредности UA у серуму у односу на здраве.
- 2) У групи MS испитаника у релапсу су регистроване ниже серумске вредности UA у односу на MS групу у ремисији.
- 3) Испитаници са RRMS у фази ремисије и на имуномодулаторној терапији имају више нивое UA у односу на испитанике са CIS.
- 4) Није утврђена значајна разлика у нивоу UA у серуму између испитаника са CIS, RRMS и SPMS, иако су код SPMS забележене највише вредности UA у серуму.
- 5) У групи MS испитаника у релапсу су утврђени виши нивои UA у серуму 3 месеца након примене пулсне, кортикостероидне терапије у односу на нивое пре примене терапије.
- 6) Ниво серумског CRP је значајно виши у групи MS испитаника који су у релапсу у односу на испитанике у ремисији.
- 7) Код MS испитаника у релапсу су 3 месеца након примене пулсне, кортикостероидне терапије забележене ниже вредности CRP у серуму у односу на нивое у акутном погоршању и пре примене терапије.
- 8) Степен неуролошке онеспособљености и депресивне симптоматологије је већи код MS испитаника у релапсу у односу на испитанике у ремисији, али не и степен замора.

- 9) Код испитаника у релапсу је 3 месеца након примене пулсне, кортикостероидне терапије установљен мањи степен неуролошке онеспособљености и замора у поређењу са налазом пре терапије. Степен депресивне симптоматологије се не разликује значајно пре и након примене терапије.
- 10) Степен неуролошке онеспособљености значајно утиче на појаву замора и депресије и може бити значајан предиктор FSS скорa као и BDI скорa код оболелих од MS.
- 11) Није утврђена корелација између серумског нивоa UA и степена неуролошке онеспособљености. Утврђена је негативна корелација између нивоa UA у серуму и ајтема на FSS скали који се односи на смањену способност обављања свакодневних животних активности. Утврђена је негативна корелација између серумског нивоa UA и ајтема на BDI скали који означава присуство осећаја туге.
- 12) Ниво CRP у серуму позитивно корелира са степеном неуролошке онеспособљености, степеном замора и степеном депресивне симптоматологије.
- 13) Ниво CRP у серуму и имуномодулаторна терапија су значајни предиктори вредности укупног BDI скорa код MS испитаника.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Pearce JM. Historical descriptions of multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2005; 54(1): 49-53.
2. Mc Donald WI. The history of multiple sclerosis. In: *Handbook of multiple sclerosis*. Cook SD. John Wiley and Sons, Ney York, 2001; 1-15.
3. Fred L. History of modern multiple sclerosis therapz. *J Neurol* 2005; 252: III/3-III9.
4. Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2008; 71: 129-135.
5. Douglas I, Kesselring J, Rompani P, Singhal BS, Thompson A. Multiple sclerosis. In: *Neurological disorders: a public health approach*. Xth ed. Geneva: World Health Organization, 2006; 85-94.
6. Ascherio A, Munger K. Enviromental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol* 2007; 61: 288-291.
7. Koch-Henriksen N, Hyllested K. Epidemiology of multiple sclerosis: incidence and prevalence rates in Denmark 1948-64 based on the Danish Multiple Sclerosis Registry. *Acta Neurol Scand* 1988; 78: 369-380.
8. Koch-Henriksen N. The Danish Multiple Sclerosis Registry: a 50-year follow up. *Mult Scler* 1999; 5: 293-296.
9. Mayr WT, Pittock SJ, McClelland RL, Jorgensen NW, Noseworthy JH, Rodrigez M. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Olmsted County, Minnesota, 1985-2000. *Neurology* 2003; 61: 1373-1377.
10. Toncev G, Miletic-Drakulic S, Knezevic Z, Boskovic-Matic T, Gavrilovic A, Toncev S, Drulovic J, Pekmezovic T. Prevalence of multiple sclerosis in the Serbian district Šumadija. *Neuroepidemiology* 2011; 37(2): 102-106.
11. Gavric-Kezic M, Rakic D, Pekmezovic T, Drulovic J. Prevalence of multiple sclerosis in the Zlatibor district, Serbia. *Mult Scler* 2007; 13(2): 102.
12. Hernan MA, Olek MJ, Ascherio A. Geographic variation of MS incidence in two prospective studies of US women. *Neurology* 1999; 53: 1711-1718.
13. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC. Canadian Collaborative Study Group. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 2006; 5: 932-936.
14. Sadovnick AD. Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmunity Rev* 2012; 11: 163-166.

15. Kakalacheva K, Lunemann JD. Environmental triggers of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011; 585: 3724-3729.
16. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; 3 (92): 104—110.
17. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12877-12882.
18. Dwish E, Guimond CG, Sadovnick AD. Reproductive counselling for multiple sclerosis: rationale. *Int MS J* 2003; 10: 52-59.
19. Pravica V. Genetika multiple skleroze. U: *Multipla skleroza*. Beograd: Medicinski fakultet, 2013:21-31.
20. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, et al. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2013;45:1353-60.
21. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CG, et al. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; 476: 214-219.
22. Gilden DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005; 4: 195-202.
23. Munz C, Lunemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 246-258.
24. Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Hrelso K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Fugger L. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2002; 3: 940-943.
25. Ufret-Vincenty RL, Quigley L, Tresser N, Pak SH, Gado A, Hausmann S, Wucherpfennig KW, Brocke S. In vivo survival of viral antigen-specific T cells that induce experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 1998; 188: 1725-1738.
26. Thavker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 2006; 59: 499-503.
27. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015; 14(3): 263-273.

28. Lucas RM, Hughes AM, Lay ML, Ponsonby AL, Dwyer DE, Taylor B, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82: 1142-1148.
29. Kurtzke JF: MS epidemiology worl wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand* 1995; 161: 23-33.
30. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 2010; 9: 727-739.
31. Ascherio A, Munger K, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010; 9: 599-612.
32. Riise T, Nordtvet MW, Ascherio A. Smoking as a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology* 2003; 61: 1122-1124.
33. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Smoking and multiple sclerosis: an update meta-analysis. *Plos One* 2011; 6(1): e16149.
34. Di Pauli F, Reindl M, Ehling R, Schautzer F, Gneiss C, Lutterotti A, et al. Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14: 1026-1030.
35. Healy BC, Ali E, Guttmann CRG, Chitnis T, Glanz BI, Buckle G, et al. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66: 858-864.
36. Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Hashmi K, Abdelrahman N, Stosic M, Dwyer M, et al. Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology* 2009; 73: 504-510.
37. Hernan MA, Olek MJ, Ascherio A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 2003; 61: 1122-1124.
38. Steinman L. A rush to judgment on Th17. *J Exp Med* 2008; 205: 1517-1522.
39. Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008; 255: 2-6.
40. Fransson ME, Liljenfeldt LS, Fagius J, Totterman TH, Loskog AS. The T-cell pool is anergized in patients with multiple sclerosis in remission. *Immunology* 2009; 126: 92-101.
41. Ratts RB, Karandikar NJ, Hussain RY, Choy J, Northrop SC, Lovett-Racke AE, Racke MK. Phenotypic characterization of autoreactive T cell in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006; 178: 100-110.
42. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 569-581.

43. Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2702-2720.
44. Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* 2010; 120: 1368-1379.
45. Losy J. Is MS an inflammatory or primary degenerative disease? *J Neural Transm* 2013; 120: 1459-1462.
46. Gimenez MA, Sim JE, Russell JH. TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *J Neuroimmunol* 2004; 151: 116-125.
47. Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature*. 1990; 346: 183–187.
48. Sun JB, Olsson T, Wang WZ, Xiao BG, Kostulas V, Fredrikson S, Ekre HP, Link H. Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur J Immunol*. 1991; 21: 1461–1468.
49. Mostarica Stojković M. Imunopatogeneza multiple skleroze. U: *Multipla skleroza*. Beograd: Medicinski fakultet, 2013:49-73.
50. Grigoriadis N, van Pesch V; ParadigMS Group. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol* 2015; 2: 3-13.
51. Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. TGF-beta as a promising option in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology* 2009; 56(6-7): 929-36.
52. Zhang Z, Wang L, Sun X, Zhang L, Lu L. Association of IL4 and IL4R polymorphisms with multiple sclerosis susceptibility in Caucasian population: A meta-analysis. *J Neurol Sci* 2016; 363: 107-13.
53. Increased IL-13 but not IL-5 production by CD4-positive T cells and CD8-positive T cells in multiple sclerosis during relapse phase. *J Neurol Sci*. 2002; 201(1-2): 45-51.
54. Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011; 585: 3758-3763.
55. Zamvill SS, Steinman I, The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 579-621.
56. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. 2002; 125(10): 2202-2212.



57. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998; 338(5): 278-85.
58. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnautelis R, Tartaglia MC, Antel JP, Matthews PM, Arnold DL. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol.* 2001; 58(1): 65-70.
59. Colombo M, Dono M, Gazzola P, Roncella S, Valetto A, Chiorazzi N, Mancardi GL, Ferrarini M. Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Immunol.* 2000; 64(5): 2782-2789.
60. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, Calabresi PA, Waubant E, Hauser SL, Zhang J, Smith CH. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol.* 2010; 67(4): 452-61.
61. Lisak RP1, Benjamins JA, Nedelkoska L, Barger JL, Ragheb S, Fan B, Ouamara N, Johnson TA, Rajasekharan S, Bar-Or A. Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J Neuroimmunol.* 2012; 246(1-2): 85-95.
62. Uccelli A, Aloisi F, Pistoia V. Unveiling the enigma of the CNS as a B-cell fostering environment. *Trends Immunol.* 2005; 26(5): 254-9.
63. Mossakowski AA, Pohlan J, Bremer D, et al. Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation. *Acta Neuropathologica.* 2015; 130(6): 799–814.
64. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling.* 2007; 19(9): 1807–1819.
65. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* 3<sup>rd</sup> Edition, Oxford University Press: Oxford 1998.
66. Bongarzone ER, Pasquini JM, Soto EF. Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species. *J Neurosci Res* 1995; 41: 213-221.
67. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 87-94.
68. Lundberg JM. Pharmacology of neurotransmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects of amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* 1996; 48: 113-178.
69. Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Kamp TJ, Kallen RG, Hofman F, Flockerzi V, Marban E. Functional consequences of sulfhydryl modification in the pore-forming subunits of cardiovascular Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels.

70. Shrager P, Custer AW, Kazarinova K, Rasband MN, Mattson D. Nerve conduction block by nitric oxide that is mediated by axonal environment. *J Neurophysiol* 1998; 79: 529-536.
71. Blough NV, Zafiriou OC. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg Chem* 1985; 24: 3502-3504.
72. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268: 699-722.
73. Salgo MG, Stone K, Squadrito GL, Battista JR, Pryor WA. Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 1025-1030.
74. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman B. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481-487.
75. Petit PX, Susin SA, Zamzani N, Mignote B, Kroemer G. Mitochondria and programmed cell death. *FEBS Lett* 1996; 396: 7-13.
76. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 309-316.
77. Scarlet JL, Packer MA, Porteous CM, Murphy MP. Alterations to glutathione and nicotinamide nucleotides during the mitochondrial permeability transition induced by peroxynitrite. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 1047-1055.
78. Bonfocoe E, Krained D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insult with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/ superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7162-7166.
79. Moore GR: Current concepts in the neuropathology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 2010; 2: 5-15.
80. Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon gamma. *J Neurosci Res* 2004; 7 (4): 540-551.
81. Solleiro-Villavicencio H and Rivas-Arancibia S. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+T cells in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 114. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00114>.
82. Park S, Kim M, Paik JK, Jang YJ, Lee SH, Lee JH. Oxidative stress is associated with C-reactive protein in non-diabetic postmenopausal women, independent of obesity and insulin resistance. *Clin Endocrinol* 2013; 79(1): 65-70.

83. Lindqvist D, Hall S, Surova Y, Nielsen HM, Janelidze S, Brundin L, Hansson O. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease-Associations with depression, fatigue and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2013; 33: 183-189.
84. Giovannoni G, Miller DH, Losseff NA, Sailer M, Lewellyn-Smith N, Thompson AJ, Thompson EJ. Serum inflammatory markers and clinical/MRI markers of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 2011; 248(6): 487-495.
85. Soilu-Hänninen M, Koskinen JO, Laksonen M, Hänninen A, Lilius EM, Waris M. High sensitivity measurement of CRP and disease progression in multiple sclerosis. *Neurology* 2005; 65(1): 153-155.
86. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol* 2012; 7: 185-217.
87. Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis *Nat Med* 2011; 17: 495-499.
88. Kipp M, Van der Valk P, Amor S. Pathology of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012; 11: 506-517.
89. Hauser SL. Multiple lessons for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; 359: 1838-1841.
90. Pascual AM, Martinez-Bisbal MC, Bosca I. Axonal loss is progressive and partly dissociated from lesion load in early multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 69: 63-67.
91. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707-717.
92. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 2007; 17: 210-218.
93. Filippi M, Rocca MA, Arnold DL, Bakshi R, Barkhof F, DeStefano N, et al. EFNS guidelines on the use of neuroimaging in the management of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2006; 13: 313-325.
94. Smith KJ, McDonald WI. The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354:1649-1673.
95. Miller DH, Thompson AJ, Filippi M. Magnetic resonance studies of abnormalities in the normal appearing white matter and grey matter in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; 250: 1407-1419.

96. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P: Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*.1988; 78: 6858-6862.
97. Beal MF: Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol*.2005; 58: 495-505.
98. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H: Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*.1998; 95(2): 675-80.
99. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biol Med* 1993; 14: 615-631.
100. Wu X, Lee CC, Muzny DM, Caskey. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominid evolution. *J Mol Evol* 1992; 34: 78-84.
101. Dujmovic I, Pekmezovic T, Obrenovic R, Nikolić A, Spasic M, Mostarica Stojkovic M, Drulovic J. Cerebrospinal fluid and serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47(7): 848-853.
102. Wang L, Hu W, Wang J, Qian W, Xiao H. Low serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optical: An updated meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 2016; 9: 17-22.
103. Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol*. 2002; 9(3): 221-226.
104. Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G.High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis increases serum uric acid levels. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40(5): 505-508.
105. Hawkins SA, McDonnell GV. Benign multiple sclerosis? Clinical course, long term follow up and assessment of prognostic factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 148-152.
106. Clark VA, Detels R, Visscher BR, Valdiviezo NL, Malmgren RM, Dudley JP. Factors associated with a malignant or benign course of multiple sclerosis *JAMA* 1982; 248: 856-860.
107. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; 46: 907-911.

108. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hrtung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the „McDonald Criteria“. *Ann Neurol* 2005; 58: 840-846.
109. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002; 359: 1221-1231.
110. Patyol U, Pocklington RP. Course of multiple sclerosis. First results of a prospective study carried out of 102 MS patients from 1976-1980. *Acta Neurol Scand* 1982; 65: 248-266.
111. Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. The natural history of secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 1039-1043.
112. Rice CM, Cottrell D, Wilkins A, Scolding NJ. Primary progressive multiple sclerosis: progress and challenges. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84: 1100-1106.
113. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol* 2012;11:157-69.
114. D'Alessandro R, Vignatelli L, Lugaesi A, Baldin E, Granella F, Tola MR. Risk of multiple sclerosis following clinically isolated syndrome: a 4-year prospective study. *J Neurol* 2013; 260: 1583-1593.
115. Brownlee WJ, Miller DH. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 2014; 21: 2065-2071.
116. McAlpine D. Symptoms and signs, In: *A Reappraisal*. Baltimore: Williams and Wilkins 1972; 132-196.
117. Arnold AC. Evolving management of optic neuritis and multiple sclerosis. *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 101-108.
118. Rae-Grant AD, Eckert NJ, Bartz S, Reed JF: Sensory symptoms of multiple sclerosis: a hidden reservoir of morbidity. *Mult Scler* 1999; 5: 179-183.
119. Miller AE, Lublin FD, Coyle PK. *Multiple sclerosis in clinical practice*. London: Martin Dunitz, 2003: 103-129.
120. Swingler RJ, Compston DAS. The clinical features of multiple sclerosis in south east Wales. *Q J Med* 1992; 83: 325-337.
121. DasGupta R, Fowler CJ. Bladder, bowel and sexual dysfunction in multiple sclerosis. *Drugs* 2003; 63: 153-166.
122. Rao SM, Leo GJ, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: IR, frequency, patterns and prediction. *Neurology* 1991; 41: 685-691.

123. Clark CM, Fleming JA, Li D, Oger J, Klonoff H, Paty D. Sleep disturbance, depression and lesion site in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1992; 49: 641-643.
124. Sokic DV, Stojavljevic N, Drulovic J, Dujmovic I, Mesaros S, Ercegovac M, et al. Seizures in multiple sclerosis. *Epilepsia* 2001; 42: 72-79.
125. Shapiro RT. Symptom management in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg* 2001; 1994; 36:123-129.
126. Murphy R, O'Donoghue S, Counihan T, McDonald C, Calabresi PA, Ahmed MA, Kaplin A, Hallahan B. Neuropsychiatric syndromes of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017; 88(8): 697-708.
127. Schwid SR, Covington M, Segal BM, Goodman AD. Fatigue in multiple sclerosis: current understanding and future directions. *J Rehabil Res Dev* 2002; 39(2): 211-24.
128. DeLuca J. Fatigue: its definition, its study, and its future. In *Fatigue as a window to the brain*. Edited by DeLuca J. Cambridge, MA: The MIT Press 2005.
129. Guidelines, Multiple Sclerosis Clinical Practice. Fatigue and multiple sclerosis: evidence-based management strategies for fatigue in multiple sclerosis. Washington, DC: Paralyzed Veterans of America. 1998.
130. Krupp LB. The most common complaints: fatigue. Philadelphia: Butterworth Heinemann-Elsevier Science; 2003.
131. Mills RJ, Young CA. A medical definition of fatigue in multiple sclerosis. *QJM* 2008; 101: 49-60.
132. Drulovic J. Multipla skleroza. *Acta Clinica, Klinički Centar Srbije* 2011: 67.
133. Van Kessel K, Moss-Morris R. Understanding multiple sclerosis fatigue: a synthesis of biological and psychological factors. *Journal of Psychosomatic Research* 2006; 5(61): 583-585.
134. Kos D, Kerckhofs E, Nagels G, D'hooghe MB, Ilsbrouckx S. Origin of fatigue in multiple sclerosis: review of the literature. *Neurorehabil and Neural Repair* 2008; 1 (22): 91-100.
135. Gerwyn Morris and Michael Maes . Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and encephalomyelitis disseminate/multiple sclerosis show remarkable levels of similarity in phenomenology and neuroimmune characteristics. *BMC Med* 2013; 11: 205. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-205>.
136. Wood B, Van der Mei IA, Ponsoby AL, Pittas F, Quinn S, Dwyer T, Lucas RM, Taylor BV. Prevalence and concurrence of anxiety, depression and fatigue over time in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19(2): 217-224.

137. Wen S, Cheng M, Wang H, Yue J, Wang H, Li G, Zheng L, Zhong Z, Peng F. Serum uric acid levels and the clinical characteristics of depression. *Clin Biochem* 2012; 45(1–2): 49-53.
138. Kallaur AP, Lopes J, Oliveira SR, Simão AN, Reiche EM, de Almeida ER, Morimoto HK, de Pereira WL, Alfieri DF, Borelli SD, Kaimen-Maciel DR, Maes M. Immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress biomarkers of depression symptoms in subjects with multiple sclerosis: Increased peripheral inflammation but less acute neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 2016; 53(8): 5191-5202.
139. Brenner P, Granqvist M, Königsson J, Al Nimer F, Piehl F, Jokinen J. Depression and fatigue in multiple sclerosis: Relation to exposure to violence and cerebrospinal fluid immunomarkers. *Psychoneuroendocrinology* 2018; 89: 53-58.
140. Patten SB, Metz LM, Reimer MA. Biopsychosocial correlates of lifetime major depression in a multiple sclerosis population. *Mult Scler* 2000; 6: 115–20.
141. Feinstein A. Multiple sclerosis and depression. *Mult Scler* 2011; 17: 1276-181.
142. Sa MJ. Psychological aspects of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2008; 110: 868–77.
143. Cetin K, Johnson KL, Ehde DM, Kuehn CM, Amtmann D, Kraft GH. Antidepressant use in multiple sclerosis: epidemiologic study of a large community sample. *Mult Scler* 2007; 13: 1046–1053.
144. Olsen LR, Jensen DV, Noerholm V, Martiny K, Bech P. The internal and external validity of the Major Depression Inventory in measuring severity of depressive states. *Psychological medicine*.2002; 33(2): 351-356.
145. Figved N, Klevan G, Myhr KM, Glad S, Nyland H, Larsen JP, Harboe E, Omdal R, Aarsland D. Neuropsychiatric symptoms in patient with multiple sclerosis. *Acta Psychiatr Scand* 2015; 112(6): 463-468.
146. Fox RJ, Kinkel RP. High dose methylprednisolon in the treatment of multiple sclerosis. In: Cohen JA, Rudick RA,eds. *Multiple sclerosis therapeutics*, London: Informa Helthcare, 3rd Edition, 2007; 515-533.
147. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG). Basic and escalating immunomodulatory treatments in multiple sclerosis: Current therapeutic recommendations. *J Neurol* 2008; 255: 1449-1463.
148. Sellebjerg F, Barnes D, Filippi G, Midgard R, Montalban X, Rieckmann P, et al. EFNS guidelines on treatment of multiple sclerosis relapses: report of an EFNS task force on treatment of multiple sclerosis relapses. *Eur J Neurol* 2005; 12: 939-946.

149. Cohen JA. The future of multiple sclerosis treatment. *J Neurol Sci* 2009; 277: 55-61.
150. Rieckmann P. Concepts of induction and escalation therapy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009; 277: 42-45.
151. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010; 74: 17-24.
152. Noseworthy J, Miller D, Compston A. Disease modifying treatments in multiple sclerosis. In: Compston A et al, eds. *McAlpine's Multiple sclerosis* 4th ed. Churchill Livingstone Elsevier 2006; 729-892.
153. Rio J, Nos C, Bonaventura I, Arraño R, Genis D, Sureda B, et al. Corticosteroids, ibuprofen and acetaminophen for IFN-beta 1a flu symptoms in MS: randomized trial. *Neurology* 2004; 63: 525-528.
154. Francis GS, Grumser Y, Alteri E, Micaleff A, O'Brien F, Alsop J, et al. Hepatic reactions during treatment of multiple sclerosis with interferon-beta 1a: incidence and clinical significance. *Drug Saf* 2003; 26: 815-827.
155. Kieseier BC, Wiendl H, Leussink VI, Stuve O. Immunomodulatory treatment strategies in multiple sclerosis. *J Neurol* 2008; 255: 15-21.
156. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69(2): 292-302.
157. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121-127.
158. Filippi M, Rocca MA, Arnold DL, Bakshi R, Barkhof F, DeStefano N, et al. EFNS guidelines on the use of neuroimaging in the management of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2006; 13: 313-325.
159. Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, Schmidt R, Niederkorn K, Horne S, et al. Criteria for an increased specificity of MRI interpretation in elderly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 1988; 38: 1822-1825.
160. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Choe JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* 2008; 14: 1157-1174.



161. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhoff F, Filippi M, et al. MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome: a multicenter retrospective study. *Lancet Neurol* 2007; 6: 677-686.
162. Rovira A, Swanton J, Tintore M, Huerga E, Barkhof F, Filippi M, et al. A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 5: 287-292.
163. McLean BN, Luxton RW, Thompson EJ. A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-index. *Brain* 1990; 113: 1269-1289.
164. Walsh MJ, Tourtellotte WW. Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA and IgM in multiple sclerosis. *J Exp Med* 1986; 106: 809-816.
165. Moulin D, Paty DW, Ebres GC. The predictive value of CSF electrophoresis in possible MS. *Brain* 1983; 106: 809-816.
166. Franciotta D, Columba-Cabezas S, Andreoni L, Raavaglia S, Jarius S, Romagnolo S, et al. IgG band patterns in inflammatory demyelinating human and mouse diseases. *J Neuroimmunol* 2008; 200: 125-128.
167. Fischer C, Andre-Obadia N, Mauguiere F. Diagnostic criteria of multiple sclerosis: electrophysiological criteria. *Rev Neurol* 2001; 157: 974-980.
168. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11): 1444-1452.
169. Krupp LB, La Rocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD. The fatigue severity scales. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol* 1989; 46(10): 1121-1123.
170. Minden SL, Feinstein A, Kalb RC, Miller D, Mohr DC, Patten SB, Bever C Jr, Schiffer RB, Gronseth GS, Narayanaswami P. Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. Evidence-based guideline: assessment and management of psychiatric disorders in individuals with MS: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2014; 82(2): 174-181.
171. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 247-269.
172. Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N. Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendroglialopathy. *Clin Rev Allergy Immunol* 2021; 42: 26-34.

173. Gonsette R. E. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008; 274(1-2): 48–53.
174. Miller E., Walczak A., Saluk J., Ponczek M. B., Majsterek I. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical Biochemistry*. 2012; 45(1-2): 26–30.
175. Vallance P, Moncada S. Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horizons* 1993; 41: 77-87.
176. Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. Antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009; 31(1): 13–29.
177. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol*. 2004; 251(3): 261–268.
178. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*. 1993; 84(4): 407–412.
179. Becker BF, Kastenbauer S, Kodel U, Kiesl D, Pfister HW: Urate oxidation in CSF and blood of patients with inflammatory disorders of nervous system. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004; 23: 1201-1204.
180. Koch M, De Kezser J. Uric acid in multiple sclerosis. *Neurol Res* 2006; 28: 316-319.
181. Sotgin S, Pugliatti M, Sanna A et al. Serum uric acid and multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2002; 23:183-188.
182. Moccia M, Picillo M, Erro R et al. Is serum uric acid related to non-motor symptoms in de-novo Parkinson's disease patients? *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20:772-775.
183. Zand D, Weng Z, Liu H et al. Serum uric acid levels in patients with myasthenia gravis are inverse correlated with disability. *Neuroreport* 2016; 27 (5): 301-305.
184. Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G (2002). Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol* 2002; 9(3): 221-226.
185. Tanaka K, Ogata S, Tanaka H, Omura K, Honda C; Osaka Twin Research Group, Hayakawa K (2015) The relationship between body mass index and uric acid: a study on Japanese adult twins. *Environ Health Prev Med* 2015; 20(5): 347-353.

186. Guerrero A.L, Martin-Polo J, Laherran E, Gutierrez F, Iglisias F, Tejero M.A, Rodriguez-Gallego M, and Alcazar C. (2008) Variation of serum uric acid levels in multiple sclerosis during relapses and immunomodulatory treatment. *Eur J Neurol* 15 (4): 394-397.
187. Zoccolella S, Tortorella C, Iaffaldano P, Direnzo V, D'Onghia M, Luciannatelli E, Paolicelli D, Livrea P, Trojano M. Low serum urate levels are associated to female gender in multiple sclerosis patients. *Plos One* 2012; 7(7): e40608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040608>.
188. Moccia M ,Lanzillo R, Palladino R, Russo C, Carotenuto A, Massarelli M, Vacca G, Vacchiano V, Nardone A, Triassi M, Morra VB. Uric acid: a potential biomarker of multiple sclerosis and of its disability. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53 (5): 753-759.
189. Filippi M, Rocca M. A, Barkhof F, et al. Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2012; 11(4): 349–360.
190. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 2011; 164: 1079-1106.
191. Frischer J. M., Bramow S., Dal-Bianco A., et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 2009; 132(5): 1175–1189.
192. Segal BM. Stage-specific immune dysregulation in multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res*. 2014; 34(8): 633-640.
193. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983; 34: 141–212.
194. Poole CD, Conway P, Reynolds A, Currie CJ. The association between C-reactive protein and the likelihood of progression to joint replacement in people with rheumatoid arthritis: a retrospective observational study. *BMC Musculoskelet Disord* 2008; 9: 146.
195. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336: 973–979.
196. Anthony DC, Couch Y, Losey P, Evans MC. The systemic response to brain injury and disease. *Brain Behav Immun* 2012; 26: 534–540.
197. Kuhlmann CR, Librizzi L, Closhen D, Pflanzner T, Lessmann V, Pietrzik CU, de Curtis M, Luhmann HJ. Mechanisms of C-reactive protein-induced blood-brain barrier disruption. *Stroke*. 2009; 40(4): 1458-1466.

198. Hsueh H, Kastin AJ, Pan W. Blood-Borne Metabolic Factors in Obesity Exacerbate Injury-Induced Gliosis. *J Mol Neurosci*. 2012; 47: 267–27.
199. Sadowska-Bartosz I, Adamczyk-Sowa M, Galiniak S, Mucha S, Pierzchala K, Bartosz G. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. *Neurochemistry International*. 2013; 63(5): 507–516.
200. Schweingruber N, Fischer HJ, Fischer L, van den Brandt J, Karabinskaya A, Labi V, Villunger A, Kretschmar B, Huppke P, Simons M, Tuckermann JP, Flügel A, Lühder F, Reichardt HM. Chemokine-mediated redirection of T cells constitutes a critical mechanism of glucocorticoid therapy in autoimmune CNS responses. *Acta Neuropathol*. 2014; 127(5): 713-29.
201. Walther EU, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management. *Neurology* 1999; 53(8): 1622-1627.
202. Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, Miszkiel KA, Thompson AJ, Plant GT et al. Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77 (2006): 830-833.
203. Lewinsohn PM, Hoberman HM, Teri L, Hautzinger M. An integrative theory of depression. In S. Reiss and R.R. Bootzin (Eds.), *Theoretical issues in behavior therapy* 1985: 331-359.
204. Türkbay TG, Yıldırım Y, Özakbaş S. Multiple sklerozlu hastalarda yorgunluk ve yorgunluğun etkisinin değerlendirilmesi. *Arch Neuropsychiatr* 2004; 10:515–520.
205. Flachenecker P, Kumpfel T, Kallmann B, Gottschalk M, Grauer O, Rieckmann P, Trenkwalder C, Toyka KV. Fatigue in multiple sclerosis: a comparison of different rating scales and correlation to clinical parameters. *Mult Scler* 2002; 8: 523–526.
206. Solaro C, Trabucco E, Signori A, Martinelli V, Radaelli M, Centonze D, Rossi S, Grasso MG, Clemenzi A, Bonavita S, D'Ambrosio A, Patti F, D'Amico E, Cruccu G, Truini A. Depressive Symptoms Correlate with Disability and Disease Course in Multiple Sclerosis Patients: An Italian Multi-Center Study Using the Beck Depression Inventory. *PLoS One* 2016; 11(9): e0160261. doi: 10.1371/journal.pone.0160261.
207. Addington AM, Gallo JJ, Ford DE, Eaton WW. Epidemiology of unexplained fatigue and major depression in the community: the Baltimore ECA follow-up, 1981–1994. *Psychol Med* 2001; 31:1037–1044.
208. Ferentinos P, Kontaxakis V, Havaki-Kontaxaki B, Paparrigopoulos T, Dikeos D, Ktonas P, et al. Sleep disturbances in relation to fatigue in major depression. *J Psychosom Res*. 2009; 66: 37–42.

209. Burschka JM, Keune PM, Oy UH, Oschmann P, Kuhn P. Mindfulness-based interventions in multiple sclerosis: beneficial effects of Tai Chi on balance, coordination, fatigue and depression. *BMC Neurol.* 2014; 14:165.
210. Fava M. Symptoms of fatigue and cognitive/executive dysfunction in major depressive disorder before and after antidepressant treatment. *J Clin Psychiatry* 2003; 6(14): 30–34.
211. Yaldizli O, Glassl S, Sturm D et al. Fatigue and progression of corpus callosum atrophy in multiple sclerosis. *J Neurol* 2011; 2011: 2199-205.
212. Colasanti A, Guo Q, Giannetti P, Wall MB, Newbould RD, Bishop C, Onega M, Nicholas R, Ciccarelli O, Muraro PA, Malik O, Owen DR, Zoung AH, Gunn RN, Piccini P, Matthews PM, Rabiner EA. Hippocampal neuroinflammation, functional connectivity and depressive symptoms in multiple sclerosis. *Biol Psychiatry* 2016; 80(1): 62-72.
213. Leocani L, Colombo B, Magnani G et al. Fatigue in multiple sclerosis is associated with abnormal cortical activation to voluntary movement-EEG evidence. *Neuroimage* 2001; 13: 1186-92.
214. Stahl SM. The psychopharmacology of energy and fatigue. *J Clin Psychiatry* 2002; 63: 7–8.
215. Soliman A, Udemgba C, Fan I, Xu X, Miler L, Rusjan P, Houle S, Wilson AA, Pruessner J, Ou XM, Meyer JH. Convergent effects of acute stress and glucocorticoid exposure upon MAO-A in humans. *J Neurosci* 2012; 32(48): 17120–17127.
216. Holsen LM, Lancaster K, Klibanski A, Whitfield-Gabrieli S, Cherkerzian S, Buka S, et al. HPA-axis hormone modulation of stress response circuitry activity in women with remitted major depression. *Neuroscience* 2013; 250: 732–742.
217. Maes M, Mihalyova I, De Ruyter M. Decreased dehydroepiandrosterone sulphate but normal insulin like growth factor in chronic fatigue syndrome: relevance for the inflammatory response in CFS. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26: 487-92.
218. Attarian HP, Brown KM, Duntley SP, Carter JD, Cross AH. The relationship of sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2004; 61: 525-528.
219. Krystal AD. Psychiatric disorders and sleep. *Neurol Clin* 2012; 30(4): 1389-1413.
220. Anderson G, Berk M, Dean O, Moylan S, Maes M. Role of immune inflammatory and oxidative and nitrosative stress pathways in the etiology of depression: therapeutic implications. *CND Drugs* 2014; 28(1): 1-10.
221. Oliveira SR, Kallaur AP, Lopes J, Colado Simão AN, Reiche EM, de Almeida ERD, Morimoto HK, de Carvalho Jennings de Pereira WL, Alfieri DF, Flauzino T, de Meleck Proença C, Gomes AM, Kaimen-Maciel DR, Maes M. Insulin resistance, athero-

- genicity, and iron metabolism in multiple sclerosis with and without depression: Associations with inflammatory and oxidative stress biomarkers and uric acid. *Psychiatry Res* 2107; 250: 113-120.
222. Wu D, Wang L, Teng W, Huang K, Shang X. Correlation of fatigue during the acute stage of stroke with serum uric acid and glucose levels, depression, and disability. *Eur Neurol* 2014; 72(3-4): 223-227.
223. Kawase S, Kowa H, Suto Y, Fukuda H, Kusumi M, Nakayasu H, Nakashima K. Association between serum uric acid level and activity of daily living in Japanese patients with ischemic stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2017; 26 (9): 1960-1965.
224. Bartoli F, Trotta G, Crocarno C, Malerba MR, Clerici M, Carra G. Antioxidant uric acid in treated and untreated subjects with major depressive disorders: a meta-analysis and meta-regression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2017; 268(2): 119-127.
225. Wen S, Cheng M, Wang H, Yue J, Wang H, Li G, Zheng L, Zhong Z, Peng F. Serum uric acid levels and the clinical characteristics of depression. *Clin Biochem* 2012; 45(1-2): 49-53.
226. Black CN, Bot M, Scheffer PG, Cuijpers P, Penninx BW. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 51:164-175.
227. Palta P, Samuel LJ, Miller ER 3rd, Szanton SL. Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. *Psychosom Med* 2014; 76(1):12-19.
228. Ali-Sisto T, Tolmunen T, Toffol E, Viinamäki H, Mäntyselkä P, Valkonen-Korhonen M, Honkalampi K, Ruusunen A, Velagapudi V, Lehto SM. Purine metabolism is dysregulated in patients with major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 70: 25-32.
229. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; 87(2): 659-797.
230. El-Yacoubi M, Costentin J, Vaugeois JM. Adenosine A2A receptors and depression. *Neurology* 2003; 61(11 Suppl 6): S82-S87.
231. Yamada K, Kobayashi M, Kanda T. Involvement of adenosine A2A receptors in depression and anxiety. *Int Rev Neurobiol* 2014; 119:373-393.
232. Maes M, Bonifacio KL, Morelli NR, Vargas HO, Moreira EG, St Stoyanov D, Barbosa DS, Carvalho AF, Nunes SOV. Generalized anxiety disorder (GAD) and comorbid major

depression with GAD are characterized by enhanced nitro-oxidative stress, increased lipid peroxidation, and lowered lipid-associated antioxidant defenses. *Neurotoxicity Research* 2018; <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9906-2>.

233. Wium-Anderson MK, Kobylecki CJ, Afzal S, Nordestgaard BG. Association between the antioxidant uric acid and depression and antidepressant medication use in 96 989 individuals. *Acta Psychiatr Scand* 2017; 136(4): 424-433.
234. Guzel I, Mungan S, Oztekin ZN, AK F. Is there an association between the Expanded Disability Status Scale and inflammatory markers in multiple sclerosis? *J Chin Med Assoc* 2016; 79(2): 54-57.
235. Crayton H.J, Rossman H.S. Managing the symptoms of multiple sclerosis: a multimodal approach. *Clinical Therapeutics* 2006; 28(4): 445-460.
236. Van Kessel K, Moss-Morris R. Understanding multiple sclerosis fatigue: a synthesis of biological and psychological factors. *Journal of Psychosomatic Research* 2006; 5 (61): 583-585.
237. Dantzer R, Heijnen CJ, Kavelaars A, Laye S, Capuron L. The neuroimmune basis of fatigue. *Trends Neurosci* 2014; 37: 39-46.
238. Hanken K, Eling P and Hildebrandt H. The representation of inflammatory signals in the brain-a model for subjective fatigue in multiple sclerosis. *Frontiers in neurology* 2014; 5: 1- 10.
239. Bluthé RM, Walter V, Parnet P et al. Lipopolysaccharide induced sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *Compt Rend l'Acad Sci III* 1994; 317: 499-503.
240. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelly KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 46-56.
241. Weisdorf D, Katsanis E, Verfaillie C, Ramsay NK, Haake R, Garrison L et al. Interleukin-1 alpha administered after autologous transplantation: a phase I/II clinical trial. *Blood* 1994; 84: 2044-2049.
242. Flachenecker P, Bihler I, Weber F, Gottschalk M, Toyka KV, Rieckmann P. Cytokine mRNA expression in patients with multiple sclerosis and fatigue. *Mult Scler* 2004; 10(2): 165-169.
243. Cho HJ, Kivimäki M, Bower JE, Irwin MR. Association of C-reactive protein and interleukin-6 with new onset fatigue in the Whitehall II prospective cohort study. *Psychol Med* 2013; 43 (8): 1773-1783.

244. Brites D, Fernandes A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 476.
245. Furtado M, Katzman MA. Examining the role of neuroinflammation in major depression. *Psychiatry Res.* 2015; 229(1-2): 27-36.
246. Song C, Halbreich U, Han C, et al. Imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed patients: the effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. *Pharmacopsychiatry* 2009; 42(5):182–188.
247. Shelton RC, Claiborne J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, et al. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol Psychiatry* 2011; 16(7): 751–762.
248. Dean B, Tawadros N, Scarr E, et al. Regionally-specific changes in levels of tumour necrosis factor in the dorsolateral prefrontal cortex obtained postmortem from subjects with major depressive disorder. *J Affect Disord* 2010; 120(1–3): 245–248.
249. Maes M. A review on the acute phase response in major depression. *Rev Neurosci.* 1993; 4(4): 407–16.
250. Song C, Dinan T, Leonard BE. Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein levels in the depressed patients and normal controls. *J Affect Disord* 1994; 30(4): 283–288.
251. Felger JC, Li Z, Haroon E, et al. Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression. *Mol Psychiatry* 2016; 21(10): 1358–1365.
252. Haroon E, Fleischer CC, Felger JC et al. Conceptual convergence: increased inflammation is associated with increased basal ganglia glutamate in patients with major depression. *Mol. Psychiatry* 2016; 21(10): 1351–1357.
253. Jha MK, Minhajuddin A, Gadad BS, et al. Can C-reactive protein inform antidepressant medication selection in depressed outpatients? Findings from the COMED trial. *Psychoneuroendocrinology* 2017; 78: 105–113.
254. Kappos L, Freedman M, Polman C, Edan G, Hartung H, Miller D et al. BENEFIT Study Group. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet* 2007; 370: 389–397.



## ОПШТИ УПИТНИК

Датум: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

### ДЕМОГРАФСКИ ПОДАЦИ

1. Код пацијента \_\_\_\_\_
2. Пол:                              1-м                      2-ж
3. Датум рођења (године живота) \_\_\_\_\_
4. Место становања и контакт телефон: \_\_\_\_\_
5. Ниво образовања: \_\_\_\_\_
6. Занимање: \_\_\_\_\_
7. Датум следеће посете: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_

### КЛИНИЧКИ ПОДАЦИ

1. Дужина трајања болести: \_\_\_\_\_
2. Од које форме мултипле склерозе се лечите: \_\_\_\_\_
3. Број релапса (погоршања) у последњих годину дана: \_\_\_\_\_
4. Када сте имали последњи релапс: \_\_\_\_\_
5. Када сте примили последњу пулсну терапију: \_\_\_\_\_
6. Да ли сте у последња 3 месеца примали имуномодулаторну и имуносупресивну терапију: 1-да      2-не

7. Да ли болујете од следећих болести:

- |                 |                           |                         |
|-----------------|---------------------------|-------------------------|
| а) мождани удар | б) поремећај рада бубрега | в) поремећај рада јетре |
| г) деменција    | д) Парконсонова болест    | ђ) шећерна болест       |

8. Да ли сте у последња три месеца имали неку инфекцију:           1-да           2-не

9. Да ли конзумирате алкохол и колико често: \_\_\_\_\_

10. Да ли узимате или сте у последња три месеца узимали неки од наведених лекова:

- |               |              |                     |                |
|---------------|--------------|---------------------|----------------|
| а) витамин Ц  | б) диуретике | в) цисплатин        | г) епинефрин   |
| д) леводопа   | ђ) метилдопа | е) етамбутол        | ж) фенотиазини |
| з) теофилин   | и) аспирин   | ј) азатиоприн       | к) естроген    |
| л) пробенецид | љ) варфарин  | м) раствори глукозе | н) манитол     |

## КРУПОВА СКАЛА ЗАМОРА ( Fatigue Severity Scale-FSS)

За сваку од понуђених тврдњи дајте оцену од 1 до 7. Ово се односи на ваш уобичајени начин живота у последњих недељу дана.

1-Уопште се не слажем са тврдњом

7-У потпуности се слажем са тврдњом

Питање	1-7
1. Умор ми смањује мотивацију.	1...2...3...4...5...6...7
2. Замарам се након физичке активности.	1...2...3...4...5...6...7
3. Лако се замарам.	1...2...3...4...5...6...7
4. Замор лако утиче на моју физичку активност.	1...2...3...4...5...6...7
5. Замор ми често представља проблем.	1...2...3...4...5...6...7
6. Замор ми омета сталну физичку активност.	1...2...3...4...5...6...7
7. Замор ми утиче на обављање дневних активности.	1...2...3...4...5...6...7
8. Замор ми представља један од три главна онеспособљајућа симптома.	1...2...3...4...5...6...7
9. Замор ми ремети рад, породични живот и социјалне активности.	1...2...3...4...5...6...7

УКУПАН СКОР: \_\_\_\_\_

## БЕКОВА СКАЛА ДЕПРЕСИВНОСТИ (Beck Depression Inventory-BDI)

У овом упитнику дате су групе различитих питања. Пажљиво прочитајте сваку. Затим изаберите једно стање из сваке групе које најбоље описује како сте се осећали у протекле две недеље, укључујући и данас. Заокружите број поред стања које сте изабрали. Уколико Вам у некој групи подједнако одговара неколико стања, заокружите свако од њих, али претходно обавезно прочитајте свако стање из сваке групе пре него што се одлучите.

1.    0    Нисам тужан  
      1    Тужан сам  
      2    Тужан сам све време и не могу да се отресем тога  
      3    Толико сам тужан или несрећан да то не могу да поднесем
  
2.    0    Нисам посебно обесхрабрен у односу на будућност  
      1    Обесхрабрен сам у односу на будућност  
      2    Осећам да немам чему да се надам  
      3    Осећам да ми је будућност безнадежна и да ствари не могу да се поправе
  
3.    0    Не осећам се промашено  
      1    Осећам да сам промашио више него просечан човек  
      2    Кад размишљам о свом животу, све што видим је мноштво промашаја  
      3    Осећам да сам потпуно промашен човек
  
4.    0    Осећам задовољство у свему као и раније  
      1    Не уживам више у стварима као раније  
      2    Више немам правога задовољства ни у чему  
      3    Осећам незадовољство и досаду у свему
  
5.    0    Не осећам неку посебну кривицу  
      1    Осећам кривицу доста често  
      2    Углавном се осећам кривим  
      3    Осећам кривицу стално

6. 0 Не осећам да сам кажњен  
1 Осећам да ћу можда бити кажњен  
2 Очекујем да будем кажњен  
3 Осећам да сам кажњен
7. 0 Не осећам да сам разочаран самим собом  
1 Разочаран сам самим собом  
2 Згађен сам над собом  
3 Мрзим самог себе
8. 0 Не осећам се горим од других  
1 Критичан сам у односу на своје слабости и грешке  
2 Стално кривим себе због својих грешака  
3 Кривим себе због свега лошег што се догоди
9. 0 Не размишљај да се убијем  
1 Размишљај о самоубиству, али то не бих учинио  
2 Волео бих да се убијем  
3 Убио бих се да имам прилике да то учиним
10. 0 Не плачем чешће него обично  
1 Плачем више него раније  
2 Стално плачем  
3 Раније сам могао да плачем, али сада више не могу иако осећам потребу
11. 0 Не осећам да сам раздражљивији него обично  
1 Раздражљив сам и узнемирам се лакше него пре  
2 Непрекидно сам раздражен  
3 Више ме уопште не иритирају ствари које би ме раније иритирале
12. 0 Нисам изгубио интересовање за друге људе  
1 Мање се интересујем за друге људе него раније  
2 Углавном сам изгубио интересовање за друге људе  
3 Потпуно сам изгубио интересовање за друге људе

13. 0 У стању сам да доносим одлуке као и раније  
1 Одлажем доношење одлука чешће него раније  
2 Имам већих потешкоћа у доношењу одлука него раније  
3 Уопште нисам у стању да доносим одлуке
14. 0 Не осећам да изгледам лошије него раније  
1 Забринут(а) сам да изгледам старо и непривлачно  
2 Осећам сталне промене у свом спољашњем изгледу које ме чине непривлачно(о)м  
3 Верујем да сам ружан/ружна
15. 0 Могу да радим добро као и раније  
1 Морам да уложим посебан напор да бих нешто започео  
2 Морам да улажем веома много напора да бих било шта урадио  
3 Уопште нисам у стању да радим
16. 0 Спавам добро као и обично  
1 Не спавам више тако добро  
2 Будим се сат-два раније него обично и тешко ми је да поново заспим  
3 Будим се неколико сати раније него обично и више нисам у стању да заспим
17. 0 Не замарам се више него обично  
1 Лакше се замарам него раније  
2 Замара ме готово све што радим  
3 Сувише сам уморан да бих било шта радио
18. 0 Апетит ми није слабији него обично  
1 Апетит ми више није тако добар као пре  
2 Имам врло слаб апетит  
3 Уопште више немам апетит
19. 0 У последње време нисам изгубио много на тежини  
1 Изгубио сам више од 2.5 кг  
2 Изгубио сам више од 5 кг  
3 Изгубио сам више од 7.5 кг

20. 0 Не бринем о свом здрављу више него обично  
1 Забрињавају ме телесни симптоми као што су разни болови, лоше варење, затвор  
2 Веома ме брине моје физичко стање, тако да ми је тешко да мислим о другим стварима  
3 Толико ме брине моје физичко стање да ни о чему другом не размишљам
21. 0 Нисам приметио да се у последње време мање интересујем за секс  
1 Мање сам заинтересован за секс него пре  
2 Много мање се интересујем за секс  
3 Потпуно сам изгубио интересовање за секс

УКУПАН СКОР: \_\_\_\_\_

## БИОГРАФИЈА

Др Катарина Весић рођена је 12.06.1980. године у Крагујевцу, где је похађала основну школу и Прву Крагујевачку гимназију. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 1999/2000. године, а дипломирала је 19.10.2007. године са просечном оценом 8.51. Обавезан лекарски стаж обавила је у КБЦ Звездара и ДЗ Вождовац у трајању од 6 месеци. Од новембра 2010. године ради као лекар на стручном усавршавању на Клиници за неурологију КЦ Крагујевац. Од 2012. године запослена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, где данас обавља послове истраживача сарадника за ужу научну област Неурологија. Специјалистичке академске студије из Неурологије је уписала на Факултету медицинских наука у Крагујевцу у априлу 2014. године. Докторске академске студије на Факултету медицински наука у Крагујевцу уписала је школске 2011/2012. године, смер Неуронауке, ужа научна област Неурологија. Усмени докторски испит је положила у октобру 2013. године. Руководилац је јуниор пројекта под називом „Утицај концентрације мокраћне киселине и цитокина из цитокинске фамилије 1 на замор код оболелих од мултипле склерозе“ који се реализује на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Др Катарина Весић се активно бави научно-истраживачким радом. Аутор је и коаутор више радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом. Учесник је бројних стручних састанака. Члан је Лекарске коморе и Дрштва младих неуролога Србије. Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.



## БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Vesic K**, Toncev G, Miletic Drakulic S, Borovcanin M. Oxidative stress and neuroinflammation should be both considered in the occurrence of fatigue and depression in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Belgica* 2018; DOI: 10.1007/s13760-018-1015-8. **M23**
2. Azanjac Arsic A, Miletic Drakulic S, **Vesic K**, Toncev G: ABO blood group and risk of glioma: A case control study from Serbia. *Vojnosanitetski pregled* 2017; DOI: 10.2298/VSP161230104A. **M23**
3. **K.Vesić**, S. Đukić Dejanović, M. Borovčanin, J. Samardzić, G. Tončev. Cannabis as a possible treatment of spasticity in multiple sclerosis. *Ser J Exp Clin Res* 2016; 17(1): 61-66. **M51**
4. Toncev G, **Vesic K**, Aleksic D, Simovic S. Higher serum uric acid levels in multiple sclerosis patients after Long Term Interferon beta Treatment. *Ser J Exp Clin Res* 2017; 18 (3): 227-230. **M51**
5. Boskovic Matic T, Gavrilovic A, Simovic S, Aleksic D, **Vesic K**, Azanjac Arsic A, Toncev S, Miletic Drakulic S. Specific polymorphism 4G/ 5G gene for PAI-1 as a possible cause of cerebral venous thrombosis: a case report. *Ser J Exp Clin Res* 2017; 18 (2): 169-173. **M51**
6. Simovic S, Aleksic D, Boskovic Matic T, **Vesic K**, Toncev S, Miletic Drakulic S, Toncev G. Temporal variations of stroke occurrence. *Ser J Exp Clin Res* 2017; 18 (1): 33-38 **M51**
7. Gavrilovic A, Miletic-Drakulic S, Boskovic-Matic T, **Vesic K**, Aleksic D, Gavrilovic J. EEG abnormalities as diagnostic and prognostic factor for encephalitis. *Ser J Exp Clin Res* 17 (3): 225-229 **M51**
8. A. Azanjac, G. Tončev, **K. Vesić**, A. Gavrilović, T. Bosković Matić, S. Miletić Drakulić. The clinical outcome and therapy in patient with double seronegative Myasthenia gravis. *Ser J Exp Clin Res* 2014; 15 (1): 43-45 **M52**
9. **K. Vesić**, A. Gavrilović, T. Bošković Matić, A. Azanjac. Miller Fisher syndrome. *Medicinski časopis* 2013; 47(3): 153-155. **M53**
10. A. Azanjac, A. Gavrilović, T. Bošković Matić, **K. Vesić**. Gliomatosis cerebri. *Medicinski časopis* 2014; 48 (1): 41-43. **M53**

# ПРИЛОГ

## КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број - РБ:**

**Идентификациони број - ИБР:**

**Тип документације - ТД:** Монографска публикација

**Тип записа - ТЗ:** Текстуални штампани материјал

**Врста рада - ВР:** Докторска дисертација

**Аутор - АУ:** Катарина Весић

**Ментор/коментор - МН:** Проф. др Гордана Тончев

**Наслов рада - НР:** Утицај нивоа мокраћне киселине у серуму на замор код пацијената са мултиплом склерозом

**Језик публикације - ЈП:** Српски

**Језик извода - ЈИ:** Српски/енглески

**Земља публикавања - ЗП:** Србија

**Уже географско подручје - УГП:** Србија

**Година - ГО:** 2019

**Издавач - ИЗ:** Ауторски репринт

**Место и адреса - МС:** 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69

**Физичи опис рада - ФО:** Дисертација има 111 страница, садржи 8 поглавља, 7 слика, 21 табелу, 254 референце

**Научна област - УДК:** Медицина

**Научна дисциплина - ДИ:** Неурологија

**Предметна одредница/ кључне речи - ПО:** MS, UA, CRP, замор, депресија

**Чува се - ЧУ:** У библиотеци факултета медицинских наука у Крагујевцу, 34000

**Важна напомена- МН:**

## **Извод - ИД:**

Оксидативни стрес и неуроинфламација имају значајну улогу у патогенези мултипле склерозе (Multiple Sclerosis-MS). Код оболелих од MS замор је један од најчешћих узрока неуролошке онеспособљености. Замор се може јавити као самостални симптом али може бити и манифестација депресије. У овој студији мерили смо ниво мокраћне киселине (Uric Acid- UA) у серуму, као маркер оксидативног стреса и ниво Ц-реактивног протеина (C – Reactive Protein -CRP) у серуму, као маркер неуроинфламације. У студију је укључено 98 MS болесника у фази релапса и ремисије. Контролну групу је сачињавало 35 здравих добровољаца. Степен депресивне симптоматологије је мерен помоћу Бекове скале депресивности (Beck's Depression Inventory - BDI) а степен замора помоћу Крупове скале замора (Fatigue Severity Scale- FSS). Главни циљ истраживања је био да се испита да ли нивои UA и CRP у серуму корелирају са депресивном симптоматологијом и замором. MS оболели у релапсу и ремисији су имали значајно ниже нивое UA у серуму у односу на здраве ( $236.97 \pm 9.25 \mu\text{mol/L}$  vs.  $268.27 \pm 0.09 \mu\text{mol/L}$  vs  $314.82 \pm 11.02 \mu\text{mol/L}$ ;  $p=0.000$ ). Ниво CRP у серуму је био значајно виши у MS групи у релапсу у поређењу са MS групом у ремисији ( $4.46 \pm 0.40 \text{mg/L}$  vs.  $1.01 \pm 0.38 \text{mg/L}$ ;  $p=0.000$ ). Средње вредности BDI скорa су биле значајно веће код MS групе у релапсу ( $15.68 \pm 16.62$  vs.  $8.36 \pm 7.10$ ;  $p=0.045$ ). Опсервирана је слаба негативна корелација између нивоа UA у серуму и присуства осећаја туге, као и отежаног обављања свакодневних животних активности. Уочена је позитивна корелација између нивоа CRP у серуму и депресивне симптоматологије, као и између депресивне симптоматологије и замора ( $p<0.05$ ). Неуроинфламација и оксидативни стрес имају утицаја на замор и депресију код MS. Ниже вредности UA у серуму могу преципитирати осећај туге и утицати на способност обављања свакодневних животних активности а свако повећање серумског нивоа CRP током релапса, на овом терену може даље преципитирати настанак депресије. Због могућности да замор представља продромални симптом депресије веома је важна његова рана детекција и примена адекватних терапијских мера, могуће чак и антидепресива.

**Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП:** 06.04.2016.

**Датум одбране - ДО:**

### **Чланови комисије - КО:**

Проф. др Јелена Друловић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Неурологија, председник комисије

Проф. др Слободан Војиновић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Неурологија, члан комисије

Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан комисије

## KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number - ANO:**

**Identification number - INO:**

**Documentation type - DT:** Monographic publication

**Type of record - TR:** Textual printed material

**Contents code - CC:** PhD thesis

**Author - AU:** Katarina Vesić

**Menthor/co-mentor - MN:** Prof.dr Gordana Točev

**Title - TI:** The impact of sera uric acid on fatigue in patients with multiple sclerosis

**Language of text - LT:** Serbian

**Language of abstract:** Serbian/English

**Country of publication - CP:** Serbia

**Locality of publication - LP:** Serbia

**Publication year - PY:** 2019

**Publisher - PU:** Author reprint

**Publication place - PP:** 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovića 69

**Physical description - PD:** Thesis has 111 pages, 8 chapters, 7 pictures, 21 schemes and 254 references

**Scientific field - SF:** Medicine

**Scientific discipline - SD:** Neurology

**Subject/key words - SKW:** MS, UA, CRP, fatigue, depression

**UDC**

**Holding data:** Library of faculty of Medical Sciences, 34000 Kragujevac

**Note - N:**

**Abstract-AB:**

Oxidative stress and neuroinflammation have a role in the pathogenesis of Multiple Sclerosis (MS) and in depression. Fatigue is the most disabling symptom in patients with MS and could also be a part of depressive symptomatology. In this study we measured the serum levels of Uric Acid (UA) as a marker of oxidative stress and C – Reactive Protein (CRP) as an inflammatory marker, in 98 patients with MS in relapse and remitting phase of illness and 35 healthy subjects. Degree of depressive symptomatology and fatigue were assessed with Beck's Depression Inventory (BDI) and Fatigue Severity Scale (FSS). Further we examined the possible correlation of these biomarkers with symptoms of depression and fatigue. Relapse and remitting MS had a lower serum UA levels than controls ( $236.97 \pm 9.25 \mu\text{mol/L}$  vs.  $268.27 \pm 0.09 \mu\text{mol/L}$  vs  $314.82 \pm 11.02 \mu\text{mol/L}$ ;  $p=0.000$ ), while sera levels of CRP were higher in relapse than remitting

patients ( $4.46 \pm 0.40 \text{ mg/L}$  vs.  $1.01 \pm 0.38 \text{ mg/L}$ ;  $p=0.000$ ). Patients in relapse had higher BDI scores ( $15.68 \pm 16.62$  vs.  $8.36 \pm 7.10$ ;  $p=0.045$ ). Decreased UA levels showed weak negative correlation with presence of sadness and disturbed daily activities, higher CRP levels positively correlated with severe depression and the correlation between depression and fatigue was also observed ( $p < 0.05$ ).

It is possible that decreased UA levels lead to sadness, disturbed daily activities and severe disability. Every attack of CRP elevation in relapse could additionally precipitate the depression onset. The clinicians must pay special attention to fatigue early detection, because it could precede depression and improve further treatment.

**Accepted by the Scientific Board on - ASB: 06.04.2016.**

**Defended on - DE:**

**Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:**

Prof. dr Jelena Drulović, Professor at the Faculty of Medicine, University of Belgrade for the scientific field of Neurology, President of the Commission

Prof. dr Slobodan Vojinović, Professor at the Faculty of Medicine, University of Niš for the scientific field of Neurology, committee member

Prof. dr Marija Milovanović, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the scientific field of Microbiology and Immunology, committee member

**Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

---

---

---

која је одбрањена на \_\_\_\_\_  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора



**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

---

---

---

која је одбрањена на \_\_\_\_\_

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

---

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

# *Oxidative stress and neuroinflammation should be both considered in the occurrence of fatigue and depression in multiple sclerosis*

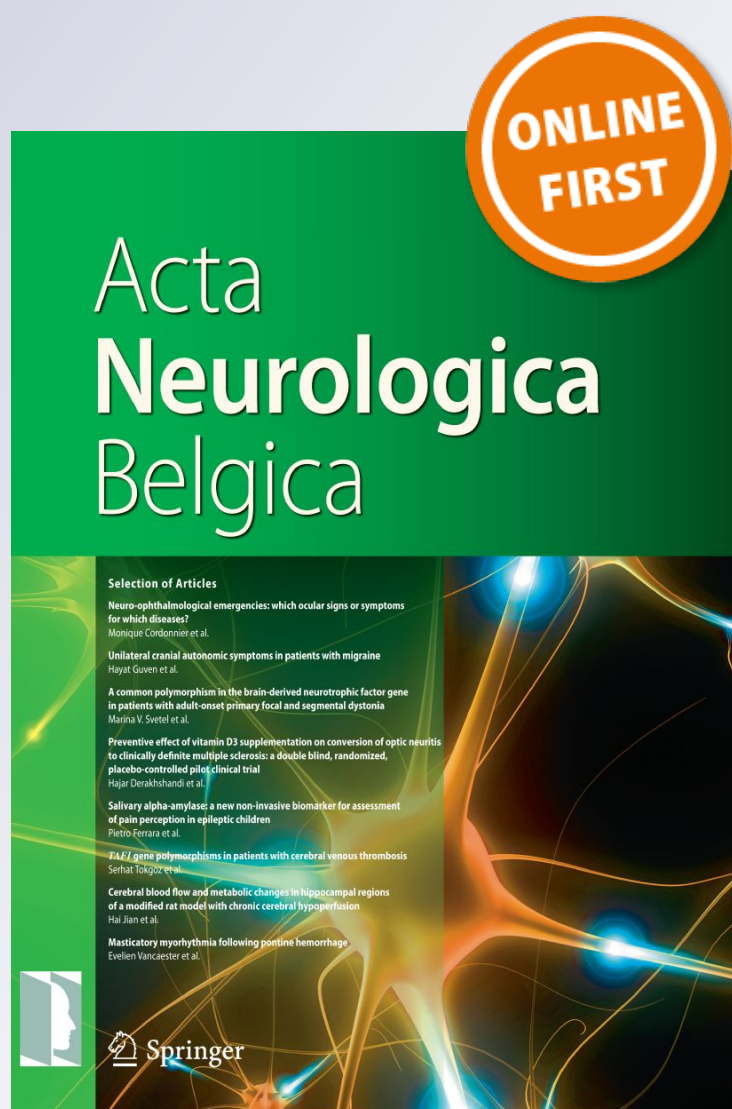
**Vesic Katarina, Toncev Gordana, Miletic Drakulic Svetlana & Borovcanin Milica**

**Acta Neurologica Belgica**

ISSN 0300-9009

Acta Neurol Belg

DOI 10.1007/s13760-018-1015-8



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Belgian Neurological Society. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Oxidative stress and neuroinflammation should be both considered in the occurrence of fatigue and depression in multiple sclerosis

Vesic Katarina<sup>1,2</sup> · Toncev Gordana<sup>1,2</sup> · Miletic Drakulic Svetlana<sup>1,2</sup> · Borovcanin Milica<sup>3,4</sup>Received: 21 May 2018 / Accepted: 30 August 2018  
© Belgian Neurological Society 2018

## Abstract

Oxidative stress and neuroinflammation have a role in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) and in depression. Fatigue is the most disabling symptom in patients with MS and could also be a part of depressive symptomatology. In this study, we measured the serum levels of uric acid (UA) as a marker of oxidative stress and C-reactive protein (CRP) as an inflammatory marker, in 98 patients with MS in relapse and remitting phase of illness and 35 healthy subjects. Degree of depressive symptomatology and fatigue were assessed with Beck's Depression Inventory (BDI) and Fatigue Severity Scale (FSS). Further, we examined the possible correlation of these biomarkers with symptoms of depression and fatigue. Relapse and remitting MS had a lower serum UA levels than controls ( $236.97 \pm 9.25$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $268.27 \pm 0.09$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $314.82 \pm 11.02$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p=0.000$ ), while sera levels of CRP were higher in relapse than remitting patients ( $4.46 \pm 0.40$   $\text{mg/L}$  vs.  $1.01 \pm 0.38$   $\text{mg/L}$ ;  $p=0.000$ ). Patients in relapse had higher BDI scores ( $15.68 \pm 16.62$  vs.  $8.36 \pm 7.10$ ;  $p=0.045$ ). Decreased UA levels showed weak negative correlation with the presence of sadness and disturbed daily activities, higher CRP levels positively correlated with severe depression and the correlation between depression and fatigue was also observed ( $p < 0.05$ ). It is possible that decreased UA levels lead to sadness, disturbed daily activities and severe disability. Every attack of CRP elevation in relapse could additionally precipitate the depression onset. The clinicians must pay special attention to early detection of fatigue because it could precede depression and improve further treatment.

**Keywords** Multiple sclerosis · Uric acid · C-reactive protein · Fatigue · Depression

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a neurological disease of still unresolved etiology. Neuroinflammation and oxidative stress are very important elements in the pathogenesis of MS. These processes cause demyelination, axonal damage, loss of neurons over years and consequently lead to neurodegeneration [1].

The relationship between neuroinflammation and oxidative stress is still poorly understood. Chronic oxidative stress and reactive oxidative species are involved in autoimmune-mediated tissue damage in MS by inducing proliferation, inflammation and activation of astrocytes, microglia and T cells [2, 3]. Elevated oxidative stress markers are strongly associated with higher sera C-reactive protein (CRP) levels [4]. Important fact is that CRP levels in peripheral blood mirror inflammation in the central nervous system (CNS) [5]. CRP is used as a marker in assessing inflammation and disease progression in MS patients [6, 7].

---

✉ Vesic Katarina  
stojanovick@yahoo.com

Toncev Gordana  
gtoncev@ptt.rs

Miletic Drakulic Svetlana  
mileticdrakulic@gmail.com

Borovcanin Milica  
milicaborovcanin@yahoo.com

<sup>1</sup> Faculty of Medical Sciences, Department of Neurology, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica St. 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Clinic of Neurology, Clinical Center Kragujevac, 30 Zmaj Jovina St., 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Psychiatric Clinic, Clinical Centre Kragujevac, 30 Zmaj Jovina St., 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup> Faculty of Medical Sciences, Department of Psychiatry, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Previous data pointed out that peroxynitrite, as a marker of oxidative stress, has also a role in the MS evolution [8]. Two decades ago, the endogenous antioxidant uric acid (UA) was marked as a strong peroxynitrite scavenger [9]. Patients with MS have significantly lower levels of serum UA than control subjects [10, 11] and it was observed that MS and gout (hyperuricemia) are almost mutually exclusive diseases and thereby further raising the possibility that hyperuricemia may have protective anti-inflammatory properties in MS [9].

Fatigue is considered to be a consequence of activated nitro-oxidative stress pathways, thereby it is more frequently observed in neuroinflammatory diseases, including MS [12]. Fatigue is one of the three most frequently occurring disabling symptoms in diverse clinical presentations of MS and it has been identified as a significant problem in 84% of patients [13]. The MS Council for Clinical Practice Guidelines defines fatigue as a sense of exhaustion, lack of energy, or tiredness, and “a subjective lack of physical and/or mental energy that is perceived by the individual or caregiver to interfere with usual or desired activity” [14]. Fatigue in MS can be a direct consequence of MS pathology or secondary caused by MS unrelated factors, which can be clinically presented at the same time or even potentiate each other [15]. Fatigue can be directly worsened by depressive symptomatology or be a consequence of physiological changes [16, 17]. Lifetime prevalence of depression in MS is 50% and depression itself can be manifested and misinterpreted as fatigue, loss of motivation and anhedonia, making this condition difficult to distinguish from MS-associated isolated fatigue [18–20]. Previous studies indicated that oxidative stress and neuroinflammation play an important role in the pathophysiology of major depressive disorder [21]. Also, MS-related depression was associated with increased serum levels of nitro-oxidative and immune-inflammatory biomarkers [22, 23].

In the present study, we measured the serum levels of UA as a marker of oxidative stress and CRP as an inflammatory marker in different phases of MS and compared it with those in healthy control subjects. Considering contradictory results from previous studies, we also assessed a level of fatigue, disability and depression symptoms in relapse and remitting patients and examined the possible correlation of these biomarkers with assessed clinical features of this disease. This is the first study, to our knowledge, that at the same time explores the possible relationship of UA and CRP levels with fatigue and depression in relapse and remitting MS patients.

## Subjects and methods

### Subjects

The study was approved by the Ethic Committee of the Clinical Centre Kragujevac and conducted in compliance with

the ethical principles of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients. The study was conducted at the Clinic of Neurology, Clinical Centre Kragujevac and in the Central Laboratory Clinical Centre Kragujevac, from February 2016 to February 2017.

Patients with a diagnosis of MS were included into the study according to the revised Mc Donald's criteria [24]. Patients were classified into two groups: MS relapse group and MS remitting group. A relapse was defined as the presence of new symptoms existing longer than 24 h and in absence of fever or subacute worsening of existing symptoms after 30 days of a stable phase of the disease. Patients in MS relapse group were not on immunomodulatory therapy, corticosteroid therapy or some other MS treatment options in previous 3 months. All patients in remitting group have relapse–remitting form of disease and were treated with immunomodulatory therapy (interferon-beta-1a, administered subcutaneously three times weekly). The control group consisted of healthy subjects, matched by gender and age with MS patients, recruited during blood donation at Service supply of blood and blood products, Clinical Center Kragujevac.

The exclusion criteria were comorbidity of stroke, myocardial diseases, renal or hepatic dysfunction, other neurodegenerative diseases, acute infections, recent surgical interventions, alcohol or drug abuse, all disorders which are immune- and redox-mediated illnesses, such as fibromyalgia, generalized anxiety disorder, psychosis, bipolar disorder (bipolar depression) and treatment with medications that can influence on uric acid levels (vitamin C, diuretics, epinephrine, levodopa, methyldopa, acetylsalicylic acid and azathioprine).

### Somatic examination and laboratory measurements

Somatic examination was done and vital signs were measured at admission. Patients were fasting and the blood samples for routine laboratory analysis were taken the next day, between 9am and 12 pm, before the application of corticosteroid therapy. Levels of serum UA and CRP were determined on Beckman Coulter AU 680 analyzer using reagents from the same manufacturer (Beckman Coulter Inc., USA). Referent values for UA were in the following range: 154–428  $\mu\text{mol/L}$ . The CRP values greater than or equal to 5 mg/L were considered elevated.

### Clinical assessment

Data concerning sociodemographic characteristics, duration of illness and clinical course of the disease were collected. In the relapse patients group, the scales were conducted immediately after admission and before the use of pulsed

corticosteroid therapy. At patients in remission the scales were carried out on scheduled 3-month visits.

Neurological status in all patients was assessed using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score [25]. EDSS consists of eight functional domains: visual (optic), brainstem, pyramidal, cerebellar, sensory, bowel and bladder, cerebral function and ambulation. The EDSS is an ordinal clinical rating scale, ranging from 0 (normal neurologic examination) to 10 (death due to MS), in half-point increments to indicate mild, moderate or severe disability.

The occurrence of fatigue was determined with Fatigue Severity Scale (FSS). It is a self-reported questionnaire designed by Krupp for fatigue identification [26]. The scale consists of nine items on a seven-point scale. The presence of mild fatigue is marked with an average score over 3 points, and as disabling fatigue with FSS average score higher than 4.

Depressive symptomatology was assessed with Beck's Depression Inventory (BDI), suggested for depressive symptoms screening in MS patients by American Academy of Neurology [27]. The 21-item BDI consists of four statements, describing increasing intensities of depression symptoms. It includes somatic and cognitive-affective symptoms and every item is graded into a scale from 0 to 4, reflecting the patient's feelings in the previous 2 weeks. The degree of severity of depression symptoms was quantified as follows: normal (range 0–10), mild mood disturbance (range 11–16), borderline clinical depression (17–20), moderate depression (21–30), severe depression (31–40) and extreme depression (over 40).

## Statistical analyses

The statistical analyses were performed using SPSS 20.0 software. Normal distribution of data was tested with Kolmogorov–Smirnov test. Numerical values are presented as mean  $\pm$  standard deviation and as percentages. We used Student's *t* test for parametric and Mann–Whitney *U* test for non-parametric variables to evaluate mean differences between two groups of patients. We used General Linear Model (GLM) analyses to determine levels of UA and CRP as dependent variables between groups while controlling gender and body mass index (BMI) and to show effect of these parameters. We examined the correlations between serum UA and CRP levels and scores on clinical assessment scales using Pearson's or Spearman's correlation. To delineate the best prediction on presence of illness onset, depression and fatigue in MS patients, we performed a binary logistic regression analysis. The presence of depressive symptomatology was assessed using BDI. In patients with MS, a cut-off score  $> 13$  on BDI scale can be used as criterion for depression with a sensitivity of 71% and specificity of 79% [27]. Fatigue was assessed using FSS scale and

suggested cut-off score for MS patients is  $> 4$ , with acceptable internal consistency, stability over time and sensitivity to clinical change [26]. For binary logistic regression analysis we used these cut-off values (BDI  $> 13$ , FSS  $> 4$ ) to discriminate patients with and without depression, and also those with and without fatigue. A multiple regression analysis was used to evaluate the significant sociodemographic and clinical predictors for FSS and BDI scores. A *p* value of 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

### Sociodemographic and clinical data

Sociodemographic data are presented in Table 1. The study included  $n = 98$  MS patients,  $n = 48$  MS relapse patients (48.9%) and  $n = 50$  MS remitting patients (51.1%). No differences were found in relation to gender and age between groups. The mean duration of disease was significantly longer in MS remitting patient's group ( $6.19 \pm 7.11$  vs.  $8.64 \pm 4.46$ ;  $p = 0.01$ ), while relapse rate was higher in MS relapse patient's group ( $2.42 \pm 1.22$  vs.  $1.24 \pm 1.39$ ;  $p = 0.05$ ). The patients included in MS relapse group were those with Clinically Isolated Syndrome (CIS), Relapse Remitting MS (RRMS) and Secondary Progressive MS (SPMS), with the following distribution, respectively: 20 patients (41.7%), 17 patients (35.4%) and 11 patients (22.9%). The mean duration of treatment in remitting group was 4.42 years  $\pm$  3.64 (in the range of 1–12).

### Lower serum levels of UA in all MS patients and higher CRP in MS relapse patients

We measured significantly lower mean serum UA levels in relapse MS patients than in healthy control subjects ( $236.97 \pm 9.25$  vs.  $314.82 \pm 11.02$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $F = 14.339$ ,  $df = 2/128$ ,  $p = 0.000$ ). In relapse group, we did not find significantly different serum UA levels between CIS, RRMS and SPMS ( $223.60 \pm 14.77$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $225.69 \pm 15.43$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $264.80 \pm 20.36$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $F = 1.497$ ,  $df = 2/86$ ,  $p = 0.230$ ). The patients in MS remitting group also had the lower mean serum UA level than healthy control subjects ( $268.27 \pm 0.09$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $314.82 \pm 11.02$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $F = 14.339$ ,  $df = 2/128$ ,  $p = 0.000$ ). We did not find significantly different serum UA levels between patients in relapse and remission ( $238.03 \pm 9.67$  vs.  $258.88 \pm 9.08$ ,  $F = 3.307$ ,  $df = 1/86$ ,  $p = 0.07$ ). We found that patients in remitting phase had higher UA levels in sera than patients with CIS and RRMS, but it was not significant ( $223.60 \pm 14.77$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $225.69 \pm 15.43$   $\mu\text{mol/L}$  vs.  $258.88 \pm 9.08$ ;  $F = 1.497$ ,  $df = 2/86$ ,  $p = 0.230$ ). Tests between subject effects showed that sex ( $F = 14.360$ ,  $df = 1/86$ ,

**Table 1** Sociodemographic data in relapse and remitting MS patients

Variables	MS relapse group <i>n</i> = 48	MS remitting group <i>n</i> = 50	<i>P</i> value
Age (years)	41.7 ± 9.13	38.6 ± 7.88	<i>p</i> = 0.18
Sex (female/male)	30/18	35/15	<i>p</i> = 0.08
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.98 ± 3.67	22.502 ± 1.78	<i>p</i> = 0.40
Mean duration of illness (years)	6.19 (1–34)	8.64 (2–18)	<i>p</i> = 0.01
Relapse rate	2.42 (0–5)	1.24 (0–6)	<i>p</i> = 0.05
MS clinical types			
CIS	20 (41.7%)	/	
Relapsing–remitting MS	17 (35.4%)	50	
Secondary progressive MS	11 (22.9%)	/	

MS multiple sclerosis, CIS clinical isolated syndrome, BMI body mass index  
*p* < 0.05

*p* = 0.000, partial eta squared = 0.142) and BMI ( $F = 4.515$ ,  $df = 1/86$ ,  $p = 0.036$ , partial eta squared = 0.050) had significant effect on sera levels of UA. Mean value of CRP was significantly higher in the relapse patients than in the remitting MS patients ( $4.46 \pm 0.40$  mg/L vs.  $1.01 \pm 0.38$  mg/L;  $F = 15.906$ ,  $df = 1/86$ ,  $p = 0.000$ ). The effects of sex ( $F = 2.044$ ,  $df = 1/86$ ,  $p = 0.156$ , partial eta squared = 0.023) and BMI ( $F = 1.908$ ,  $df = 1/86$ ,  $p = 0.171$ , partial eta squared = 0.025) on CRP were not significant (Fig. 1).

**More severe disability and depressive symptomatology in MS relapse group**

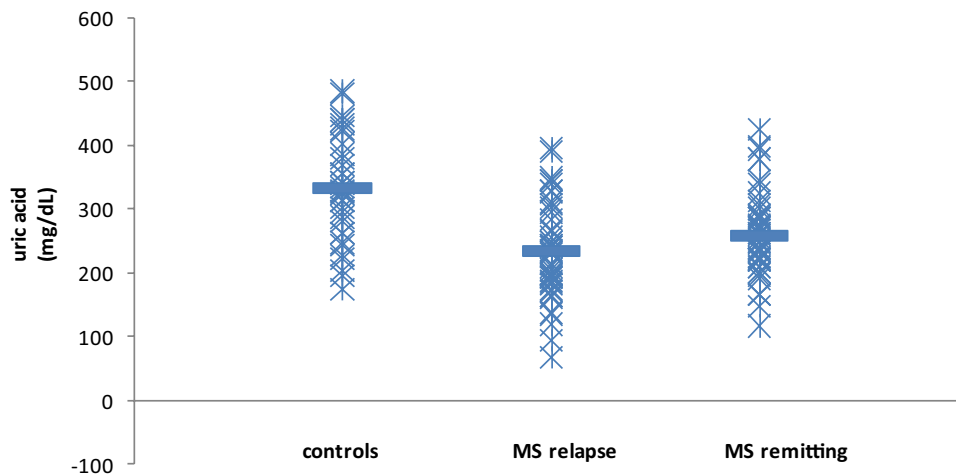
Clinical characteristics of MS relapse and MS remitting patients are shown in Table 2. Relapse MS group patients had significantly higher EDSS scores ( $4.02 \pm 1.92$  vs.

$2.07 \pm 1.17$ ;  $p = 0.000$ ) and BDI scores ( $15.68 \pm 16.62$  vs.  $8.36 \pm 7.10$ ;  $p = 0.045$ ). We did not find difference in FSS scores between these patient groups (data not presented).

Fatigue was present in 32 patients with relapse (66.7%) and depressive symptomatology was present in 21 patients (43.7%). In MS remitting group, we observed the fatigue occurrence in 28 patients (56%) and depression symptoms in 12 patients (24%).

**Negative correlation of UA sera levels with the presence of sadness and disturbed daily activities and positive correlation of CRP levels with EDSS, BDI and FSS scores**

We found significant, but weak positive correlation with CRP levels and physical and daily activities (overall  $p < 0.05$ ,



**Fig. 1** Serum levels of uric acid. Serum UA levels in healthy control subjects (*n* = 35), MS relapse patients (*n* = 48) and MS remitting patients (*n* = 50) were determined by Beckman–Coulter auto-analyzer. Data are presented as mean ± SE. Statistical significance was tested by General Linear Model (GLM). Serum levels of

UA were significantly lower in MS relapse patients than controls [ $236.97 \pm 9.25$  μmol/L vs.  $314.82 \pm 11.02$  μmol/L;  $p = 0.000$ ]. Serum levels of UA were significantly lower in MS remitting patients than controls [ $268.27 \pm 0.09$  μmol/L vs.  $314.82 \pm 11.02$  μmol/L;  $p = 0.000$ ]



**Table 2** Clinical features at relapse and remitting phases of multiple sclerosis patients

Variables	MS relapse group	MS remitting group	P values
EDSS score	4.02 ± 1.92	2.07 ± 1.17	p=0.000
FSS score	4.91 ± 1.18	4.80 ± 1.06	p=0.711
BDI score	15.68 ± 16.62	8.36 ± 7.10	p=0.045

MS multiple sclerosis, EDSS Expanded Disability Status Scale, FSS Fatigue Severity Scale, BDI Beck's Depression Inventory

We performed Student's *t* test ( $p < 0.05$ ). Data are expressed as mean and standard deviation

$r = 0.40$ ). Further, we observed significant positive correlation between CRP and BDI scores ( $p = 0.000$ ,  $r = 0.40$ ) and positive correlations with EDSS scores ( $p = 0.000$ ,  $r = 0.57$ ) and FSS scores ( $p = 0.03$ ,  $r = 0.40$ ). A statistically significant positive correlation was found between FSS and BDI scores ( $p = 0.00$ ,  $r = 0.45$ ), FSS and EDSS scores ( $p = 0.00$ ,  $r = 0.40$ ) and BDI and EDSS score ( $p = 0.00$ ,  $r = 0.45$ ).

We did not establish statistically significant correlation between serum UA levels with an overall score on the BDI scale ( $p = 0.259$ ), FSS scale ( $p = 0.080$ ) and EDSS scale ( $p = 0.117$ ), but we found a statistically significant negative correlation with the BDI items that represent the symptoms of sadness ( $p = 0.008$ ,  $r = -0.266$ ) and with the FSS item which refers to the effect of fatigue on daily physical activity ( $p = 0.032$ ,  $r = -0.21$ ).

Table 3 shows the results of three different binary logistic regression analyses: the first one used serum UA level data, while adjusting sex and BMI, and showed that UA levels were significantly associated with illness onset ( $\chi^2 = 28.933$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.000$ ; Nagelkerke = 0.289; 77.4% of all cases were correctly classified with 92.9% sensitivity and 34.3% specificity). The second analysis was performed using sex, age, level of education, duration of illness, EDSS score data and showed that age and EDSS score affect the occurrence of fatigue ( $\chi^2 = 20.059$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.001$ ; Nagelkerke = 0.247; 71.4% of all cases were correctly classified with 63.0% sensitivity and 78.8% specificity). The third

binary logistic regression analysis was performed using sex, age, level of education, duration of illness, EDSS scores and showed that EDSS score affects the occurrence of depression ( $\chi^2 = 15.214$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.009$ ; Nagelkerke = 0.199; 75.5% of all cases were correctly classified with 62.4% sensitivity and 92.3% specificity). Multiple regression analysis indicated that age, clinical type of MS ( $F (1/95) = 4.339$ ,  $p = 0.040$ ,  $R^2 = 0.164$ , adjusted  $R = 0.146$ ) and EDSS score ( $F (1/96) = 16.243$ ,  $p = 0.000$ ,  $R^2 = 0.145$ , adjusted  $R = 0.136$ ) are significant predictors for FSS score. Also, clinical type of MS, immunomodulatory therapy ( $F (1/95) = 13.236$ ,  $p = 0.000$ ,  $R^2 = 0.198$ , adjusted  $R = 0.182$ ), CRP and EDSS score ( $F (1/95) = 4.128$ ,  $p = 0.040$ ,  $R^2 = 0.203$ , adjusted  $R = 0.187$ ) are significant predictors of BDI score (results are presented in Table 4).

## Discussion

In the present study, we observed lower serum UA levels in MS patients than in healthy control subjects in all phases of MS and higher sera CRP levels at relapse patients. The serum levels of UA affect the occurrence of the disease. More severe disability and depressive symptomatology were presented in MS relapse patients. Sera levels of UA negatively correlate with the presence of sadness and disturbed daily activities and CRP levels correlate with EDSS, BDI and FSS scores. CRP was a significant predictor of BDI scores, while EDSS score had influence on FSS and BDI scores.

In the past few years, various studies have presented conflicting results regarding serum UA levels in MS patients. To this day, it is still not clear whether UA should be considered in disease onset or only as a consequence of a disease progression in MS. Our results are consistent with the results of the recent meta-analysis [11], indicating that MS patients have a significantly lower serum UA levels compared with those in healthy control subjects. UA levels were evaluated in different stages of MS and according to clinical

**Table 3** Results of binary logistic regression analysis with disease onset, depression and fatigue as dependent variables and demographic, clinical and biological data as explanatory variables

Categories	Explanatory variables	Wald	df	P	Odds ratio	Lower and upper 95% CI
Illness onset	UA	21.902	1	0.000	0.986	0.97–0.99
Depression	EDSS	10.970	1	0.001	0.636	0.48–0.83
Fatigue	Age	4.114	1	0.043	0.935	0.87–0.99
	EDSS	5.472	1	0.019	0.727	0.55–0.95

MS patients were divided into two groups: with and without depression, using cut-off score > 13 on the Beck's Depression Inventory

MS patients were divided into two groups: with and without fatigue, using cut-off score > 4 on the Fatigue Severity Scale

UA uric acid, EDSS Expanded Disability Status Scale

**Table 4** Results of multiple regression analysis with FSS and BDI scores as dependent variables and demographic and clinical data as explanatory variables

Dependent variables	Explanatory variables	<i>B</i>	SE	$\beta$	<i>T</i>	<i>P</i>
FSS scores	Age	0.060	0.020	0.291	2.627	0.004
	MS clinical types	1.141	0.307	0.355	3.715	0.000
	EDSS scores	0.364	0.091	0.380	4.030	0.000
BDI scores	MS clinical types	8.293	2.197	0.352	3.775	0.000
	Immunomodulatory therapy	-8.289	2.439	-0.339	-3.411	0.001
	CRP	0.850	0.419	0.200	2.032	0.040
	EDSS scores	2.383	0.696	0.337	3.424	0.001

MS multiple sclerosis, FSS Fatigue Severity Scale, EDSS Expanded Disability Status Scale, BDI Beck's Depression Inventory, CRP C-reactive protein

$p < 0.05$

phenotypes. Our data suggested that the patients with CIS and RRMS in relapse have lower UA levels than patients with SPMS, but the difference was not statistically significant. The results of previous studies indicated that immunomodulatory drugs increase serum UA levels [28], which is in accordance with our findings of higher levels of UA in MS remitting patients on therapy in comparison to patients in early, inflammatory phase of illness and without therapy.

Previous studies indicated sex differences in UA serum levels, with significantly lower values UA in female patient [29]. A possible explanation for this phenomenon is reduced antioxidant activity and higher incidence of MS in females. Also, BMI is a major determinant of lower UA sera levels [30]. Our results are in accordance with these findings and emphasize that possible sex and BMI differences should be especially considered.

Also, we measured significantly higher CRP levels in relapse MS patients. Hanninen et al. showed that CRP values are higher during relapses than in remission [7]. All these findings support the fact that in the early, inflammatory disease stages, neuroinflammation and oxidative stress are predominant, while the neurodegeneration is prominent in progressive form of MS, in line with the results of Zoccolella et al. [31]. Our results point out that UA could be considered as a trait marker in MS and that decreased level of UA enhances the risk for disease.

In this research, we examined the frequency and degree of disability, depression and fatigue in patients in relapse and remission. Our findings suggest that the more severe disability and depressive symptomatology occur in MS relapse group of patients, but we did not find a statistically significant difference in fatigue scores between groups.

Further, we examined a possible relationship of UA and CRP levels with disability, symptoms of depression and fatigue. Association between UA and disability has been shown in some studies, while other studies did not confirm these data [32]. We also did not establish the correlation between UA levels and EDSS scores. Moccia et al. indicated that patients with impaired ambulation (EDSS  $\geq 5$ )

presented lower UA levels than fully ambulatory patients (EDSS  $\leq 4.5$ ) [33]. We suppose that this correlation was not observed because most of our patients had EDSS  $\leq 4.5$ . On the other side, degree of disability in our study significantly correlated with higher CRP levels. This fact is in line with the results of Guzel et al. which indicate that patients with higher CRP levels have higher level of disability on EDSS [34].

As already presented in depression, lower UA levels in MS can be a consequence of minimized adenosine turnover and an increased adenosine activity in CNS, causing depression-like behavior [35]. Bartoli et al. in their meta-analysis indicate that patients with major depression have lower serum UA levels than healthy controls and that antidepressant treatment increases UA levels [36]. Similarly, in our study, UA levels negatively correlated with the presence of sadness. Oliveira et al. have investigated sera UA levels in MS patients with and without depression and did not find differences in UA levels with and without comorbid depression and MS [32].

Maes et al. [37] indicated that general anxiety disorder is characterized by increased nitro-oxidative stress with lipid peroxidation, lower protein oxidation and lipid-associated antioxidant defenses. Increased UA levels may be regarded as a beneficial compensatory mechanism in response to oxidative stress, because the formation of peroxynitrite is inhibited by increased UA levels and consequently protein oxidation is less severe than in depression. It could be said that higher UA levels may be associated with lower risk of depression [38].

Additionally, major depressive disorders are characterized by low-grade inflammation and it was shown that depression is associated with increased CRP sera levels [39]. Our data suggest the positive correlation of serum CRP levels with BDI scores and subscores in MS patients. Also, we pointed out that CRP is a significant predictor of BDI scores. All these findings suggest that decrease of UA levels could be an underlying mechanism in depression onset, potentiated with CRP elevation.

In this study, more disabled MS patients (with higher EDSS score) had more severe fatigue and depression symptoms and we observed the association between fatigue and depression. Our data indicated that EDSS score affected the occurrence of fatigue and depression and also was a significant predictor of BDI and FSS scores. Previous studies showed that disability status is an independent, but moderate determinant of depression in MS patients and that fatigue may be due to disability level [40, 41]. We did not find a statistically significant correlation between UA sera levels with fatigue, but we observed significant correlation with lower daily activity on FSS scale. Kawase et al. show in their study the relationship between lower serum UA levels and poor activities of daily living in patients with ischemic stroke, and suggest that UA could be a predictive marker of lower daily activity in these patients [42]. It is possible that the same approach could be applied in MS indication field. We demonstrated significant correlation between CRP levels with fatigue, and the result is in line with Cho et al. who reported that plasma CRP was prospectively associated with new-onset fatigue [43]. The established correlations were statistically significant but weak correlations, so the larger sample could reveal much stronger relations of these factors.

## Conclusion

Our results indicate that in patients with MS, both low-grade inflammation and oxidative stress have a role in fatigue and depression occurrence and must be simultaneously considered. It is possible that UA depots could be emptied in MS evolution, leading to sadness, disturbed daily activities and severe disability. Every attack of CRP elevation in relapse could additionally precipitate the depression onset.

The clinicians must pay special attention to early detection of fatigue because of its potential to precede depression. This also implies that effective treatment of depression in MS could markedly improve recovery.

**Funding** This work was supported by the Faculty of Medical Science, University of Kragujevac (project JP 03–16), Serbia.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** The study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Centre of Kragujevac and conducted in compliance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki.

**Informed consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

## References

- Moore GR (2010) Current concepts in the neuropathology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 37(2):5–15. <https://doi.org/10.1017/S0317167100022381>
- Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR (2004) Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon gamma. *J Neurosci Res* 7(4):540–551. <https://doi.org/10.1002/jnr.20180>
- Soileiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S (2018) Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4<sup>+</sup>T cells in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 12:114. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00114>
- Park S, Kim M, Paik JK, Jang YJ, Lee SH, Lee JH (2013) Oxidative stress is associated with C-reactive protein in non-diabetic postmenopausal women, independent of obesity and insulin resistance. *Clin Endocrinol* 79(1):65–70. <https://doi.org/10.1111/1/j.1365-2265.2012.04512.x>
- Lindqvist D, Hall S, Surova Y, Nielsen HM, Janelidze S, Brundin L, Hansson O (2013) Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease-Associations with depression, fatigue and cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 33:183–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.07.007>
- Giovannoni G, Miller DH, Losseff NA, Sailer M, Lewellyn-Smith N, Thompson AJ, Thompson EJ (2001) Serum inflammatory markers and clinical/MRI markers of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 248(6):487–495. <https://doi.org/10.1007/s004150170158>
- Soilu-Hänninen M, Koskinen JO, Laksonen M, Hänninen A, Lilius EM, Waris M (2005) High sensitivity measurement of CRP and disease progression in multiple sclerosis. *Neurology* 65(1):153–155. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000167129.90918.f5>
- Smith KJ, Kapoor R, Felts PA (1999) Demyelination: The role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol* 9(1):69–92. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00212.x>
- Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H (1998) Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(2):675–680. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.675>
- Dujmovic I, Pekmezovic T, Obrenovic R, Nikolić A, Spasic M, Mostarica Stojkovic M, Drulovic J (2009) Cerebrospinal fluid and serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis. *Clin Chem Lab Med* 47(7):848–853. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.192>
- Wang L, Hu W, Wang J, Qian W, Xiao H (2016) Low serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica: An updated meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 9:17–22. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2016.05.008>
- Gerwyn Morris and Michael Maes (2013) Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and encephalomyelitis disseminate/multiple sclerosis show remarkable levels of similarity in phenomenology and neuroimmune characteristics. *BMC Med* 11:205. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-205>
- Schwid SR, Covington M, Segal BM, Goodman AD (2002) Fatigue in multiple sclerosis: current understanding and future directions. *J Rehabil Res Dev* 39(2):211–224
- Guidelines, Multiple Sclerosis Clinical Practice (1998) Fatigue and multiple sclerosis: evidence-based management strategies for fatigue in multiple sclerosis. Paralyzed Veterans of America, Washington
- Braley TJ, Chervin RD (2010) Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms, evaluation and treatment. *Sleep* 33(8):1061–1067. <https://doi.org/10.1093/sleep/33.8.1061>

16. Schwartz CE, Coulthard-Morris L, Zeng Q (1996) Psychosocial correlates of fatigue in multiple sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil* 77(2):165–170. [https://doi.org/10.1016/s0003-9993\(96\)90162-8](https://doi.org/10.1016/s0003-9993(96)90162-8)
17. Randolph JJ, Arnett PA (2005) Depression and fatigue in relapsing-remitting MS: the role of symptomatic variability. *Mult Scler* 11(2):186–190. <https://doi.org/10.1191/1352458505ms1133oa>
18. Feinstein A (2011) Multiple sclerosis and depression. *Mult Scler* 17(11):1276–1281. <https://doi.org/10.1177/1352458511417835>
19. Figved N, Klevan G, Myhr KM, Glad S, Nyland H, Larsen JP, Harboe E, Omdal R, Aarsland D (2005) Neuropsychiatric symptoms in patient with multiple sclerosis. *Acta Psychiatr Scand* 112(6):463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2005.00624.x>
20. Wood B, Van der Mei IA, Ponsoby AL, Pittas F, Quinn S, Dwyer T, Lucas RM, Taylor BV (2013) Prevalence and concurrence of anxiety, depression and fatigue over time in multiple sclerosis. *Mult Scler* 19(2):217–224. <https://doi.org/10.1177/1352458512450351>
21. Wen S, Cheng M, Wang H, Yue J, Wang H, Li G, Zheng L, Zhong Z, Peng F (2012) Serum uric acid levels and the clinical characteristics of depression. *Clin Biochem* 45(1–2):49–53. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.10.010>
22. Kallaur AP, Lopes J, Oliveira SR, Simão AN, Reiche EM, de Almeida ER, Morimoto HK, de Pereira WL, Alfieri DF, Borelli SD, Kaimen-Maciel DR, Maes M (2016) Immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress biomarkers of depression symptoms in subjects with multiple sclerosis: Increased peripheral inflammation but less acute neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 53(8):5191–5202. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9443-4>
23. Brenner P, Granqvist M, Königsson J, Al Nimer F, Piehl F, Jokinen J (2018) Depression and fatigue in multiple sclerosis: Relation to exposure to violence and cerebrospinal fluid immunomarkers. *Psychoneuroendocrinology* 89:53–58. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.01.002>
24. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69(2):292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
25. Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33(11):1444–1452. <https://doi.org/10.1212/wnl.33.11.1444>
26. Krupp LB, La Rocca NG, Muir-Nash J, Steinberg AD (1989) The fatigue severity scales. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol* 46(10):1121–1123. <https://doi.org/10.1001/archneur.1989.00520460115022>
27. Minden SL, Feinstein A, Kalb RC, Miller D, Mohr DC, Patten SB, Bever C Jr, Schiffer RB, Gronseth GS, Narayanaswami P (2014) Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. Evidence-based guideline: assessment and management of psychiatric disorders in individuals with MS: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 82(2):174–181. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000013>
28. Guerrero AL, Martin-Polo J, Laherran E, Gutierrez F, Iglisias F, Tejero MA, Rodriguez-Gallego M, and Alcazar C (2008) Variation of serum uric acid levels in multiple sclerosis during relapses and immunomodulatory treatment. *Eur J Neurol* 15(4):394–397. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02087.x>
29. Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G (2002) Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *Eur J Neurol* 9(3):221–226. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2002.00384.x>
30. Tanaka K, Ogata S, Tanaka H, Omura K, Honda C, Osaka Twin Research Group, Hayakawa K (2015) The relationship between body mass index and uric acid: a study on Japanese adult twins. *Environ Health Prev Med* 20(5):347–353. <https://doi.org/10.1007/s12199-015-0473-3>
31. Zoccollella S, Tortorella C, Iaffaldano P, Drenzo V, D'Onghia M, Luciannatelli E, Paolicelli D, Livrea P, Trojano M (2012) Low serum urate levels are associated to female gender in multiple sclerosis patients. *PloS One* 7(7):e40608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040608>
32. Oliveira SR, Kallaur AP, Lopes J, Colado Simão AN, Reiche EM, de Almeida ER, Morimoto HK, de Carvalho Jennings de Pereira WL, Alfieri DF, Flauzino T, de Meleck Proença C, Gomes AM, Kaimen-Maciel DR, Maes M (2017) Insulin resistance, atherogenicity, and iron metabolism in multiple sclerosis with and without depression: associations with inflammatory and oxidative stress biomarkers and uric acid. *Psychiatry Res* 250:113–120. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.12.039>
33. Moccia M, Lanzillo R, Palladino R, Russo C, Carotenuto A, Massarelli M, Vacca G, Vacchiano V, Nardone A, Triassi M, Morra VB (2015) Uric acid: a potential biomarker of multiple sclerosis and of its disability. *Clin Chem Lab Med* 53(5):753–759. <https://doi.org/10.1515/ccml-2014-0744>
34. Guzel I, Mungan S, Oztekin ZN, AK F (2016) Is there an association between the expanded disability status scale and inflammatory markers in multiple sclerosis? *J Chin Med Assoc* 79(2):54–57. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.08.010>
35. Yamada K, Kobayashi M, Kanda T (2014) Involvement of adenosine A2A receptors in depression and anxiety. *Int Rev Neurobiol* 119:373–393. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801022-8.00015-5>
36. Bartoli F, Trotta G, Crocarno C, Malerba MR, Clerici M, Carrà G (2017) Antioxidant uric acid in treated and untreated subjects with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 268(2):119–127. <https://doi.org/10.1007/s00406-017-0817-7>
37. Maes M, Bonifacio KL, Morelli NR, Vargas HO, Moreira EG, St Stoyanov D, Barbosa DS, Carvalho AF, Nunes SOV (2018) Generalized anxiety disorder (GAD) and comorbid major depression with GAD are characterized by enhanced nitro-oxidative stress, increased lipid peroxidation, and lowered lipid-associated antioxidant defenses. *Neurotox Res*. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9906-2>
38. Wium-Anderson MK, Kobylecki CJ, Afzal S, Nordestgaard BG (2017) Association between the antioxidant uric acid and depression and antidepressant medication use in 96 989 individuals. *Acta Psychiatr Scand* 136(4):424–433. <https://doi.org/10.1111/acps.12793>
39. Wium-Andersen MK, Orsted DD, Nielsen SF, Nordestgaard BG (2013) Elevated C-reactive protein levels, psychological distress, and depression in 73, 131 individuals. *JAMA Psychiatry* 70(2):176–184. <https://doi.org/10.1001/2013.jamapsychiatry.102>
40. Tsigoulis G, Triantafyllou N, Papageorgiou C, Evangelopoulos ME, Kararizou E, Sfagos C, Vassilopoulos D (2007) Associations of the Expanded Disability Status Scale with anxiety and depression in multiple sclerosis outpatients. *Acta Neurol Scand*

- 115(1):67–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00736.x>
41. Ghajarzadeh M, Jalilian R, Eskandari G, Sahraian MA, Azimi A, Mohammadifar M (2013) Fatigue in multiple sclerosis: relationship with disease duration, physical disability, disease pattern, age and sex. *Acta Neurol Belg* 113 (4): 411–414. <https://doi.org/10.1007/s13760-013-0198-2>
42. Kawase S, Kowa H, Suto Y, Fukuda H, Kusumi M, Nakayasu H, Nakashima K (2017) Association between serum uric acid level and activity of daily living in Japanese patients with ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26(9):1960–1965. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.06.017>
43. Cho HJ, Kivimäki M, Bower JE, Irwin MR (2013) Association of C-reactive protein and interleukin-6 with new onset fatigue in the Whitehall II prospective cohort study. *Psychol Med* 43(8):1773–1783. <https://doi.org/10.1017/S0033291712002437>



**VOJNOSANITETSKI PREGLED**

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)

## ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article: **ABO BLOOD GROUP AND RISK OF GLIOMA: A CASE CONTROL STUDY FROM SERBIA**

Authors: **Ana Azanjac Arsić\***, **Svetlana Miletić Drakulić\*,#**, **Katarina Vesić\***, **Gordana Tončev\*,#**; *Vojnosanitetski pregled* (2018); Online First September, 2017.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP161230104A>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

# **ABO BLOOD GROUP AND RISK OF GLIOMA: A CASE CONTROL STUDY FROM SERBIA**

Ana Azanjac Arsić<sup>\*</sup>, Svetlana Miletić Drakulić<sup>\*#</sup>, Katarina Vesić<sup>\*</sup>, Gordana Tončev<sup>\*#</sup>

<sup>\*</sup>University of Kragujevac Faculty of Medical Sciences, Department of Neurology, Kragujevac, Serbia

<sup>#</sup>Clinic of neurology, Clinical Center Kragujevac, Serbia

Corresponding author:

Ana Azanjac Arsić

34000 Kragujevac

e-mail: ana.azanjac@yahoo.com

## **ABO BLOOD GROUP AND RISK OF GLIOMA: A CASE CONTROL STUDY FROM SERBIA**

### **Abstract**

**Background/Aim.** Gliomas are the most common primary brain tumors and the etiology is unknown. The aim of this study was to investigate possible association between incidence of glioma and certain blood groups.

**Methods.** The case-control study included 100 pathologically confirmed cases of glioma at the Clinical center of Kragujevac, Serbia, between 2014 and 2015, and 200 age- and sex-matched controls without malignant diseases in personal and family history at the same institution. After signing the informed consent all the patients filled out an epidemiological questionnaire.

**Results.** In an analysis comparing glioma patients with control group, a significant association ( $p < 0.0005$ ) was observed in relation to the blood group AB. Furthermore, didn't observe significant association in relation to the blood group A ( $p = 0.070$ ), blood group B ( $p = 0.256$ ), blood group O ( $p = 0.768$ ) between compared groups. Also, in an analysis comparing glioma patients with control group, a significant association was observed in relation to the years spent in hometown ( $p = 0.035$ ), changing of the place residence ( $p = 0.007$ ), body weight ( $p = 0.002$ ) and body mass index ( $p < 0.0005$ ). Univariate binary logistic regression showed that higher number of years spent in hometown (OR 1.011 95%CI 1.000–1.023,  $p = 0.043$ ), increased body weight (OR 0.976 95%CI 0.959–0.993,  $p = 0.006$ ) and increased body mass index (OR 0.898 95%CI 0.839–0.961,  $p = 0.002$ ) increase the risk of glioma. However, change of the place residence decreases the risk of glioma (OR 0.327 95%CI 0.147–0.727,  $p = 0.006$ ). Univariate binary logistic regression analysis revealed that individuals with group AB were at 3.5-fold increased risk of developing glioma compared to individuals with other ABO blood groups (OR 3,429 95%CI 1,83-6,41,  $p < 0.0005$ ) Also, there was more male patients with glioma with group AB ( $p = 0.001$ ).

**Conclusion.** In a present study, we demonstrate that individuals with group AB have a increased risk of developing glioma.

**Key words:** glioma, blood groups, risk factors



## Apstrakt

**Uvod/Cilj:** Gliomi su najčešći primarni tumori mozga čija je etiologija nepoznata. Cilj ove studije je bio da ispita da li je učestalost glioma povezana sa određenom krvnom grupom.

**Metod:** Slučaj kontrola studija je uključila 100 ispitanika sa patohistološki potvrđenim gliomom u Kliničkom centru Kragujevac, u Srbiji, između 2014. i 2015. godine i 200 ispitanika kontrolne grupe ukrštenih po polu i godinama koji nisu imali istoriju malignih bolesti u ličnoj i porodičnoj anamnezi. Nakon potpisivanja pristanka svi pacijenti su popunjavali epidemiološki upitnik.

**Rezultati:** U analizi, u kojoj su upoređivani pacijenti sa gliomom i pacijenti kontrolne grupe, značajna veza ( $p < 0.005$ ) opservirana je za AB krvnu grupu. Nadalje, nije zapažena statistički značajna veza za krvnu grupu A ( $p = 0.070$ ), B ( $p = 0.256$ ) i O ( $p = 0.768$ ) između poređenih grupa. Poređenjem pacijenata sa gliomom i pacijenata kontrolne grupe, opservirana je statistički značajna veza u vezi godina života provedenih u mestu rođenja ( $p = 0.035$ ), promeni mesta boravka ( $p = 0.007$ ), telesne mase ( $p = 0.002$ ) i indeksa telesne mase ( $p < 0.0005$ ). Primenom univarijantne binarne logističke regresije pokazano je da veći broj godina života provedenih u mestu rođenja (OR 1.011 95%CI 1.000–1.023,  $p = 0.043$ ), povećana telesna masa (OR 0.976 95%CI 0.959–0.993,  $p = 0.006$ ) i povećan indeks telesne mase (OR 0.898 95%CI 0.839–0.961) povećavaju rizik za nastanak glioma. Međutim, promena mesta boravka smanjuje rizik za nastanak glioma (OR 0.327 95%CI 0.147–0.727,  $p = 0.006$ ). Primenom univarijantne binarne logističke regresije se otkriva da kod individua sa krvnom grupom AB postoji 3.5 puta veći rizik za nastanak glioma u poređenju sa osobama sa drugim krvnim grupama (OR 3.429 95%CI 1.83–6.41,  $p < 0.0005$ ). Takođe, bilo je više pacijenata muškog pola sa gliomom koji su imali krvnu grupu AB ( $p = 0.001$ ).

**Zaključak:** Ova studija, pokazuje da kod individua sa krvnom grupom AB postoji povećan rizik za nastanak glioma.

**Ključne reči:** gliomi, krvne grupe, faktori rizika

## **Introduction**

Gliomas are the most common primary brain tumors (1). They accounts for approximately 27% of all brain and central nervous system tumors and about 80% of malignant brain tumors. Glioma are tumors arising from glial or precursor cells and include astrocytoma, glioblastoma, oligodendroglioma, ependymoma, mixed glioma, malignant glioma, not otherwise specified (NOS) and few rare histologies (2).

The etiology of glioma is unknown. Several possible risk factors for glioma have been suggested in the past, but with the exception of ionizing radiation, none has been consistently confirmed (3,4). Several studies have investigated the relationship between blood groups ABO and glioma risk and demonstrated conflicting results (5, 6, 7, 8, 9, 10). The scientist Landsteiner found the blood group ABO system in 1901 in the University of Vienna. Locus ABO is localized on chromosome 9 and gene ABO is inherited in an autosomal dominant (11). The A and B antigens are complex carbohydrate molecule and they represent extracellular domains on the surface membrane of red blood cells. The A and B alleles of the ABO locus encode different enzyme glycosyltransferases, adding N-acetylgalactosamine and D-galactose on a common precursor of the side chain, the H determinant, which is then converted into the A or B antigen. Group O individuals lack such functional enzymes, and express unchanged H determinant. In addition to the surface of red blood cells, A and B antigens are found on a variety of human cells and tissues, including epithelial cells, neurons, platelets and vascular endothelium (12, 13).

Distribution of the four different blood groups varies between countries. Generally, blood group O has highest prevalence, while blood group AB has the lowest (14). In Serbia, the proportion of ABO blood groups is 41.5% for A, 37.5% for O, 16% for B and about 5.5% for AB (15).

The aim of this study was to examine incidence of glioma in patients with different blood groups ABO.

## **Materials and methods**

The study group included a series of 100 consecutive patients (59 males, mean age  $59.76 \pm 10.76$  years and 41 females, mean age  $58.36 \pm 8.95$  years) (Table 1) with pathohistologically verified diagnosis of glioma according to the WHO criteria [ICD-O-3] (16) (Fig 1.). Of these 100 patients blood groups were available in 96 patients. The study was realized according to the Declaration of Helsinki and performed in accordance with Ethics Committee of Clinical Center Kragujevac. The criteria for inclusion into the study were patients who have had consultative decision evaluated on the basis of stages of the disease and the general condition of the patient. Also the criteria for inclusion into the study were primary, previously untreated glioma. Criteria for exclusion from the study were previously diagnosed and treated glioma and glioma recidivans. The patients were treated surgically, followed by radio and chemotherapy at the Center for Oncology, Clinical Center Kragujevac. Data were collected between April 2015 and May 2016. The control group included 200 patients matched by sex and age (109 males, mean age  $59.32 \pm 10.71$  years and 91 females, mean age  $58.09 \pm 9.12$  years) (Table 1) who were hospitalized in the Clinical centre Kragujevac, without malignant diseases in personal and family history. Of these 200 patients blood group were available in 172 patients. After obtaining patient consent, a questionnaire based on the reviewed literature data and personal considerations was to collect detailed information. It included questions about different factors supposed to be possible risk or protective factors.

The first part of the questionnaire referred to demographic features of the patients (sex, age, birth and residency places, blood type, Rh (D) antigen, school education, occupation, number of family members, the size of the home space). The second part of the questionnaire included the family history of chronic diseases, including brain tumors and other malignant tumors. The third part of the questionnaire referred to the personal history of the disease including reproductive risk factors. The fourth part deals with information on the risks of exposure to external factors, the fifth included data on habits (smoking, drinking coffee, tea, alcohol) and the sixth part referred to information about nutrition.

## **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using the SPSS software version 19.0. For the comparison qualitative variables between the patients with glioma and the control group was used chi-square test. Categorical variables were presented as frequencies and percentages. A univariate analysis using logistic regression techniques, including odds ratio (OR), was performed to determine the effects of blood groups on the depend variable (glioma). P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## **Results**

Table 1 shows the demographic and personal characteristic of patients and controls. Differences in years spent in hometown between study and control group was statistically significant ( $p=0.035$ ). The control group patients were more frequently changing of the place residence than patients with glioma ( $p=0.007$ ). Also, observed statistically significant difference between compared group in relation to the body weight ( $p=0.002$ ) and to the body mass index ( $p < 0.0005$ ). Patients with glioma had a higher body weight and higher body mass index in comparison to the patients of the control group.

In an analysis comparing patients with glioma with control group patients, a significant association ( $p < 0.005$ ) was observed in relation to the blood group AB. Furthermore, no significant association was observed in relation to the blood group A ( $p=0.070$ ), blood group B ( $p=0.256$ ), blood group O ( $p=0.768$ ) among patients with glioma and control groups (Table 2).

In the group of patients with glioma, 32.3% of patients had blood type AB, 25.0% of blood group A, 10.4% blood group B and 32.3% of blood group O. The ratios of blood groups AB, A, B and O were 12.2% vs. 32.6% vs. 18.5% vs. 34.9% in patients control group, respectively (Table 2).

Comparing the male patients with glioma and control group as blood groups ABO, a significant association was observed in relation to the blood group AB ( $p=0.001$ ). There was no significant difference regarding blood group A ( $p=0.726$ ), blood group B ( $p=0.668$ ), blood group O ( $p=0.726$ ) (Table 3).

Comparing the female patients with glioma and control group as blood group AB, differences did not rich significant there ( $p=0.057$ ). Also, there was no significant

difference regarding blood group A ( $p=0.288$ ), blood group B ( $p=0.549$ ) and blood group O ( $p=0.522$ ) (Table 4).

Univariate binary logistic regression showed that higher number years spent in hometown (OR 1.011 95%CI 1.000–1.023,  $p=0.043$ ) increased body weight (0.976 95%CI 0.959 – 0.993) and increased body mass index (OR 0.898 95%CI 0.839– 0.961) increases the risk of glioma. However, change of the place residence decreases the risk of glioma about three times (OR 0.327 95%CI 0.147 – 0.727,  $p=0.006$ ) (Table 5).

Univariate binary logistic regression analysis revealed that individuals with group AB were at 3.5-fold increased risk of developing glioma compared to individuals with other blood groups (OR 3.429 95%CI 1.834 – 6.411,  $p<0.0005$ ). Blood groups A (OR 0.696 95%CI 0.402-1.204,  $p=0.195$ ), B (OR 0.690 95%CI 0.321-1.485,  $p=0.343$ ), O (OR 1.064 95%CI 0.632-1.792,  $p=0.816$ ) were not significantly associated with glioma risk (Table 5).

## **Discussion**

In our study, we have demonstrated that the distribution of blood groups in patients with glioma differ significantly than the control group, with a higher incidence of glioma reported in individuals with blood group AB. Previous studies have shown different results about the ratios of blood groups in patients with glioma. The study of Yates and Pearce, which was conducted on 473 cases with astrocytoma excluding glioblastoma multiforme, showed that in 164 patients who were diagnosed before 1945 year, distribution of blood groups was normal. In 305 patients analyzed after that year, a statistically significantly lower number of glioma in patients with blood group O has been noticed (5). Selvestrone et al. have also examined the relationship between the blood groups and astrocytic brain tumors, including glioblastoma multiforme, and they found a statistically significantly lower number of patients with B and O blood types (6). The study of Carter et al. recruited 160 patients with glioma and the same number of controls, observed no significant difference in the distribution of blood groups between glioma patients and controls from the Oxford region in the United Kingdom (7). Strang et al. did not detected significant difference in the distribution of blood group between 900 astrocytoma patients and the control population. However, once adjusted for sex, there was significantly more male cerebral astrocytoma patients with group A ( $p< 0.05$ ) (8). In the last meta-analysis (11) which examined the relationship between blood groups and cancer risk were included 89 studies (82 case control studies and 7 cohort studies). This study analyzed 1674 patients

with glioma and results suggested that blood groups were not significantly associated with glioma risk (9). In a recent study, Allouh et al. reported a significant association between the distribution of blood group ABO antigens and glioblastoma multiforme in Jordanians, with a higher incidence reported in persons with blood group A (10).

In the last five decades, relationship between blood groups ABO and carcinoma has been extensively investigated.

Mechanisms that explain the relationship between blood groups ABO and cancer risk are unclear. Several hypotheses have been proposed, including a modulatory role of blood group ABO antigens. Blood group antigens (A, B) are expressed on the surface of red blood cells and numerous other tissues. For a variety of tumor types, the blood group antigens expressed on the surface of malignant cells was found to be different from the antigens expressed on normal cells (17). Modified expression of blood group antigens on the surface of cancer cells may alter cell motility, sensitivity to apoptosis and immune escape, and thus influence the initiation and spread of cancer (18). Also, blood group ABO system regulate the level of circulating proinflammatory and adhesion molecules (such as E-selectin, P-selectin and intracellular adhesion molecule-1), which are important for tumorigenesis. Chronic inflammation has been extensively linked with cancer development and provides a potential mechanisms by which ABO antigens may influence cancer risk. One of the possible explanations about the role of the blood group ABO in tumorigenesis process is the recent discovery of vWF that is an important modulator of angiogenesis and apoptosis. Individuals with other blood groups have significantly higher levels of plasma concentrations of vWF compared to individuals with blood group O. On the other hand, vWF may not have a significant role in cancer progression, and elevated vWF levels simply be an indication of the extent of endothelial dysfunction caused by tumor growth (19). Some research have shown that the structure of certain tumor antigens is similar to the structure of antigens of ABO blood group system. For example, Smith and Prieto presented Forssmann antigen. This antigen is synthesized predominantly in stomach and colon cancer and structurally it is identical to the A antigen determinant (20). One study found neoexpression of ABO blood group antigens in hepatocellular carcinoma tissues (21). These mechanisms are biologically plausible to explain the association between ABO blood group and risk of cancer, the underlying mechanisms for the discrepancy among different cancer sites still remains a challenge.

Also, our results suggested that change of place residence decreases risk of glioma and that higher number years spent in hometown increases the risk of glioma. Until now, there have been no studies that have examined the relationship between the change of the place residence and number years spent in hometown and risk of glioma. In this case control study, increased body weight and increased body mass index increases risk of glioma. Our findings on body weight and body mass index and glioma risk are similar to previous study (22, 23, 24).

### **Conclusion**

To our knowledge, this is the first study that has examined the frequency of blood group in patients with glioma among the Serbian population. Also, for the first time our study results suggest that blood group AB increases the risk of glioma.

The results of our study suggest that the blood group AB can be one of hereditary factors which have a influence on the occurrence of glioma. It is need the further research on a much larger sample, which would confirm these findings as well as potential mechanisms by which the blood group ABO system affects the occurrence of glioma.

### **Disclosure**

The authors report no conflict of interes.

Table 1 Demographic and personal characteristic of patients and controls

Variable	Patients with glioma (n=100)	Control group (n=200)	p-value
Age±SD (years)			
Male	59.76±10.76	59.32±10.71	0.779
Female	58.36±8.95	58.09±9.12	0.876
Sex, n (%)			
Male	59 (59%)	109 (54.5%)	0.537
Female	41 (41%)	91 (45.5%)	0.537
Years spent in hometown	47.39 ±20.94	41.69 ±23.45	0.035
Change of the place residence	8 (8%)	42 (21%)	0.007
Birth weight (kg)	3.14 ±0.57	3.63 ±3.01	0.108
Body weight (kg)	82.88 ±12.64	77.23 ±17.04	0.002
Body height (cm)	172.84 ±7.62	173.09 ±9.65	0.813
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.57 ±5.01	25.72 ±3.30	< 0.0005
Rh factor (-)	8 (8%)	25 (12.5%)	0.921

Table 2 Comparison of blood groups between patients with glioma and control group.

Groups	Patients with glioma	Control groups	P value
AB Group	31 (32.3%)	21 (12.2%)	<0.0005
A Group	24 (25.0%)	63 (36.6%)	0.070
B Group	10 (10.4%)	28 (16.3%)	0.256
O Group	31 (32.3%)	60 (34.9%)	0.768
Total	96 (100%)	172 (100%)	



Table 3 Distribution of blood groups in male patients with glioma and control group

Groups	Patients with glioma	Control group	P value
AB Group	18 (31.6%)	8 (8.7%)	0.001
A Group	14 (24.6%)	30 (32.6%)	0.726
B Group	7 (12.3%)	17 (18.5%)	0.668
O group	18 (31.6%)	37 (40.2%)	0.726
Total	57 (100%)	92 (100%)	

Table 4 Distribution of blood groups in female patients with glioma and control group

Groups	Patients with glioma /female/	Control group /female/	P value
AB Group	13 (33.3%)	13 (16.3%)	0.057
A Group	10 (25.6%)	33 (41.3%)	0.288
B Group	3 (7.7%)	11 (13.8%)	0.549
O group	13 (33.3%)	23 (28.8%)	0.522
Total	39 (100%)	80 (100%)	

Table 5 Univariate regression analysis of the relationship between demographic features, ABO blood group and glioma

Variable	Odds ratio (95% CI)	p-value
Age	1.004 (0.980 – 1.029)	0.728
sex	0.832 (0.512 – 1.353)	0.495
Years spent in hometown	1.011 (1.000 – 1.023)	0.043
Change of the place residence	0.327 (0.147 – 0.727)	0.006
Birth weight	0.590 (0.317 – 1.101)	0.097
Body weight (kg)	0.976 (0.959 – 0.993)	0.006
Body height (cm)	0.997 (0.970 – 1.025)	0.826
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.898 (0.839 – 0.961)	0.002
Rh factor (-)	1.104 (0.857 – 1.423)	0.442
Blood group AB	3.429 (1.834 – 6.411)	< 0.0005
Blood group A	0.696 (0.402-1.204)	0.195
Blood group B	0.690 (0.321-1.485)	0.343
Blood group O	1.064 (0.632-1.792)	0.816

## REFERENCES 12849

1. *Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, et al.* The epidemiology of glioma in adults: A "state of the science" review. *Neuro Oncol* 2014; 16(7): 896–913.
2. *Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol* 2015; 17 Suppl 4: iv1–iv62.
3. *Malmer B, Adatto P, Armstrong G, Barnholtz-Sloan J, Bernstein JL, Claus E, et al.* GLIOGENE an International Consortium to Understand Familial Glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(9): 1730–4.
4. *Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, et al.* Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 2008; 113(7 Suppl): 1953–68.
5. *Yates PO, Pearce KM.* Recent change in blood-group distribution of astrocytomas. *Lancet* 1960; 1(7117): 194–5.
6. *Selvestrone B, Cooper DR.* ABO blood group and astrocytomas. *J Neurosurg* 1961; 18: 602–4.
7. *Yates PO.* Malignant glioma and ABO blood group. *Br Med J* 1964; 1(5378): 310.
8. *Strang RR, Tovi D, Lopez J.* Astrocytomas and the ABO blood groups. *J Med Genet* 1966; 3: 274–5.
9. *Akhtar K, Mehdi G, Sherwani R, Sofi L.* Relationship between various cancers and ABO blood groups: A Northern India experience. *Int J Pathol* 2010; 13(1): 1–4.
10. *Akca Z, Mutlu H, Erden A, Buyukcelik A, Sezer Y, Inal A.* The relationship between ABO blood group and glioblastoma multiforme. *Med Sci* 2014; 3(4): 1639–47.
11. *Zhang B, He N, Huang Y, Song F, Chen K.* ABO blood groups and risk of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(11): 4643–50.

12. *Allouh MZ, Barbarawi AM, Hiasat MY, Al-Qaralleh MA, Ababneh EI.* Glioblastoma and ABO blood groups: Further evidence of an association between the distribution of blood group antigens and brain tumours. *Blood Transfus* 2017; 15(6): 543–7.
13. *Landsteiner K.* Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. In: *Harper PS*, editor. *Landmarks in Medical Genetics*. Oxford: Oxford University Press; 1901. p. 112–4.
14. *Franchini M, Liumbruno GM.* ABO blood group: Old dogma, new perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(8): 1545–53.
15. *Liumbruno GM, Franchini M.* Beyond immunohaematology: The role of the ABO blood group in human diseases. *Blood Transfus* 2013; 11(4): 491–9.
16. *Hsiao L, Liu N, You S, Hwang L.* ABO blood group and the risk of cancer among middle-aged people in Taiwan. *Asia Pac J Clin Oncol* 2015; 11(4): e31–6.
17. *Jovanović SS, Veljković DK.* *Imunobioloski i klinicki znacaj krvnih grupa*. Beograd: Intra Net Communication; 2009.
18. *Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK*, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6): 803–20.
19. *Franchini M, Lippi G.* The intriguing relationship between the ABO blood group, cardiovascular disease, and cancer. *BMC Med* 2015; 13: 7.

Received on December 30, 2016.  
Revised on March 24, 2017.  
Accepted on July 06, 2017.  
Online First September, 2017.

# CANNABIS AS A POSSIBLE TREATMENT FOR SPASTICITY IN MULTIPLE SCLEROSIS

Katarina Vesic<sup>1,2</sup>, Slavica Djukic Dejanovic<sup>3,4</sup>, Milica Borovcanin<sup>3,4</sup>, Janko Samardzic<sup>5</sup> and Gordana Toncev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Clinic of Neurology, Clinical Centre Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Department of Neurology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Clinic for Psychiatric Illnesses "Dr Laza Lazarevic", Belgrade, Serbia

<sup>4</sup> Department of Psychiatry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>5</sup> Psychiatric Clinic, Clinical Centre Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>6</sup> Institute of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

## KANABIS KAO MOGUĆI TRETMAN U LE ENJU SPASTIČNOSTI KOD MULTIPLE SKLEROZE

Katarina Vesic<sup>1,2</sup>, Slavica Djukic Dejanovic<sup>3,4</sup>, Milica Borovcanin<sup>3,4</sup>, Janko Samardzic<sup>5</sup> i Gordana Toncev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Klinika za neurologiju, Klinički centar Kragujevac, Kragujevac, Srbija

<sup>2</sup> Katedra za neurologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

<sup>3</sup> Klinika za psihijatrijske bolesti "Dr Laza Lazarević", Beograd, Srbija

<sup>4</sup> Katedra za psihijatriju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija

<sup>5</sup> Klinika za psihijatriju, Klinički centar Kragujevac, Srbija

<sup>6</sup> Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Received / Priljen: 04.03.2015

Accepted / Prihvaćen: 14.05.2015

### ABSTRACT

The therapeutic potential of cannabis has been known for centuries. Cannabinoids express their effects through two types of receptors, cannabinoid receptor 1 (CB1) and cannabinoid receptor 2 (CB2). Present studies indicate that cannabis-based drugs can make a positive impact in the treatment of different diseases. For many years, multiple sclerosis patients have self-medicated with illegal street cannabis to alleviate spasticity, a common and debilitating symptom that impairs quality of life.

Nabiximols is the cannabis-based medicine approved in many countries as an add-on therapy for symptom improvement in patients with spasticity who have not responded adequately to other medications. Adverse events such as dizziness, diarrhoea, fatigue, nausea, headache and somnolence occur quite frequently with nabiximols, but they are generally of mild-to-moderate intensity and their incidence can be markedly reduced by gradual up-titration. The prerequisite for the therapeutic use of cannabis in Serbia requires legal clarification for the use of the drug in a clinical environment.

**Keywords:** cannabis, multiple sclerosis, spasticity, nabiximols

### SAŽETAK

Vekovima unazad je poznato da kanabis ima terapijski potencijal. Kanabinoidi ispoljavaju svoje efekte vezuju i se za dve vrste receptora, kanabinoid receptor 1 (CB1) i kanabinoid receptor 2 (CB2). Dosadašnje studije su pokazale da lekovi bazirani na kanabisu mogu imati značajnu ulogu u lečenju mnogih bolesti. Godinama unazad, oboleli od multiple skleroze samoinicijativno, ilegalno koriste kanabis za ublažavanje spastičnosti. Spastičnost je jedan od najčešćih simptoma bolesti koji dovodi do nastanka invaliditeta i može značajno uticati na kvalitet života.

Nabiximol je lek od kanabinoida biljnog porekla koji je danas u mnogim zemljama, zvanično odobren za lečenje spastičnosti kod multiple skleroze. Indikovano je kod pacijenata kod kojih druge terapijske opcije nisu dale zadovoljavajuće rezultate.

Neželjeni efekti nabiximola kao što su vrtoglavica, dijareja, umor, mučnina, glavobolja i pospanost su česti, ali blagog do umerenog intenziteta, a njihova učestalost se smanjuje postepenom titracijom doze leka. Osnovni preduslov za terapijsku upotrebu kanabisa u našoj zemlji je promena postojećih zakonskih okvira.

**Ključne reči:** kanabis, multipla skleroza, spastičnost, nabiximol.

### ABBREVIATIONS

**CB1**-Cannabinoid receptor 1  
**CB2**-Cannabinoid receptor 2  
**CBD**-Cannabidiol

**FDA**-Food and Drug Administration  
**HIV**-Human immunodeficiency virus  
**THC**-Tetrahydrocannabinol



UDK: 615.212.7.076 / Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (1): 61-66  
DOI: 10.1515/SJECR 2015 0047

Corresponding author: Katarina Vesic, MD

Clinic of Neurology, Clinical Center Kragujevac, Zmaj Jovina 30, 34 000 Kragujevac  
Tel: 0607129294; Fax: 034370166; E-mail: stojanovick@yahoo.



## Cannabis consumption throughout the centuries

Medications derived from cannabis have been used for therapeutic purposes for centuries. In ancient Greece, Rome, China and India, cannabis was used to ameliorate muscle spasms, cramps and pain (1). At the end of the 19th century in Europe, cannabis was used for the treatment of pain, asthma, sleep disorders, depression, and loss of appetite (2). Until Before 1964, scientists were unable to establish the chemical structure of the essential ingredient of the cannabis plant, but after the principal active ingredient of cannabis was defined as trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) (3), an Currently extensive literature on the effects of cannabis-based compounds in clinical studies and animal models has been developed.

## Cannabinoid receptors and endocannabinoids

Cannabis-based medications have been the subject of intense research since the endogenous cannabinoid system was discovered more than twenty years ago (4, 5). Two principal types of receptors have been found to be part of the endocannabinoid system. Cannabinoid receptor 1 (CB1), predominantly located in the terminals of nerve cells (central and peripheral neurons and glial cells), the reproductive system, some glandular systems and the microcirculation, was identified in 1990 (4). Three years later, cannabinoid receptor 2 (CB2) was found initially in multiple lymphoid organs with the highest expression detected in B lymphocytes, moderate expression in monocytes and polymorph nuclear neutrophils and the lowest expression in T lymphocytes; subsequent studies have identified them in microglial cells (5, 6). The highest distribution of cannabinoid receptors was found in the hippocampus, the basal ganglia, and the cerebellum, areas associated predominantly with memory and motor coordination (7). Cannabinoid receptors also occur in high density in many areas related to pain, such as the periaqueductal grey mass, the rostral ventrolateral medulla, and superficial layers of the spinal dorsal horn. They are also found in the dorsal root ganglion, from which they are transported to both central and peripheral terminals of primary afferent neurons (8, 9, 10). These discoveries consequently lead to the identification of natural ligands for the CB1 receptor: arachidonoylethanolamide, named anandamide, and 2- arachidonoylglycerol (11).

As reviewed by Wegener and Koch in 2009 (12), CB1 receptors are expressed in the presynaptic membrane of neurons, and they utilize a negative feedback mechanism to regulate transmitter release at GABAergic, glutamatergic and dopaminergic synapses. Cellular activity of the postsynaptic neuron promotes continuous synthesis and release of the endocannabinoids from phospholipids of the cell membrane, which then bind to the CB1 receptors in the presynaptic membrane. Stimulation of the CB1 receptors blocks the activity of the presynaptic neurons through activation of A-type potassium channels and potassium

inward rectifiers and through the inhibition of voltage-dependent calcium channels and adenylate cyclase. The outcomes are reduced transmitter release in the presynaptic terminals and reduced cellular excitability.

The endocannabinoid effect is regulated through the transport of endocannabinoids into the cell via specific transporters and subsequent degradation through the membrane-bound enzyme fatty acid hydrolase. (13).

## Therapeutic potential of cannabis

Cannabis preparations exerts numerous therapeutic effects, and the augmentation of cannabinergic tone is therapeutically beneficial in the treatment of multiple disease states (14). Numerous studies, most of them carried out in the 1970s and 1980s, have demonstrated that cannabinoids are equally or more effective in treating chemotherapy-related nausea and vomiting as the standard antiemetics (15, 16, 17). Some studies have shown that cannabis is effective in the treatment of anorexia and cachexia in patients with human immunodeficiency virus (HIV) (18), tumours (19) and Alzheimer's disease (20), as well as in the treatment of chronic neuropathic pain and multiple sclerosis (21,22). However, cannabis may be ineffective in treating patients with acute pain (23). Small randomized controlled trials have shown a positive effect of cannabis preparations in the treatment of tics in Tourette syndrome (24) and levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (25).

## Cannabis treatment of spasticity in multiple sclerosis

Spasticity is a consequence of a damaged corticospinal tract, which plays a role in controlling voluntary movements (26). Therefore, it is characterized by sudden involuntary movements, muscle stiffness, or muscle spasm sufficient to cause pain, particularly in the lower back and legs. Spasticity, and it can result in difficulty moving the limb at all. This condition is often associated with spinal cord injury, amyotrophic lateral sclerosis, cerebral palsy and brain damage (27).

Cannabis preparation has been discussed as a promising agent in multiple sclerosis treatment, particularly for spasticity. Spasticity is the most commonly reported symptom, occurring in 90% of patients, causing significant disability and quality of life impairment. Spasticity may also contribute, directly or indirectly, to hroughother symptoms of multiple sclerosis, such as bladder or bowel dysfunction (28), and it can be associated with pain, weakness, clonus, sleep disturbance, fatigue and loss of dexterity (29). At worst, severe spasticity can lead to complete immobility (30). Prolonged immobility may lead to pressure sores and thromboembolism (31).

Standard drugs used to treat spasticity include centrally acting agents, such as benzodiazepines, baclofen, tizanidine and gabapentin, and peripherally acting agents such as dantrolene (29, 32). There is a very limited evidence



base for these drugs, and they provide **only moderate relief** from spasticity (33). Because many patients are refractory to treatment with existing oral drugs (29, 32, 33), there is a clear need for new treatments for spasticity in multiple sclerosis.

Demographic evidence has shown that many people with multiple sclerosis use cannabis for self-medication (34). The antispastic effect of cannabis has been supported through a demonstration of the inhibitory properties in exogenous agonists for cannabis receptors found in the central nervous system (35). Stimulation of CB1 receptors by cannabis-based drugs have the potential to regulate aberrant levels of glutamatergic excitability during spasticity (36). The endocannabinoid system is upregulated in lesioned areas to provide further control of aberrant neurotransmission, suggesting that further enhancement of endocannabinoid tone by stimulating endocannabinoid synthesis or blockade of endocannabinoid degradation may exhibit anti-spastic activity. CB1 receptors in the basal ganglia are probably the target for cannabinoid control of tremor, spasticity, and painful muscle spasms in multiple sclerosis. CB1 is densely expressed in the output neurons of the substantia nigra, pars reticulata and globus pallidus (37). Activation of CB1 within these neurons can suppress excessive motor output and consequent muscle spasm (38). Cannabinoids can reduce chronic pain, one symptom of multiple sclerosis, but in this case, it is clinically important that cannabinoids can also reduce pain which is a consequence of muscle spasm (38).

#### **Available cannabinoid-based medication for spasticity**

For patients with multiple sclerosis, nabiximols is the first cannabis-based medicine to be licensed for the treatment of symptoms (39). The drug is a pharmaceutical product standardised in composition, formulation and dose. Nabiximols differs from all other pharmaceutically produced cannabinoids currently available because it is a mixture of compounds. Its principal active cannabinoid components are the cannabinoids tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) (Figure 1).

Although there is considerable structural overlap between THC and CBD, their conformational structures differ significantly. As a result of this, CBD does not bind to or activate the CB1 receptor, which leads to a complete lack of psychoactivity by CBD, unlike THC, which is the psychoactive principle of cannabis. However, CBD shows significant pharmacological activity, such as anti-inflammatory and immunomodulatory effects, that appear to be mediated by the adenosine A2A receptors and could possibly influence the progression of the illness (40). Finally, it has been suggested that the combination of CBD and THC shows a better therapeutic profile than each cannabinoid component alone, with a lower predominance of unwanted, adverse side effects (41). Smoking cannabis achieves the fastest absorption, and the effects are mani-

fested in a few minutes. Inhalation of 8 mg of THC results in a 24 times faster achievement of peak blood concentrations than 0 msublingual administration of 10 mg of THC. When inhaled, this peak is achieved in 17 minutes when inhaled, and in 263 minutes when ingested sublingual (37).

Nabiximols is formulated as an oromuscular spray which is administered by spraying into the mouth. Each spray delivers a near 1:1 ratio of CBD to THC, with fixed a dose of 2.7 mg THC and 2.5 mg CBD (42). An essential part of the therapeutic use of the drug is that it is patient-directed and dose-optimized through self-titration. The titration period may take up to 2 weeks to find the optimal dose. On the first day of the titration period, one spray in the morning and one spray in the afternoon/evening should be administered. This dosage should be increased by one spray each day depending on efficacy and adverse effects. The average effective dose is 8-9 sprays per day, up to a maximum of 24 sprays per day (43).

Among all tested analogues, such as oral formulations Dronabinol and Nabilone, it has been concluded that only sublingual spray nabiximols has a sufficient evidence base to justify its use in the treatment of spasticity to improve patient quality of life, particularly in patients who are refractory to current treatments (44).

#### **Indications and contraindications for use of nabiximols**

Nabiximols is registered for the relief of spasticity, tremor and pain in patients with multiple sclerosis who have not responded sufficiently to standard medication and who show a worthwhile degree of improvement during a 4-week trial period (44). It is contraindicated in patients with known or suspected allergies to cannabinoids or any of the other ingredients and for patients with severe psychiatric disorders other than illness-associated depression. Use is not advised for nursing mothers, they are adolescents or children under 18 or elderly patients (44).

#### **Adverse effects of nabiximols**

Because cannabis is a restricted drug, the use of cannabis for medical purposes inevitably raises a number of problems such as possible intoxication and neurotoxicity, the development of tolerance and dependence, as well as legal and ethical dilemmas. Using cannabis for medicinal purposes and the use of marijuana and hashish, which are derivatives of cannabis and are used as forbidden "soft" drugs, should not be equated. Many psychological effects of cannabis and THC are biphasic and bidirectional, depending upon the modality of administration, dosage, individual variability, the degree of tolerance, as well as other environmental factors (45). Acute effects can range from euphoria, relaxation, excitation, sharpened perception and increased motor activity to sedation, distortions of perception, ataxia, and loss of coordination (6). In larger doses,



cannabis can cause dysphoric reactions, anxiety, panic and hysteria (46). All of these central effects occur only after the activation of CB1 receptors (4).

The optimal doses of CB1 receptor agonism in motor control centres would invariably be associated with stimulation of CB1 receptors in cognitive centres, which could also be associated with some unwanted side effects. Acute exposure could also produce a full range of transient psychotomimetic symptoms that last only during the period of intoxication but also an acute psychosis that lasts longer (47). THC produces the full range of transient, positive psychotomimetic symptoms, negative symptoms and cognitive deficits observed in schizophrenia, while CBD has been shown to have anxiolytic properties and even to inhibit the psychotomimetic effects of THC. Cannabis also produces transient, dose-related cognitive impairments, especially in the domains of verbal learning, short-term memory, working memory, executive function, abstract ability, decision-making and attention. Variable duration to full recovery (absence of persistent neuropsychiatry deficits) has been demonstrated to last from a week to an average of 2 years of abstinence (47).

The safety profile of nabiximols, in randomized studies, conducted on patients suffering from multiple sclerosis, indicates that the drug is well tolerated and the most common side effects are dizziness, fatigue, nausea, diarrhoea, drowsiness, headache and somnolence (48).

There is no evidence that nabiximols causes intoxication, cognitive impairments or any of the other central side effects commonly associated with recreational use. The reason for this may be the presence of cannabidiol in nabiximols, which is not psychotropic and may reduce THC levels in the brain and attenuate its psychotropic side effects (49, 50). All cannabinoids in current therapeutic use have a therapeutic index that is relatively narrow for most uses, with adverse effects limiting dose titration. Under everyday clinical practice conditions, nabiximols at a mean daily dose of <7 sprays in has been shown to relieve spasticity in approximately 70% of patients previously resistant to treatment. In large observational studies, >80% of patients reported no adverse events. Subjectivity of the spasticity assessment and coexistence of other symptoms in patients with multiple sclerosis must be taken into account as a serious obstacle when evaluations of drug efficacy are conducted. (51). Further limitations in designing adequate comparative studies that cannot be ignored are the legal aspects of psychotropic drug use and the possible influence of pharmaceutical companies.

### Regulation of cannabis use in different countries

There is no unified position regarding the use of cannabis and its analogues, from full legalization and free traffic, through legislation or controlled traffic to a complete ban. In June 2010, the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency of the United Kingdom licensed nabiximols as a prescription-only medicine for the treatment of

spasticity due to multiple sclerosis (52). This regulatory authorization represents the world's first full regulatory approval for the medicine. Currently, the drug is available for medical use in the United Kingdom, Spain, the Czech Republic, Germany, Denmark, the Netherlands, Sweden, Italy, Austria, Norway, Iceland, Poland, Finland, Switzerland, France, and in some countries in Asia and in Israel (52). In the USA, nabiximols is not officially approved by the FDA for the treatment of spasticity in multiple sclerosis (53, 54). In countries where the medical use of cannabis is approved, there are legally defined conditions for the cultivation of cannabis. For example, in England and the Netherlands, cannabis is grown with the permission of the Government under strictly controlled conditions (55).

If it is in use, there are strictly defined indication areas in which it can be used, and cannabis can be obtained for medical use only by physician prescription. In Serbia, according to the existing legislation, possession, production and trade of marijuana is illegal (56). Laws provide for the strict distribution of cannabis for therapeutic use. Cannabis is available only issued by prescription and to doctors and specialists and only after a clear indication of how it will be used. Also it is necessary to define who can grow cannabis and under which conditions it can be produced and distributed. The eventual formation of a user registry is a priority. Regardless of the dilemmas that exist regarding the legislation of marijuana, patients have a right to all beneficial treatments and to deny them access to treatments violates their basic human rights. Therefore, it is necessary to harmonize the scientific, clinical knowledge and national legislative opinions to provide proper use of this psychotropic substance. Considering all of the positive findings, regulatory bodies and the Ministry of Health in Serbia are trying to initiate discussion and establish a legal environment for the use of this compound.

### Concluding remarks

Cannabis preparations have been used to relieve nausea, improve appetite and reduce pain for thousands of years. The development of synthetic drugs in the 20th century supplanted these and herbal remedies, but in the past several decades there has been a resurgence of interest in using cannabis and cannabinoid preparations for medical purposes. There is evidence from controlled trials that cannabinoids are effective in relieving nausea and vomiting, alleviating acute pain and improving appetite in people with HIV-related disorders. The potential role of cannabinoids in the treatment of spasticity in multiple sclerosis was highly controversial following the publication of initial studies. Most of the clinical trials conducted in recent years have shown that nabiximols is a useful treatment option for its approved indication, treating spasticity in multiple sclerosis. Apart from reducing spasticity, nabiximols also offers moderate relief of pain associated with muscle spasm and also with centrally generated neuropathic pain. Quality of life, particularly with respect to





sleep, is improved for patients taking the drug, and urinary incontinence is moderately reduced (57). The pharmacoeconomical aspects also favour this therapeutic option because a lower severity of spasticity can lead to reduce resource consumption such as psychotherapy and medication. (58) All of the aspects of cannabis use as a treatment of spasticity in multiple sclerosis must be thoroughly discussed in Serbia.

## REFERENCES

1. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006; 28 (2): 153-7.
2. Guy G, Whittle BA, Robson PJ. *Medical Uses of Cannabis and Cannabinoids.* London: Pharmaceutical Press. 2004.
3. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc.* 1964; 86: 1646-1647.
4. Matsuda LA, Bonner TI and Lolait SJ. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol.* 1993; 327: 535-550.
5. Munro S, Thomas KL and Abu-Sharr M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; 365: 61-65.
6. Iversen L. Cannabis and the brain: Review. *Brain.* 2003 Jun; 126 (6): 1252-70.
7. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR and Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* 1991; 11: 563-583.
8. Hohmann AG, Walker JM. Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J Neurophysiol.* 1999; (81): 575-583.
9. Sanudo-Pena MC, Strangman NM, Mackie K, Walker JM and Tsou K. CB1 receptor localization in spinal cord and roots, dorsal root ganglion and peripheral nerve. *Acta Pharmacol Sin.* 1999; (12): 1115-1120.
10. Vaughan VW, Connor M, Bagley EE and Christie MJ. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol.* 2000; (57): 288-295.
11. Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* 2005; Vol.40 (1): 2-14.
12. Wegener N, Koch M. Neurobiology and systems physiology of the endocannabinoid system. *Pharmacopsychiatry* 2009; 42 (1): 79-86
13. Petrosino S., Di Marzo V. FAAH and MAGL inhibitors: therapeutic opportunities from regulating endocannabinoid levels. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11: 51-62.
14. Matthew J. McFarland, Ekaterina A. Terebova and Eric L. Barker. Detergent-Resistant Membrane Microdomains in the Disposition of the Lipid Signaling Molecule Anandamide. 2005 AAPS National Biotechnology Conference Symposium on Lipidomics. 2006: 95-100.
15. Colls BM, Ferry DG, Gray AJ, Harvey VJ, McQueen EG. The antiemetic activity of tetrahydrocannabinol versus metoclopramide and thiethylperazine in patient undergoing cancer chemotherapy. *N Z Med J.* 1980; (91): 449-451.
16. McCabe M, Smith FP, Goldberg D, Macdonald J, Woolley PV, Warren R. Efficacy of tetrahydrocannabinol in patient refractory to standard antiemetic therapy. *Invest New Drugs.* 1988; (6): 243-246.
17. Duran M, Perez E, Abanades S et al. Preliminary efficacy and safety of an oromuscular standardized cannabis extract in chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Br J Clin Pharmacology.* 2010; (70): 656-663.
18. Beal JE, Olson R, Laubenstein L, et al. Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Sympt Manag.* 1995; (10): 89-97.
19. Strasser F, Luftner D, et al. Cannabis in cachexia study group. Comparison of orally administered cannabis extract and delta-9-tetrahydrocannabinol in treating patients with cancer-related anorexia-cachexia syndrome: a multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial from the Cannabis in cachexia study group. *J Clin Oncol.* 2006; (24): 3394-3400.
20. Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ. Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 1997; (12): 913-919.
21. Nurmikko TJ, Serpell MG, Hoggart B, Toomey PJ, Morlion BJ, Haines D. Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pain.* 2007; (133): 210-220.
22. Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, Young CA. Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology.* 2005; (65): 812-819.
23. Seeling W, Kneer L, Buchele B, et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol and the opioid receptor agonist piritramide do not act synergistically in postoperative pain. *Anaesthesist.* 2006; (55): 391-400.
24. Muller-Vahl KR, Schneider U, Prevedel H, et al. 9-tetrahydrocannabinol (THC) is effective in the treatment of tics in Tourette syndrome: a 6-week randomized trial. *J Clin Psychiatry.* 2003; (64): 459-465.
25. Sieradzan KA, Fox SH, Dick J, Brotchie JM. The effects of the cannabinoid receptor agonist nabilone on L-dopa induced dyskinesia in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Movement disorders.* 1998; 13 (Suppl 2).
26. Nielsen JB, Crone C., Hultborn H. The spinal pathophysiology of spasticity - from a basic science point of view. *Acta Physiologica* 2007; 189: 171-180.
27. Rizzo MA, Hadjimichael OC, Preiningerova J, Vollmer TL. Prevalence and treatment of spasticity reported by multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2004; 10 (5): 589-595.



28. Crayton HJ, Rossman HS. *Clinical Therapeutics* 2006; 28 (4): 445-460.
29. Beard S, Humm A, Wight J. Treatments for spasticity and pain in multiple sclerosis: a systematic review. *Health Technol Assess* 2003; 7(40): 101-111.
30. Bhimani R, Anderson L. Clinical understanding of spasticity: implications for practice. *Rehabil Res Pract*. 2014; 2014:279175. doi: 10.1155/2014/279175.
31. Samama MM. An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients: the Sirius study. *Arch Intern Med*. 2000; 160 (22): 415-420.
32. Shakespeare DT, Boggild M, Young C. Anti-spasticity agents for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003; 4:CD001332.
33. Novotna A, Mares J, Ratcliffe S, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols (Sativex), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2011; 2-10.
34. Clark AJ, Ware MA, Yazer E, Murray TJ, Lynch ME. Patterns of cannabis use among patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2004; 62:2098-2100.
35. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG et al. Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *Faseb J*. 2011; 15:300-302.
36. Holmann AG, Herkenham M. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience*. 1999; 90(3): 923-931.
37. Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiology*. 2010; 63(5): 569-611.
38. Baker D., Pryce G., Jackson SJ., Bolton C., Giovannoni G. The biology that underpins the therapeutic potential of cannabis-based medicines for the control of spasticity in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and Related Disorders* 2012; 64: 64-75.
39. Kmietowicz Z. Cannabis based drug is licensed for spasticity in patients with MS. *British Medical Journal* 2010; 340: c 3363.
40. Burstein S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg. Med. Chem*. 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.059>.
41. Russo E. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 163: 1344-1364.
42. Barnes MP. Sativex: clinical efficacy and tolerability in the treatment of symptoms of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Expert Opin Pharmacother*. 2006; 7 (5): 607-15.
43. Collin C, Ehler E, Waberszinek G et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of Sativex, in subject with symptoms of spasticity due to multiple sclerosis. *Neurol Res*. 2010; 32(5): 451-459.
44. Ashton C John. Emerging treatment options for spasticity in multiple sclerosis-clinical utility of cannabinoids. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*. 2011; 15-23.
45. Tkaczyk M, Florek E, Piekoszewski W. Marijuana and cannabinoids as medicaments. *Przegl Lek*. 2012; 69 (10): 1095-97.
46. Iversen L. Long-term effects of exposure to cannabis. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5 (1): 69-72
- Radhakrishnan R., Wilkinson S. and D Souza DC. Gone to pot-a review of the association between cannabis and psychosis. *Frontiers in psychiatry* 2014; 54 (5): 1-24.
47. Radhakrishnan R., Wilkinson S. and D Souza DC. Gone to pot-a review of the association between cannabis and psychosis. *Frontiers in psychiatry* 2014; 54 (5): 1-24.
48. Wang T, Collet JP, Shapiro S, et al. Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *CMAJ*. 2008; 178 (13): 1669-1678.
49. Perez J. Combined cannabinoid therapy via an oromucular spray. *Drugs of Today*. 2006; 42: 495-503.
50. Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Scuderi C, Steardo L. Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders. *CNS Neurosci Ther*. 2009; 15: 65-75.
51. Pozzilli C. Advances in the management of multiple sclerosis spasticity: experiences from recent studies and everyday clinical practice. *Expert Rev Neurother*. 2013; 12: 49-54.
52. [www.mhra.gov.uk](http://www.mhra.gov.uk). Scheduling of the cannabis-based medicine 'Sativex' Accessed in April 2015. Published: 27 March 2013.
53. Barbara S. Koppel, John C.M. Brust, Terry F. Jeff Bronstein, Sarah Youssef, Gary Gronseth and David Gloss. Systematic review: Efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders. *Neurology*. 2014; 82 (17): 1556-1563.
54. Wright S., Yadav V., Bever C Jr et al. Summary of evidence-based guideline: complementary and alternative medicine in multiple sclerosis: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2014; 83 (16): 1484-1486.
55. Potter DJ. A review of the cultivation and processing of cannabis (*Cannabis sativa* L.) for production of prescription medicines in the UK. *Drug Test Anal*. 2014; 6 (1-2): 31-38.
56. [www.zdravlje.gov.rs](http://www.zdravlje.gov.rs) Zakon o psihoaktivnim kontrolisanim supstancama. Sluzbeni glasnik Republike Srbije br.99/10. Accessed in April 2015.
57. Arroyo R, Vila C, Dechant KL. Impact of Sativex® on quality of life and activities of daily living in patients with multiple sclerosis spasticity. *J Comp Eff Res*. 2014; 3(4): 435-44. doi: 10.2217/ce.14.30.
58. Slof I, Gras A. Sativex in multiple sclerosis spasticity: a cost-effectiveness model. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2012; 12 (4): 439-441