



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**КОГНИТИВНИ ПОРЕМЕЋАЈ У МУЛТИПЛОЈ СКЛЕРОЗИ:  
ПОВЕЗАНОСТ СА ИНСУЛИНСКОМ РЕЗИСТЕНЦИЈОМ И  
ПОЛИМОРФИЗМИМА У ГЕНУ ЗА АПОЛИПОПРОТЕИН Е**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Др Смиљана Костић**

**Крагујевац, 2016.**

**Даници са љубављу,**

# Садржај

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. УВОД</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Мултипла склероза- опште поставке                           | 2         |
| 1.1.2 Епидемиологија, етиологија и патогенеза мултипле склерозе | 2         |
| 1.1.3 Клиничка слика, дијагноза и терапија мултипле склерозе    | 6         |
| 1.1.4 Интерферон бета у терапији мултипле склерозе              | 10        |
| 1.2 Когнитивни поремећај у мултиплој склерози                   | 12        |
| 1.3 Аполипопротеин Е  | 14        |
| 1.3.1 АПОЕ у патогенези можданог оштећења                       | 15        |
| 1.3.2 Полиморфизам у гену за АПОЕ и когниција                   | 18        |
| 1.3.3 Полиморфизам у гену за АПОЕ и мултипла склероза           | 18        |
| 1.4. Инсулин и мозак  | 20        |
| 1.4.1 Инсулинска резистенција                                   | 22        |
| 1.4.2 Инсулин и когниција                                       | 23        |
| 1.4.3. Мултипла склероза и инсулинска резистенција              | 25        |
| <b>2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА</b>                         | <b>27</b> |
| 2.1 Главни циљ истраживања                                      | 28        |
| 2.2 Појединачни циљеви истраживања                              | 28        |
| 2.3 Радне хипотезе  | 29        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>  | <b>30</b> |
| 3.1 Популација која се истражује  | 31        |
| 3.1.1 Број испитаника   | 31        |
| 3.1.2 Критеријуми за укључивање у истраживање   | 31        |
| 3.2 Протокол  | 32        |
| 3.2.1 Врста студије   | 32        |
| 3.2.2 Узорковање  | 32        |
| 3.3 Обележја посматрања   | 33        |
| 3.3.1. Лабораторијске биохемијске и генетске анализе  | 33        |
| 3.3.2. Параметри који су процењени на основу базалних вредности<br>инсулина и глукозе                   | 34        |
| 3.3.3. Параметри који су добијени из ОГТТ теста   | 34        |
| 3.3.4. Клиничке оцене и неуропсихолошки тестови   | 35        |
| 3.4 Статистичка обрада података   | 38        |
| <b>4. РЕЗУЛТАТИ</b>   | <b>39</b> |
| 4.1.Основне карактеристике испитаног узорка оболелих од мултипле склерозе                               | 40        |
| 4.2 Когнитивни статус испитаника оболелих од мултипле склерозе  | 41        |
| 4.3 Образац когнитивног оштећења испитаника са мултиплом склерозом                                      | 42        |
| 4.4 Фактори когнитивног оштећења код испитаника са мултиплом склерозом                                  | 44        |
| 4.4.1 Асоцијација демографских и клиничких показатеља болести са<br>когнитивним статусом испитаника     | 44        |
| 4.4.2 Корелације клиничких и демографских показатеља са резултатима<br>појединачних когнитивних тестова | 46        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4.3. Имуномодулаторна терапија (IFN $\beta$ 16) и когниција _____   | 47        |
| 4.5 Полиморфизам у гену за АПОЕ код оболелих од релапсно ремитентне мултипле склерозе _____   | 47        |
| 4.5.1 Учесталост генотипова и алела полиморфизма у гену за АпоЕ код испитаника са мултиплом склерозом релапсно ремитентног тока _____ | 47        |
| 4.5.2 Алел $\epsilon$ 4 у гену за АПОЕ и когниција у мултиплој склерози _____   | 49        |
| 4.6 Метаболизам глукозе и инсулина у мултиплој склерози _____   | 49        |
| 4.6.1 Толеранција глукозе код испитаника са мултиплом склерозом _____   | 50        |
| 4.6.2 Инсулинска резистенција код испитаника са мултиплом склерозом _____   | 51        |
| 4.6.3 Асоцијација когнитивног статуса са толеранцијом глукозе и инсулинском резистенцијом _____                                       | 52        |
| 4.6.4 Асоцијација осталих параметара метаболизма глукозе и инсулина са постигнућима на појединачним тестовима _____                   | 54        |
| 4.7 Глукозну толеранција, инсулинска резистенција, алел АПОЕ4 и когнитивни статус испитаника са мултиплом склерозом _____             | 55        |
| 4.8 Мултифакторијална анализа предиктора когнитивног оштећења _____   | 55        |
| <b>5. ДИСКУСИЈА _____</b>   | <b>59</b> |
| 5.1 Когнитивни статус болесника са мултиплом склерозом _____  | 60        |
| 5.2 Профил когнитивног оштећења _____   | 64        |
| 5.3 Фактори који доприносе когнитивном оштећењу _____   | 65        |
| 5.3 Полиморфизам у гену за АПОЕ и мултипла склероза _____   | 68        |
| 5.4 Алел $\epsilon$ 4 у гену за АПОЕ и когнитивно оштећење у мултиплој склерози _____   | 69        |
| 5.5 Поремећај метаболизма глукозе и инсулина у мултиплој склерози _____   | 72        |
| 5.6 Инсулинска резистенција и когнитивни поремећај у мултиплој склерози _____   | 77        |

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| 5.7 Завршна разматрања | 80        |
| <b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b>     | <b>85</b> |
| <b>7. ЛИТЕРАТУРА</b>   | <b>88</b> |
| <b>8. ПРИЛОГ</b>       | <b>90</b> |



**І**  
**У В О Д**



## 1.1 Мултипла склероза- опште поставке

### 1.1.2 Епидемиологија, етиологија и патогенеза мултипле склерозе

Мултипла склероза (МС) је хронична, прогресивна, аутоимуна болест централног нервног система (ЦНС) где инфламаторни и дегенеративни процеси коегзистирају од почетка болести са различитим уделом у патогенези, зависно од типа и тока болести.

МС је најчешћи узрок онеспособљености особа млађе животне доби када се изузму физичке трауме. Инциденција болести расте након 18. године живота и досеже врхунац између 20. и 40. године, док је обољевање пре 10. и након 50. године живота ређе (1).

Болест је различито заступљена у односу на пол са преминацијом код особа женског пола, изузев у примарно прогресивној форми болести. Данашњи однос полова у погледу обољевања фаворизује жене у односу на мушкарце скоро 2.5 пута (1,2).

Епидемиолошке студије процењују укупан број оболелих у свету на око 2.5 милиона.

Преваленција болести варира у зависности од географске локације, са најнижом и региону Азије и тропских зона (5/100 000) до највише у севернијим подручјима Европе и Северне Америке (> 30/100 000). На Европском континенту укупан број оболелих процењен је на 83/100 000, а просечна годишња стопа обољевања на око 4.3/100 000 (2).

Генерални тренд повећења преваленције и инциденције, уочен протеклих деценија, доводи се у везу са продуженом дужином живота МС пацијената, напретком дијагностичких метода које доприносе бољој идентификаци оболелих као и мноштвом фактора који укључују популациону генетику, међузависност генетских чинилаца и географски детерминисаних карактеристика окружења као и социоекономске аспекте.

Тако је највећи број оболелих међу припадницима беле расе северно европског порекла, а најнижи међу припадницима црне расе који живе у сиромашнијим земљама јужнијег градијента географске ширине (3). Раније широко прихваћен став о изразитом значају градијента северне географске ширине данас се узима са резервом посебно када је у питању популација северне полулопте где изразита етничка хетерогеност умањује значај фактора средине у односу на значај популационе генетике. У прилог томе говоре резистентне етничке групе које иако настањене у регионима високог ризика задржавају мали ризик за обољевањем (Роми, Афички црнци) као и обрнуто висок ризик обољевања међу популацијом која настањује подручје ниског ризика (становништво Сардиније) (4).

Међу становништвом јужне Земљине хемисфере (Аустралија, Нови Зеланд) коју чини прилично хомогена популација беле расе Британског порекла и даље се добија изнекеђујуће јасна корелација инциденције и преваленције са степеном јужне географске ширине (4).

Етиологија МС представља и даље непознаницу али је у светлу нових сазнања сасвим јасно да је ова патогенетски и фенотипски хетерогена болест резултат садејства генетских фактора и фактора окружења који доприносе имунски посредованој деструкцији мијелина и аксона (5).

МС у генетском смислу представља комплексну, полигенску болест. Присуство одређених генских полиморфизама, независно или удружених у међусобном интерреаговању може повећати ризик за обољевање од МС .

Укупна стопа понављања болести унутар породице износи 20%. Већи ризик за обољевање носе особе које имају оболелог члана породице у првостепеном сродству 2.77% за разлику од ризика у општој популацији 0.3% (6,7). Монозиготни близанци имају стопу везаног обољевања од 25 до 30% за разлику од дизиготних близанаца где износи 5% приближно као код рођене браће и сестара 3% (8,9). Ове очињенице са једне стране сугеришу значај генетског фактора, док са друге стране указују да на преостали проценат оних који не обољевају везано вероватно утичу фактори окружења који између осталог могу довести и до епигенетских промена генетског материјала.

Студије које су анализирале генетске асоцијације које носе ризик за обољевање од МС истичу значај HLA(енгл. Human leukocyte antigen) региона на кратком краку хромозома 6, који кодира молекуле главног комплекса ткивне подударности (МНС) . Хаплотип HLADR2 најјаче је асоциран са ризиком обољевања и то HLA-DRB1 \* 15.01 алел (7,10). Студије анализе целокупног генома издвајају и гене ван HLA региона укључених у процесе имунске регулације, који показују малу до умерену повезаност са ризиком обољевања од МС (10). Генетска предиспозиција није сама по себи довољна за достизање критичног прага за појаву болести, неопходно је присуство фактора окружења. Ткивно оштећење у МС као резултат абнормалног имуног одговора на један или више антигена мијелина дешава се код генетски предиспонираних особа, а након излагања факторима спољне средине (11).

Значај срединског фактора за појаву МС поткрепљују подаци добијени из студија популационих миграција. Особе које су преселиле из географских подручја малог ризика у области високог ризика, нарочито пре 15. године живота, примају сличан ризик обољевања као и домаће становништво тј. уколико се миграција деси касније у животу задржавају ризик обољевања средине из које су потекли (10).

Бројне епидемиолошке анализе издвајају неколико кандидата из окружења који се, појединачно или удружено, сматрају и факторима ризика за настанак и напредовање МС: изложеност сунцу- ултравиолетној (УВ) радијацији, дефицит витамина Д, вирусне инфекције, хигијена и пушење цигарета.

Скорашња мета анализа истиче значај УВ радијације као једног од најзначајнијих фактора средине који инверзном повезаношћу детерминише ризик обољевања од МС. Ефекат УВ зрачења остварује се делом преко стварања витамина Д, а делом посредством индукције антиинфламаторног одговора. Одуство излагања сунчевој светлости није довољан фактор уколико није поткрепљен додатним ризиком. Тако део становника северних делова Скандинавије упркос недостатку осунчаности има ниску преваленцу МС, што је објашњено повећаним конзумирањем рибе у исхрани, а тиме и витамина Д (12).

Улога витамина Д у регулацији имуног система и редукцији инфламаторног одговора је недвосмислена. Отуда повезаност његовог дефицита са многим аутоимуним обољењима па и МС (13).

Установљен је ефекат витамина Д на експресију снажног генетског ризико фактора HLA-DRB1\*1501 алела (14) Витамин Д испољава протективни ефекат у погледу настанка и тока МС, било да је унет као суплемент или створен посредством сунчеве УВ радијације. Више серумске концентрације његовог метаболита 25-hydroxy-vitamin D показале су повезаност са мањим бројем лезија на магнетној резонанци (МР) као и нижу стопу погоршања (14,15).

Хипотеза хигијене истиче значај инфекција као фактора који може да превенира или пак преципитира аутоимуност. Истраживања упућују на то да излагање инфективном узрочнику у детињству и адолесценцији повезано са ризиком од настанка МС, где се инфекција сматра окидачем аутоимуног процеса тј. појачивачем већ постојећег субклиничког аутоимуног процеса.

Серопозитивност на Epstein–Barr вирус (EBV) повезује се са ризиком обољевања, где титар антитела снажно позитивно корелира са повећаним ризиком за настанак МС (16).

Патолошке студије откривају присуство информационе рибонуклеинске киселине (mRNA) вируса у инфилтрату Б ћелија и плазма ћелија као и експресију протеина вируса у мозговима оболелих од МС. Молекуларна мимикрија између EBV и антигена мијелина је један од претпостављених механизма којим би се могло довести у везу постојање инфекције са развојем МС (13,16).

Са друге стране, група научника истиче протективни ефекат инфекције хелминтима, где би услови живота у високим хигијенским стандардима заправо лишили јединку регулаторног ефекта паразитарне инфекције на коју је претходно адаптирана и тиме довели до дисбаланса имуног система и повећања инциденције имуно посредованих обољења (17).

Пушење цигарета такође показује дозно зависну повезаност са ризиком за МС као и прогресијом болести, која се остварује ефектом на имуни одговор, дисрегулацијом Т и Б ћелијске хомеостазе, повишењем инфламаторних фактора. Посредством азотног оксида (NO) долази до оштећења митохондрија, олигодендроцитне некрозе и дегенерације аксона (18).

МС је хронична болест централног нервног система (ЦНС) чија патогенеза још увек није разјашњена до краја. Болест се одликује инфламацијом, примарном демиелинизацијом и прогресивном неуродегенерацијом. И даље се сматра да је МС аутоимуна болест и да је Т ћелијски посредована инфламација иницијатор ткивног оштећења мозга и кичмене мождине. Активација аутореактивних, циркулишућих CD4+Т лимфоцита на периферији, који се потом диференцирају у Th1 и Th17 ћелије, дешава се вероватно након контакта са преципитирајућим антигеном, вероватно спољним агенсом (микроорганизам) који није до данас идентификован (19).

Након проласка кроз крвно моздану баријеру (КМБ) ове ћелије долазе у контакт са аутоантигенима мијелина, олигодендроцита, неурона посредством антиген презентујућих ћелија када се вероватно услед молекуларне мимикрије догоди њихова реактивација и следствено инфламација ЦНС-а. Рактивирани Т ћелије пролиферишу и секретују проинфламаторне цитокине, из Б ћелија сазревају плазма ћелије које стварају антитела, из моноцита настају активирани макрофаги. Надаље, независно од препознавања антигена, регрутују се нове Т-ћелије и активирани макрофаги које пролазе кроз нарушену КМБ (20). Демиелинизационо оштећење, плак, настаје као резултат деловања проинфламаторних цитокина ( фактор туморске некрозе, TNF- alfa; интерлеукини, IL12, IL23; интерферон, IFN- gama), антитела као и других проинфламаторних чинилаца (протеазе, слободни радикали, глутамат, азот-оксид) (21).

Насупрот томе покрећу се адаптивни процеси са циљем да ограниче инфламацију, долази до диференцијације CD4<sup>+</sup> лимфоцита у Th2 ћелије које пролиферишу и луче антиинфламаторне цитокине (IL4, IL5, IL13, фактор трансформације раста- TGF). Снижен ниво Th2 ћелија корелира са учесталашћу релапса и прогресијом болести (21, 22).

Имунопатолошке студије сугеришу постојање више типова ткивног оштећења и патогенетску хетерогеност у настанку активних лезија (23).

Сматра се да микроглијална активација, продукција слободних кисеоничних радикала, оксидативни стрес као и енергетски дефицит услед митохондријалног оштећења, имају значајну улогу у механизму демјелинизације и неуродегенерације не само у прогресивним стадијумима болести (24).

Инфламаторни процес не мора бити примаран у настанку демјелинизационих лезија у МС, већ оштећење олигодендроцита и мијелина управо може настати на овај начин као иницијални догађај. Иза тога следи локална активација микроглије и потом долази до инвазије инфламаторних ћелија из циркулације.

Са трајањем болести слаби инфламаторна компонента болести. Фактори повезани са старењем, акумулација иреверзибилног неуролошког дефицита, оптерећеност лезијама потенцирају оксидативно оштећење и митохондријалну дисфункцију, а резултат је трајно оштећење аксона и неурона (25).

Међутим, оштећење аксона и неурона може се догодити у свим фазама патолошког процеса па и у најранијој фази и присутно је дифузно у можданом ткиву унутар активних, хроничних плакова као и наизглед нормалној белој маси мозга (26).

У већини случајева болест почиње релапсно ремитентним (РР) током који након више година прелази у секундарно прогресивну фазу (СП). Код мањег броја пацијената болест прогредира од самог почетка без јасних фаза релапса, примарно прогресивна (ПП) МС. Инфламација и лезије беле масе чине супстрат РРМС, док прогресивну фазу одликује дифузна атрофија сиве и беле масе, промене у наизглед нормалној белој маси, а нове инфламаторне демјелинизационе лезије су ретке (27).

Кортекс је такође захваћен већ у раној фази болести инфламацијом, демјелинизацијом као и неуродегенеративним процесом што све заједно доводи до кортикалне атрофије (28).

### **1.1.3 Клиничка слика, дијагноза и терапија мултипле склерозе**

Клиничке манифестације болести су најчешће израз оштећења моторног, сензитивног, визуелног, аутономног система. Како патолошки процес може погодити било који део

мозга и кичмене мождине, могућ је широк спектар симптома али обзиром на постојање предилекционих места за настанак плакова демиелинизације неки симптоми су и учесталији.

У око 80% пацијената болест се инцијално манифестује клинички изолованим синдромом (КИС). То је прва неуролошка манифестација болести која је доведена у везу са демиелинизационом лезијом у оптичком живцу, великом мозгу, малом мозгу, можданом стаблу или кичменој мождини (29).

Уколико се у том моменту установи присуство и других демиелинизационих лезија које су без клиничког корелата шансе за нови напад и конверзију у клинички дефинитивну РС су веће (30).

Данас је дијагноза болести рана и сигурна захвањујући новим, ревидираним критеријумима.

Клиничка дијагноза РС захтева постојање најмање два, временски одвојена, напада болести уз постојање објективног клиничког показатеља две или више лезија различитих делова мијелинизованих региона ЦНС .

Дијагнозу РС могуће је поставити после само једног клиничког напада болести ако се параклиничким прегледима објективизирају и друге лезије унутар ЦНС-а, односно документује дисеминација лезија у времену и простору.

Интернационални панел за дијагнозу РС је 2010. године установио нову, актуелно важећу ревизију Мек Доналдових дијагностичких критеријума (31).

На основу налаза магнетне резонанце (МР) критеријуми који говоре у прилог дисеминацији у простору у РС су:

Постојање најмање једне хиперинтензне промене у две од следеће четири локализације:

1. кичмена мождина
2. инфратенторијална
3. јукстакортикална
4. перивентрикуларна

Критеријуми за потврђивање дисеминације у времену помоћу МР:

1. појава нове Т2 промене и/или промене која се пребојава контрастом без обзира на то када је урађен референтни снимак;
2. истовремено присуство асимптоматске Т2 промене која се не пребојава контрастом и асимптоматске промене која се пребојава контрастом било када од почетка првог напада

## Критеријуми за дијагнозу МС према Мек Доналду из 2010. год.

| Клиничка слика  | Додатни критеријуми за дијагнозу  |
|---|---|
| 2 или више напада; објективни клинички докази за две или више лезија или објективни клинички доказ за једну лезију са доказом о предходном нападу | Непотребни  |
| 2 или више напада; објективни клинички доказ за једну лезију  | Потврда дисеминације у простору (један од два наведена услова):<br>1. МР дисеминација<br>или<br>2. Сачекати други атак болести  |
| Један атак болести (КИС)<br>Објективни клинички знаци две или више лезија   | Потврда дисеминације у времену (један од два наведена услова):<br>1. МР дисеминација<br>или<br>2. Сачекати други атак болести   |
| 1 атак<br>Објективни клинички докази за једну лезију (КИС)  | Потврда дисеминације у простору<br>и<br>Потврда дисеминације у времену  |
| Прогресија од самог почетка сугестивна за ПП МС   | Годину дана прогресије болести (ретроспективно или проспективно) и најмање 2 од 3 критеријума:<br>1. најмање 1 Т2 лезија у најмање 1 регији карактеристичној за МС<br>2. дисеминација у простору у кичменој мождини на основу 2 или више Т2 лезије прегледом МР<br>3. Позитиван налаз ликвора (олигоклоналне траке или индекс имуноглобулина Г) |

Иако до сада није пронађен лек који би излечио МС, постигнут је огроман напредак у протеклих 20 година погледу ефикасности терапије којом данас располажемо.

Од терапијског нихилизма преко редуције учесталости релапса и успоравања прогресије функционалне онеспособљености до тога да је данас појединим лековима могуће превенирати активност болести.

Лечење МС подразумева неколико терапијских приступа.

- Лечење клиничког погоршања, релапса болести, које подразумева примену пулсних доза кортикостероида или терапијских измена плазме са циљем да се постигне бржи и потпунији опоравак новонасталог функционалног неуролошког дефицита и спречи нагомилавање оштећења које може настати од претходних релапса.
- Симптоматско лечење подразумева примену лекова и процедура који ублажавају симптоме које нарушавају болесникову функционалност и умањују квалитет живота.
- Терапија која мења природни ток, енг. disease-modifying therapy, (ДМТ) болести има за циљ да редукује учесталост погоршања, успори прогресију болести одложи и умањи прогресивну онеспособљеност.

Како се сматра да у РРМС болест започиње инфламаторним процесом који доводи до демиелинизације и неуродегенерације, окосницу терапије управо и чине лекови са антиинфламаторним и имуномодулаторним дејством. Отуда је њихов ефекат најпроминентнији у раним фазама РР МС док изостаје у прогресивној МС.

Осведочено постојање паралелне неуродегенерације, оштећења аксона и неурона већ од раних фаза почетка боелсти, што представља корелат мождане атрофије и трајног функционалног неуролошког дефицита, је разлог више да се са терапијом започне што раније.

1. Прва терапијска линија подразумева имуномодулаторне лекове који се данас широко примењују, а одобрени су за лечење након постављања дијагнозе болести.
  - За лечење РРМС овој групи припада: интерферон (IFN $\beta$ ) бета 1 $\beta$ , IFN $\beta$  1 $\alpha$ , Глатирамер Ацетат (ГА), Терифлуномид и Диметил фумарат.
  - За лечење КИС одобрени су IFN $\beta$  1 $\beta$ , IFN $\beta$  1 $\alpha$ , Глатирамер Ацетат (2 $\beta$ ), док су IFN $\beta$  1- $\beta$  и IFN $\beta$  - $\alpha$  регистровани и за лечење СП форме МС са релапсима.



- Код оболелих од ПП МС ниједан од до сада испитиваних лекова није показао ефикасност (20, 32).

У случају да лекови прве терапијске линије не уведу болест у клиничку и радиолошку ремисију примењују се лекови са значајно потентнијим имуномодулаторним и имunosупресивним ефектом који су до данас регистровани за лечење РР форме МС (Митоксантрон, Финголимод, Натализумаб, Алемтузумаб ( 20,32).

Оно чему се данас тежи када говоримо о циљевима будуће терапије је безбедан лек који би имао способност да елиминише клиничке и радиолошке знаке активности болести. Обзиром на хетерогено испољавање болести и мноштво интериндивидуалних разлика персонализован терапијски приступ би представљао најбољу терапијску стратегију (33).

#### **1.1.4 Интерферон бета у терапији мултипле склерозе**

Интерферони су природни цитокини који поседују широк спектар антиинфламаторних својстава. Рекомбинантни IFN $\beta$  широко се примењује у лечењу релапсне МС.

Комплексни механизам деловања IFN $\beta$  огледа се превасходно у инхибицији Т лимфоцитне пролиферације и фаворизовању антиинфламаторног одговора цитокина, ограничавању миграције инфламаторних ћелија кроз крвно-мождану баријеру (КМБ) и стимулацији стварања трофичких фактора који су неходни за опоравак ткива.

Након везивања за тип 1 – IFN трансмембрански рецептор покреће се каскада сигналних путева која доводи до транскрипције циљних гена као крајњег исхода (10).

IFN $\beta$  умањује активацију Т ћелијског одговора укључујући и мијелин реактивне Т ћелије тако што супримира експресију МНС молекула класе II и снижава ниво ко-стимулативних молекула (енг. Intercellular cell adhesion molecule, ICAM-1, vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1, very late activation antigen-4, VLA-4) чиме омета обраду и презентацију антигена. (34) IFN $\beta$  има неутралишући ефекат на деловање IFN $\gamma$  који је промотер експресије МНС молекула класе II.

Сматра се да доводи до инхибиције пролиферације и диференцијације Т ћелијских клонова при чему овај механизам није до краја расветљен. Могуће је да овај ефекат IFN $\beta$  остварује:

- активацијом путева одговорних за транслацију mRNA оних гена који су стимулирани IFN-ом, а који су одговорни за антипролиферативно деловање.
- регулацијом сигналних путева који инхибирају активност цитокина укључених у Th 17 ћелијску диференцијацију.
- инхибицијом анти-апоптоличких протеина који доводе до појачане смрти Т ћелија.

IFN $\beta$  редукују експресију Th1 одговором индукованих про-инфламаторних цитокина (IL 17, остеоопонтин, IFN $\gamma$ , TNF  $\alpha$ ) и појачавају Th2 одговор и активност анти-инфламаторних (IL10, IL4).

Сматра се да IFN $\beta$  има ефекат и на хемокине чиме редукују привлачење имуних ћелија у ЦНС (34,35).

У регулацији аутоимуног одговора показано је да IFN $\beta$  делује и преко CD56 NK ћелија (енг. natural killer) повећавајући њихово стварање, а тиме индиректно и продукцију IL-10 анти-инфламаторног цитокина. CD 56 NK ћелије такође интерреагују са аутореактивним Т ћелијама унутар ЦНС-а и секундарног лимфоидног ткива (35).

На КМБ остварује стабилизујући ефекат тако што инхибира способност Т ћелија да проласком кроз КМБ доспеју у мозак. Деловање на матрикс-метало-протеиназу тип 9 (MMP-9) као и друге цитокине, хемокине и интегрине, отежава пролазак лимфоцита кроз фибронектин ендотелијалних ћелија мозга чиме побољшава функцију ендотелијалне баријере. IFN $\beta$  интерферира са Т ћелијском адхезијом за ендотел посредством инхибиције експресије молекула МНС класе II који служе као лиганд Т ћелија, смањењем експресије VLA-4 и повећањем VCAM-1 који компетицијом са VLA-4 блокира леукоцитну адхезију за ендотелом (36).

Што се тиче Б ћелијског одговора, IFN $\beta$  поспешује фактор преживљавања Б ћелија (енг. B-cell survival factor –BAAF) што је заправо непожељан ефекат и може чак допринети стварању неутралишућих антитела на IFN $\beta$  и бити разлог лошијег одговора на терапију код појединих пацијената, нарочито оних код којих Б ћелијски одговор има значајнију улогу у патогенетском процесу (37).

Антивирални ефекат IFN $\beta$  би могао имати значаја у погледу патогенетске повезаности ретровируса удруженог са МС као и херпес висруса 6 (38).

Неуропротективни ефекат IFN $\beta$  огледа се у индукцији ослобађање фактора раста астроцита и стимулацији оправка аксонског оштећења (39).

## 1.2 Когнитивни поремећај у мултиплој склерози

Хетерогено клиничко испољавање у МС укључује и когнитивно оштећење.

Литературни подаци добијени из бројних студија које су процењивале когнитивно оштећење код оболелих од МС указују да се преваленција когнитивног поремећаја креће од 20% до 65%. (40,41) Процент заступљености варира у зависности од форме болести, трајања болести, степена функционалне онеспособљености испитиване групе болесника као и разлика у скалама које су примењиване за процену когнитивног статуса. Когнитивно оштећење у великој мери доприноси функционалној и радној онеспособљености болесника, нарушава квалитет живота и удружено је са чешћим испољавањем психијатријских симптома (41,42).

Оно што је сасвим јасно је чињеница да је когнитивно оштећење присутно у најранијој фази болести и да прогредира са трајањем болести. Студија која се бавила лонгитудиналним праћењем когнитивног статуса пацијената одмах након постављања дијагнозе указала је да се когитивно оштећење развило код значајног броја болесника након 10 година. Већи степен функционалне онеспособљености, прогресивни ток болести и старост пацијента корелирали су са тежином когнитивног оштећења (41, 43,44). Праћењем болесника унутар прве године од постављања дијагнозе указано је да пацијенти имају ниже когнитивне перформансе у односу на очекиване за дату старосну доб и степен образовања и процењено је да когнитивни поремећај може постојати у тз. „немој“ фази. Ово је потврђено у неуропсихолошким студијама код болесника са радиолошки изолованим синдромом (РИС), који су на МР прегледу мозга имали лезије сугестивне за МС уз нормалан неуролошки налаз и у одсуству клиничких симптома (45).

Такође је показано да је постојање когнитивног оштећења на самом почетку болести предиктивно за његову даљу прогресију. Когнитивни поремећај је проминентнији чешће прати прогресивне форме МС у односу на РРМС (46,47,48).

Студија која је испитивала популацију пацијената са КИС открила је да скоро 80% пацијената, који су имали прву клиничку манифестацију болести и МР знаке лезија дисеминованих у простору, испољило когнитивно оштећење у макар једном когнитивном домену, а 57% у два и више (49). Присуство когнитивног поремећаја у КИС повезано је са већим ризиком за конверзију у клинички дефинитивну МС (50,51).

Образац когнитивног оштећења у МС сличан је оном који срећемо код субкортикалних деменција иако степен когнитивне детериорације ретко досеже ниво деменције. Иако постоји варијабилност у презентацији когнитивног дефицита, уочена је чешћа захваћеност одређених когнитивних домена у МС болесника. Најчешће погођени когнитивни домени су вербално и визуелно памћење, процес учења и одложеног присећања скорије научених информација. Оштећење епизодичног памћења јавља се код 22% до 40 % болесника. Брзина обраде информација, успорење менталних функција, нарушена пажња такође су често присутни са преваленцом од 22% до 25%, уз то и егзекутивне функције, визуелно-просторне и вербалне способности (43,44).

Нове визуелизационе технике пружиле су нам бољи увид у структурална оштећења која би се могла довести у везу са менталним симптомима али је упркос томе етиологија когнитивног оштећења у МС још увек у потпуности неразјашњена.

Појава и степен когнитивног оштећења показао је неконзистентну и благу повезаност са оптерећењем лезијама, укупним волуменом лезија, присуством активних лезија. Локализација лезија у појединим регионима мозга се може довести у везу са захваћеношћу појединих когнитивних домена (52,53). Међутим, структурне абнормалности које су корелат глобалнијег можданог оштећења, неуродегенеративног процеса и израз су промене у неуронској сигнализацији услед аксонске дегенерације и демиелинизације, показале су значајнији степен повезаности са тежином когнитивног поремећаја (54,55). Ово се односи на кортикалну атрофију, смањење хипокампалног волумена, атрофију корпус калозума, диенцефалона, ткивно оштећење у наизглед нормалној белој маси, лезије у сивој маси (56,57,58).

У складу са најчешће захваћеним когнитивним доменима у МС формиране су специфичне батерије за клиничку евалуацију когнитивног статуса, осетљиве у откривању когнитивног оштећења. Најшире коришћена је „Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests“ (BRB-N) и у скорије време „Minimal Assessment of Cognitive Function in MS“ (MACFIMS) (59,60).

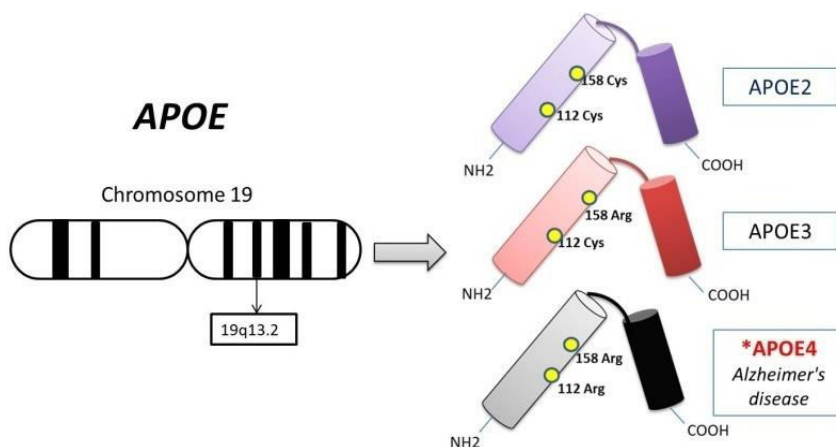
Не постоји специфична терапија когнитивног поремећаја у МС. Неколико студија које су лонгитудиналним праћењем испитивале ефекат IFN $\beta$  на когнитивни статус пацијената показале се корист ове врсте имуномодулаторне терапије у смислу стабилизација и чак редукције когнитивног дефицита код пацијената са МС (61,62).

Значај раног откривања когнитивних симптома, који често нису уочљиви при рутинским прегледима, управо је у томе што се њихово присуство може сматрати маркером прогресије болести и фактором који детерминише рано започињање терапије која мења природни ток МС.

### 1.3. Аполипопротеин Е

Аполипопротеин Е (АПОЕ) је гликопротеин, кодиран на хромозому 19q13 и један је од гена који се највише доводи у везу са когницијом код људи. Самим тим је и један од највише испитиваних гена у односу на когнитивно оштећење (63).

АРОЕ се састоји из 299 аминокиселина. Два појединачна нуклеотидна полиморфизма у непосредној близини један другом, који се разликују у комбинацији аминокиселина дају три различите, најчешће заступљене алелне варијанте. Разлике између три АПОЕ изоформе одређују две аминикиселине 112. и 158. при чему је присутан или аргинин (Арг) или цистеин (Цис). Слика1.



Слика 1. Алел  $\epsilon$ 2- цистеин се налази на обе позиције( Цис 112, Цис 158),  $\epsilon$ 3 -цистеин на једној аргинин на другој (Цис 112, Арг158)) и  $\epsilon$ 4 -аргинин на обе позиције (Арг 112, Арг 158)

Ове разлике утичу на различиту структуру АПОЕ изоформи која на даље детерминише њихову способност везивања за липидне молекуле, рецепторе и амилоид бета (А $\beta$ ).

Три различита полиморфизма АПОЕ  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  и  $\epsilon 4$  различито су присутна у општој популацији. АПОЕ  $\epsilon 2$  је заступљен у 5-10%, АПОЕ  $\epsilon 3$  у 65-70%, а АПОЕ  $\epsilon 4$  у 15-20% (63,64,65).

АПОЕ је укључен у метаболизам холестерола и липида. Он је главни носилац холестерола и одговоран је за липидни транспорт у процесу регенерације аксона и обнављања мијелина у централном и периферном нервном систему (65, 66, 67).

Заправо АПОЕ је медијатор липидног транспорта из једног ткива или типа ћелије у други. На периферији се ствара у јетри и макрофагима и посредује у метаболизму холестерола различито у зависности од изоформе која је присутна. Присуство АПОЕ  $\epsilon 4$  је удружено са хиперлипидемијом, хиперхолестеролемијом што фаворизује процес артериосклерозе и води коронарној срчаној инсуфицијенцији и исхемијској болести мозга (68, 69).

У ЦНС-у АПОЕ стварају претежно астроцити и микроглија, а транспорт холестерола у нервне ћелије одвија се преко рецептора LDLR (енг. low-density lipoprotein receptor) за који се везују липопротеини мале гистине који улазе у састав холестерола. АПОЕ заправо служи за транспорт липопротеина тј. холестерола до рецептора.

### **1.3.1 АПОЕ у патогенези можданог оштећења**

Механизам којим АПОЕ утиче на процес неуродегенерације, неуроинфламације, синаптичког пластицитета најбоље се огледа на примеру Алцхајмерове болести. Присуство  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ има значајне реперкусије на ризик обољевања од спорадичне Алцхајмерове деменције (АД), нарочито оне касног почетка. Присуство једне копије алела повећава ризик три до четири пута, док две копије алела повећавају ризик десет до дванаест пута (70,71).

Поремећен метаболизам липида је тесно повезан са патогенезом АД.

Холестерол је есенцијална компонента у механизму аксонског раста, формирања и ремоделовања синаптичких веза које леже у основи процеса учења, памћења и обнове нервног ткива. Допремање холестерола нервним ћелијама у многоме је посредовано АПОЕ. Редуковани ниво можданог холестерола у регији хипокампуса и мождане коре је установљен је код оболелих од АД у знатној мери у односу на здраве вршњаке (72,73).

Заправо код оболелих од АД имамо снижен ниво укупног АПОЕ у мозгу и ликвору што доприноси смањеном допремању холестерола у ћелије. Како је АПОЕ  $\epsilon 4$  склонији

процесу деградације у односу на АПОЕ  $\epsilon 3$ , тако је на рачун њега нижи ниво укупног АПОЕ у мозгу носиоца ове алелне варијанте, што се доводи у везу са брзином прогресије болести (73,75).

АПОЕ  $\epsilon 4$  је мање ефикасан у уклањању А $\beta$  него АПОЕ  $\epsilon 3$ . Сматра се да њихова различита способност у погледу регулације нивоа холестерола има утицаја на активност  $\gamma$  секретазе, ензима деградације амилоида као и на стварање А $\beta$  (76).

Патолошке студије су указале су да АПОЕ изоформе различито делују на процес накупљања и клиренса А $\beta$ . Повећено накупљање А $\beta$  депозита примећено је у кортексу како пацијената са АД тако и код здравих носиоца АПОЕ  $\epsilon 4$  (71). О томе сведоче и студије са метаболичким биомаркерима као што је Pittsburgh compound B (PiB) који има афинитет везивања за А $\beta$  у мозгу. Налази PiB-позитронске емисионе томографије (ПЕТ) указују на то да је накупљање агрегата А $\beta$  у мозгу било много чешће код оболелих од АД који су поседовали АПОЕ  $\epsilon 4$  (77).

Један од главних претпостављених механизми којима се присуство  $\epsilon 4$  изоформе доводи у везу са патологијом АД је повећано формирање амилоидних депозита као и смањена елиминација А $\beta$  (68,70,75, 76).

Предпоставља се да протеолиза АПОЕ  $\epsilon 4$  и последична акумулација фрагмената и цитосола неурона доводи до промена у цитоскелету и поремећаја митохондријалног енергетског баланса. Такође постоје подаци о неуротоксичности Н- терминалних домена АПОЕ  $\epsilon 4$ .

АПОЕ  $\epsilon 4$  се везује за А $\beta$  мањим афинитетом у односу на АПОЕ  $\epsilon 3$  што сугерише да он мање ефикасним механизмом учествује у клиренсу А $\beta$ . Такође је показано да АПОЕ  $\epsilon 3$  поспешује ензимски посредовану деградацију А $\beta$  што опет упућује на закључак да је  $\epsilon 4$  алел у томе мење ефикасан. Могуће је да АПОЕ има утицаја на одстрањивање А $\beta$  у периферну циркулацију преко КМБ (73,75).

Са друге стране  $\epsilon 2$  изоформа показује протективни ефекат у погледу ризика за АД. Интересантно је да код особа старијих од 90 година присуство и једне и друге изоформе ( $\epsilon 2$  и  $\epsilon 4$ ) било удружено са повећаним накупљањем амилоида у односу на носиоце  $\epsilon 3$  варијанте исте животне доби. Ово сугерише да се протективни ефекат  $\epsilon 2$  изоформе можда може приписати неком другом механизму деловања (78).

Такође је примећено да носиоци АПОЕ  $\epsilon 4$  имају смањена ефикасност у везивању за microtubule-associated protein tau што га чини осетљивијим за фосфорилацију и формирање неурофибриларне клубади (НФК) (79,80,81).

Студије на анималном моделу су указале да је  $\epsilon 4$  протеин посебно осетљив на цепање од стране серинских протеаза при чему се формирају скраћени производи који су подлога за стварање НФК-сличних интранеуралних ћелијских инклузија, што води у даљи неуродегенеративни процес (79,80). Сматра се да код носилаца  $\epsilon 4$  алелне варијанте постоји смањена способност у одговору на ћелијско оштећење и неуродегенерацију, смањена ефикасност процеса који поспешују обнову неурона и осим тога носиоци  $\epsilon 4$  варијанте су лишени протективне функције коју носи  $\epsilon 3$  изоформа (78,81). Успоравање репаративних процеса, дендритичног раста води губитку синапси, слабљењу ефикасности неуралне мреже што је директно повезано са когнитивним функционисањем (73,81).

АПОЕ изоформе различито регулишу синаптички пластицитет. Носиоци АПОЕ  $\epsilon 4$  оболели од АД су у поређењу са здравим испитаницима истих година, имали смањену густину дендритичних израштаја у хипокампусу што је у сагласности са налазима анималних студија на АПОЕ  $\epsilon 4$  трансгеним мишевима (82).

Хипокампадна неурогенеза има важну улогу у очувању интегритета неуралне мреже и побољшању пластицитета. Сматра се да АПОЕ доприноси активности и одржању прогениторских и матичних неуралних ћелија у гирусу дентатусу хипокампуса. Оштећена неурогенеза се клинички може довести у везу са нарушеним процесом учења и памћења (83).

Неуроинфламација доприноси ткивном оштећењу и уплетена је у патогенезу АД. Сматра се да АПОЕ делом посредује у имуном одговору.

Анималне студије на мишевима који не поседују АПОЕ показале су повећање инфламације у одговору на  $A\beta$ , при чему се сматра да различите изоформе различито регулишу имуни одговор. АПОЕ  $\epsilon 4$  изгледа поспешује проинфламаторни одговор, а умањује антиинфламаторни што са своје стране даље реперкутује на патолошки процес у АД (84).

Особе млађе животне доби које носе АПОЕ  $\epsilon 4$  алел имају повишен инфламаторни одговор који заправо може бити ризик за настанак не само АД већ и других инфламаторних обољена ЦНС-а у каснијем животу (73,84).



### **1.3.2 Полиморфизам у гену за АПОЕ и когниција**

Когнитивне студије у АД истичу да присуство  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ детерминанта тежине когнитивног оштећења, ранијег обољевања, брзине прогресије као и изразитијих структуралних и метаболичких промена докуметованих савременим неуровизуелизационим техникама (МР, ПЕТ) (85,86,87).

У погледу утицаја на когнитивни статус оболелих од АД присуство АПОЕ  $\epsilon 4$  имало је селективнији утицај на оштећење епизодичног памћења (87,88).

Све је више података који указују да је АПОЕ  $\epsilon 4$  могући генетски фактор ризика и за неколико других неуродегенеративних и неуролошких обољења, која се одликују когнитивним оштећењем, као што су деменција са Левијевим телима, Хантингтонова болест, васкуларна деменција, цереброваскуларне болести, мождана траума, делиријум (73,88).

Судије спровођене на популације здравих особа носиоца АПОЕ  $\epsilon 4$  алела указале су на постојање лошијих когнитивних постигнућа у домену меморије и брзине процесуирања информација не само код особа старијих од 60 година већ и особа средњих година (89,90).

Присуство метаболичких абнормалности, редукован метаболизам глукозе у темпоралном, паријеталном и префронталном кортексу установљен је и код когнитивно очуваних, здравих млађих (29-39 година) хомозиготних носилаца  $\epsilon 4$  алела (91).

Наведени налази су могуће израз суптилне неуропсихолошке и неуропатолошке дисфункције која много година претходи клиничком испољавању деменције или су са друге стране израз убрзанијег процеса старења особа које носе овај ризични полиморфизам.

### **1.3.3 Полиморфизам у гену за АПОЕ и мултипла склероза**

У светлу ових сазнања као и чињенице да су когнитивне промене веома честе код оболелих од МС, многе студије су испитивале повезаност когнитивне дисфункције у МС са присуством  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ. Ставови су контраверзни. Резултати неколико студија истичу да носиоци ове алелне варијанте имају лошији когнитивни статус и већи степен мождане патологије (67,92). Такође се код ове групе оболелих од МС наводи брже напредовање когнитивног оштећења као и већа прогресија болести (67,93). Као релативно конзистентан налаз у неколико студија издваја се повезаност присутности  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ код оболелих од МС са оштећењем вербалне

меморије. Показано је да је ризик за оштећење вербалне меморије чак шест пута већи у поређењу са оболелима који нису носиоци, а посебно у кохорти млађих оболелих носилаца АПОЕ-  $\epsilon 4$  алел (94).

Такође је испитивана повезаност промена на МР код пацијената са МС у односу на поседовање тј. одсуство АПОЕ  $\epsilon 4$ . Оптерећење Т1 лезијама које осликавају већу ткивну деструкцију, била је значајно веће код носилаца ове алелне варијанте као и проценат тзв. „Црних рупа“ (енг „black holes“) које репрезентују плак МС у хроничној фази и говоре у прилог аксонске деструкције и иреверзибилног оштећења (95,96).

Иста група истраживача у каснијим студијама лонгитудиналног праћења не налази значајнију разлику у оптерећењу Т1 лезијама нити повећан однос „црних рупа“ у односу на присуство или одсуство АПОЕ  $\epsilon 4$  алела када су поређени иницијални МР налази. Даљим, трогодишњим праћењем развоја ткивног оштећења код исте групе МС пацијената, АПОЕ  $\epsilon 4$  је идентификован као значајни предиктор промена у волумену мозга (96). Присуство АПОЕ  $\epsilon 4$  је повезано са већом годишњом стопом редукције можданог волумена као и већим годишњим повећањем процента „црних рупа“ као и опадањем N-ацетил аспартат (НАА)/креатин односа на МР спектроскопији који је маркер неуронског интегритета (96, 97).

У супротном налази скоријих студија нису потврдили постојање значајнијих разлика у погледу присуства и тежине когнитивног оштећења код пацијената са МС који су носиоци  $\epsilon 4$  алела у односу на неносиоце овог полиморфизма (66, 98,99,100).

Опречни резултати когнитивних студија леже у њиховој хетерогености у погледу испитиване МС популације, примене различитих инструмената процене когнитивног статуса, као и различитој дефиницији когнитивног оштећења тј. квантификацији степена и квалификацији присуства / одсуства когнитивног дефицита.

Имајући у виду све наведено као и чињеницу да се АПОЕ  $\epsilon 4$  доводи у везу са ремијелинизацијом, неуралним пластицитетом, инфламаторним процесима у мозгу као и неуродегенерацијом не сме се занемарити његова улога у патофизиологији можданог, а тиме и когнитивног оштећења у МС.

И даље остаје недоумица у погледу директног ефекта АПОЕ-  $\epsilon 4$  на степен функционалне онеспособљености и когнитивне способности оболелих од МС али је могуће да носиоци АПОЕ-  $\epsilon 4$  ипак имају повећану склоност ка можданом оштећењу у МС.

#### 1.4. Инсулин и мозак

До скоро се веровало да је мозак инсулин не-сензитивни орган. Инсулинска активност је дуго фокусирана на његово деловање на „класичне“ инсулин сензитивне органе на периферији ( јетра, адипозно ткиво, мишићи) и искључиво довођена у везу са регулацијом глукозне хомеостазе.

Међутим инсулински рецептор откривен је у мозгу најпре животиња, а потом и људи. Примећено је да његова дистрибуција у мозгу није униформна. Региони у којима је је његова затупљеност највећа су олфактивни булбус, хипоталамус, хипокампус, церебелум, амигдала и церебрални кортекс (101, 102). Управо ови региони су највише укључени у процесе регулације људског понашања, когниције, уноса хране, преживљавања нервних ћелија и пластицитета синапси.

Инсулински рецептор је у већој концентрацији заступљен у неуронима у односу на глију, а унутар синапси налази се на постсинаптичком нивоу (103).

Рецептор припада фамилији рецепторских тирозин киназа и састоји се из две екстрацелуларне и две трансмембранске субјединице. Ген који кодира хумани инсулински рецептор налази се на хромозому 19p 13.2-19p13.3. Постоје две изоформе инсулинског рецептора од којих се дужа форма Б налази на периферији док је у мозгу заступљена краћа, А изоформа. Ниво експресије инсулинског рецептора је делом развојно детерминисан, виши у младости нижи у старијој доби (102,103).

Присуство инсулинског рецептора у мозгу се из почетка није баш најбоље разумело.

Наиме, на периферном нивоу се његова функција проминентно односила на регулацију глукозног транспорта у ћелије али обзиром да је глукозни метаболизам нервних ћелија умногоме инсулин независан, поставило се питање улоге инсулинског рецептора и инсулина у мозгу.

Студије које су рађене на тзв. NIKKO мишевима који су инактивирани (нокаутирани) за инсулински рецептор у мозгу показале су да ове животиње имају повећан унос хране, гојазност, повећане нивое лептина и инсулина у плазми, инсулинску резистенцију, хипертриглицеридемију, оштећену сперматогенезу и сазревање фоликула и поремећај у учењу и памћењу (104). Све заједно буди интересовање и покреће једну нову еру истраживања која су несумњиво потврдила значај инсулина у бројним физиолошким и патофизиолошким функцијама у ЦНС-у, превазилазећи његово искључиво деловање као хормона периферије.

Следеће питање које је покренуло низ дилема је одакле инсулин у мозгу?

Сматра се да инсулин у мозак долази са периферије проласком кроз КМБ преко ендотелних ћелија, вероватно инсулин-рецептор посредованим транспортом (105). Његова локална синтеза у мозгу до данас није доказана иако су студије које су користиле имунореактивне методе за детекцију инсулина установиле присуство инсулина и Ц пепида у нервном ткиву кадавера. Такође је детектована и инсулинска mRNA у мозгу, а ову хипотезу су подржале и студије можданих ћелијских култура (103,105). Наведени налази захтевају будуће потврде кроз нова истраживања.

Сматра се да инсулин у интерстицијалну течност мозга делом доспева преко цереброспиналне течности (ЦСТ). Инсулин пролази крвно-ликворну баријеру преко засићеног транспортног система насупрот градијенту, при чему је концентрација инсулина је 10 до 20 пута већа у плазми код здравих особа. Овај градијент је већи код гојазних особа и у стањима у којима постоји инсулинска резистенција (ИР) када је допремање инсулина у ЦСТ отежано. (106,107) Не зна се тачно који је пут инсулинског трансфера у мозак примаран, да ли преко КМБ или хориоидног плексуса али је врло вероватно да је ендотел у то укључен.

Улога инсулина у мозгу је вишеструка. Инсулин само делом има утицај на церебрални глукозни механизам.

У погледу транспорта глукозе у мозак познато је да је он углавном инсулин независан. Метаболичке потребе мозга за глукозом као основним „горивим“ су обезбеђене њеним константним допремањем из крви . Пут глукозе до већине неурона посредован је глукозним транспортером ГЛУТ 3 , док глијалне ћелије и мождане ендотелне ћелије зависе од ГЛУТ1 (108). Овај већински глукозни транспорт је инсулин независан. Глут 4 и Глут 8 транспортери који су инсулин зависни су распоређени само у појединим можданим регионима углавном коегзистирајући са инсулинским рецепторима (хипокампус, хипоталамус, олфактивни булбус, гирус дентатус, кортекс) (109,110).

Отуда је инсулином посредовано преузимање глукозе изгледа селективно и то превасходно у регионима мозга значајним за регулацију енергетске хомеостазе, учења и памћења.

Са друге стране, механизми којима инсулин, као неурорегулаторни пептид, остварује своје централне ефекте доводе се у везу са инсулинском рецепторском експресијом, инсулинском сигналном каскадом, неуротрансмитерском експресијом и модулацијом више аспеката неуроинфламаторног одговора (103,111).

Показано је да инсулин утиче на ћелијску пролиферацију и диференцијацију у ЦНС-у (112). Установљен је и његов неуропротективни ефекат доминантно насупрот апоптозе, токсичности бета амилоида, оксидативног стреса и исхемије (113,114).

Централно деловање инсулина регулише понашање у вези са узимањем хране, телесну тежину, периферни метаболизам, побољшава инсулинску сензитивност целог тела, утиче на репродуктивне и когнитивне функције (115).

Сматра се да је модулација периферног метаболизма сигнаlima из мозга омогућена посредством аутономног нервног система и хормонског деловања (116).

#### **1.4.1 Инсулинска резистенција**

Под појмом ИР подразумева се оштећена, смањена, способност инсулина као ендогеног тако и екзогеног да стимулише искоришћавање глукозе у ткивима и сматра се претечом дијабетес мелитуса (ДМ) тип 2 .

Смањена сензитивност ткива на инсулин покреће маладаптивне механизме са тежњом да одржи оптималне нивое глукозе у крви и сачува хомеостазу (117). Бета ћелије панкреаса добијају сигнал да луче више инсулина обзиром да је акција инсулина на метаболизам глукозе слаба. Хиперинсулинемија привремено одржава еугликемију. Временом бета ћелије постају све мање способне да се носе са перманентном стимулацијом глукозе и као резултат се јавља пораст гликемије. Као крајњи исход настаје хиперинсулинемија и хипергликемија. У даљем току сваки од ових исхода, са своје стране, доводи до даљих поремећаја хомеостатског система.

Транспорт инсулина у ЦНС компромитован је у стањима која се одликују смањеном инсулинском сензитивношћу (ИС) и ИР на периферији што се доводи у везу са појмом мождане инсулинске резистенције (118) .

Акутно повишење нивоа периферног инсулина бива праћено његовим повећањем и у ЦСТ (119). Међутим, парадоксално, перзистентна хиперинсулинемија доводи до нисходне регулације инсулинских рецептора и редукује транспорт инсулина у мозак. Стога, хронична периферна хиперинсулинемија у склопу ИР може резултовати хипоинсулинемијом у ЦНС-у (120).

Појам мождане ИР повезује се са периферном ИР и хроничном хиперинсулинемијом којој доприносе старење, гојазност, дислипидемија. Такође постоје импликације да би мождана

инсулинска резистенција могла бити детерминисана још у феталном периоду матералним метаболичким поремећајима који интерреагују са феталним мозгом. Претпоставља се да би потомци мајки са гестационим дијабетесом могли у даљем животу бити предиспонирани за развој гојазности или ДМ тип 2 (115).

Са друге стране јасна је веза између висцералног масног ткива и постојања мождане ИР. Још увек није јасно да ли увећано масно ткиво доприноси настанку мождане ИР или обрнуто мождана ИР води повећаном нагомилавању висцеларних депоа масти.

Повећан ниво слободних засићених масних киселина код гојазних особа удружен је са смањеном ИС мозга (115, 121).

Механизам ове везе није у потпуности јасан али се сматра да се делом одвија на нивоу специфичног рецептора који селективно везује засићене слободне масне киселине. Са друге стране наводи се и могућа улога лептина, пептидног хормона пореклом из масних ћелија. Лептин је повећан код гојазних особа и сматра се да би његово међуделовање са инсулином у неуронским сигналним процесима у специфичним регионима мозга могло бити уплетено у настанак мождане ИР (122). Генетска предиспозиција је још једна детерминанта мождане ИС. Генски полиморфизми идентификовани као ризико фактори су Инсулин рецептор супстрат 1 (IRS1), FTO (енг. fat mass and obesity associated-FTO), полиморфизам лоциран у непосредној близини melanocortin 4 receptor (MC4R) gena. Ефекат инсулина на меморијске функције модулисан је и АПОЕ е4 полиморфизмом (115,123).

Да ли су периферна ИР и мождана ИР компоненте исте болести или постоје независно једна од друге, предмет је актуелног интересовања и будућих истраживања.

#### **1.4.2 Инсулин и когниција**

Прегледом литературе наилазимо на бројна истраживања која упућују на повезаност ИР са повећаним ризиком обољевања од АД и сугеришу њену значајну улогу у патофизиолошком процесима когнитивног оштећења у АД (124,125).

Епидемиолошке студије су указале да особе са глукозном интолеранцијом и нарушеном инсулинском секрецијом као и ДМ тип2 имају значајно повећан ризик за настанак АД. Присуство ДМ тип 2 удвостручује ризик за настанак АД (126).

Когнитивно оштећење утврђено је код болесника како са ДМ тип 2 тако и са ДМ тип1. (120,127) Лонгитудиналне студије су указале да особе са ДМ тип 2, гојазношћу и

дислипидемијом у каснијем току чешће развијају благи когнитивни поремећај и деменцију (127, 128). ИР је фактор ризика за настанак АД независно од тога да ли имају ДМ тип2 или не. Стога је инсулинска резистенција у ствари заједнички именован за оба обољења и може годинама да предходи испољавању јасног ДМ тип2 и могуће клинички јасне АД .

Од скора је уведен концепт који сматра да је АД метаболичка болест са нарушеним енергетским метаболизмом и искоришћавањем глукозе у мозгу, у чијој основи леже мождана резистенција на инсулин и инсулину сличан фактор раста (128).

Још у раним стадијумима АД постоји смањено искоришћавање глукозе, дефицит у инсулинским сигналним процесима као и инсулин зависној генској експресији (129). Предпоставља се да периферна ИР доприноси настанку мождане ИР доводећи до редукције нивоа можданог инсулина што на даље фигурира у процесима неуродегенерације и неуроинфламације.

Студије на здравим добровољцима као и на оболелима ид АД показале су да акутни пораст нивоа инсулина у плазми уз очување еугликемије побољшава вербалну меморију и селективну пажњу. Такође акутна и хронична интраназална администрација инсулина код оболелих од АД која доводи до директног пораста инсулина у ЦСТ, без реперкусија на нивое периферног инсулина и глукозе, резултовала је значајним побољшањем когнитивних способности, превасходно меморијских функција (119,125).

Могући механизми којима инсулин делује на меморију и друге когнитивне функције:

- Функционалне промене инсулинског рецептора у регији хипокампуса, које су индуковане процесом учења.
- Инсулин утиче на процес дуготрајне потенцијације која репрезентује целуларни модел учења посредством N-methyl-D-aspartate (NMDA) рецепторске експресије.
- Деловање на мождани глукозни метаболизам у селективним можданим регионима међу којима је хипокампус, церебрални кортекс, церебелум (посредством инсулин зависних глукозних транспортера ГЛУТ 4 и ГЛУТ 8)
- Деловањем на неуротрансмитерску активност, у првом реду на холинергички и норадренергичку. (130)

Мождана резистенција на инсулин и инсулину сличан фактор раста доводи се у везу са процесом неуродегенерације и неуроинфламације у ЦНС-а у оквиру којих долази до прекида сигналних путева који регулишу преживљавање неурона, продукцију енергије и синаптички пластицитет, што све заједно резултује когнитивним оштећењем.

Инхибиција инсулинских сигналних путева доприноси појачаној активацију киназа које патолошки фосфорилишу Тау протеин, повећању експресије амилоид  $\beta$  прекурсор протеина (А $\beta$ PP) и нагомилавању А $\beta$  као и оштећењу његовог клиренса (128,131).

Са друге стране акумулација А $\beta$  додатно ремети процес инсулинске сигнализације механизмом компетиције са инсулином. Дефицит енергетског метаболизма доводи до повећања оксидативног стреса, митохондријалне дисфункције као и активирања про-инфламаторних цитокина и про-апоптотичких каскада што са своје стране доприноси губитку неурона и синапси (128).

ИР, ДМ тип2 доприносе когнитивном оштећењу и деменцији доводећи до васкуларних промена мозга, микроваскуларна болест (132).

Сматра се да неуродегенерацији и когнитивном оштећењу доприноси токсични ефекат церамида који настају у стању хепатичке инсулинске резистенције у којој се промовише процес липолизе (133).

Такође је показан висок степен повезаности оштећења инсулинске секреције, ИР са другим неуродегенеративним обољењима у оквиру којих се јавља когнитивна дисфункција, Хантингтонова болест и Паркинсонова болест (134,135).

Инфламаторни и неуродегенеративни процес који се паралелно одвија и код оболелих од МС сугерише могућу аналогију у патофизиолошким процесима когнитивног оштећења .

#### **1.4.3. Мултипла склероза и инсулинска резистенција.**

Особе које болују од МС имају подједнак ризик обољевања од ДМ тип 2 у односу на општу популацију, али као група имају већу склоност ка развоју других аутоимуних обољења, укључујући и ДМ тип 1(136).

Познато је да су сва три ентитета удружена су са присуством когнитивних поремећаја.

Недавно је показано да болесници са МС који су уједно имали ДМ тип 2 показују израженије промене на МР мозга и то превасходно глобалну атрофију и кортикалну атрофију (137).

Мали број недавно спроведених студија у популацији МС пацијената сугерише присуство абнормалности глукозног и инсулинског метаболизма (138).



Истраживања су указала на постојање већа преваленце ИР од 40% код МС пацијената у односу на здраве испитанике 21% као и удруженост ИР и гојазности са већим степеном функционалне онеспособљености (139).

Снижена ИС и постпрандиална хиперинсулинемија уочена је у групи новодијагностикованих МС пацијената али без значајније повезаности са функционалним статусом болесника и маркерима хроничне инфламације (140).

Имуномодулаторна терапија  $IFN\beta$  додатно доприноси ризику за настанак глукозне дисрегулације. Показано је да терапија  $IFN$  индукује ИР и повећава инциденцу ДМ тип 2 (141).  $IFN\beta$  доводи до ИР активацијом енгл. signal transducer and activator of the transcription (STAT1)/suppressor of cytokine signaling (SOCS). Повећана експресија SOCS у адипоцитима, јетри и масном ткиви резултује супресијом инсулинске сигнализације и редукцијом преузимања глукозе, а такође доводи до супресије инсулином индуковане фосфорилације инсулин рецепторског супстрат (IRS)-1 протеина (141).

Недавно је спроведена студија, од стране аутора овог рада, на групи испитаника са МС који нису примали терапију која мења природни ток болести, установила је постојање повишеног индекса ИР, хиперинсулинемију, снижење ИС уз нормалну глукозну толеранцију, што указује на постојање иницијалне фазе синдрома ИР независно од примене имуномодулаторне терапије  $IFN\beta$ .

Није установљена повезаност ИР и ИС са степеном функционалне онеспособљености и показатељима прогресије болести (142).

Примене пулсне кортикостероидне теарије у лечењу релапса МС индукује пораст базалних вредности глукозе и инсулина.

Кортикостероидни третман, заправо доводи до реверзибилне ИР која је праћена и пролазним оштећењем меморијских функција (143,144).

Понављане епизоде лечења погоршања болести код РРМС пацијената изнова ремете хомеостазу инсулина и гукозе што би могло у перспективи довести до трајних метаболичких консеквенци са реперкусијом на остале показатеље болести.

Намеће се питање да ли пацијенти са МС као група имају повећану склоност ка развоју ИР, глукозне интолеранције или типа 2 ДМ и да ли њихова удруженост са МС утиче на тежину и образац когнитивног оштећења као и степен функционалне онеспособљености у односу на оно које се среће само код МС ?

## **II**

# **ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА**

## 2.1 Главни циљ истраживања:

Главни циљ истраживања је испитивање повезаности когнитивног статуса код оболелих од МС РР тока са инсулинском резистенцијом и присуством  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ.

## 2.2 Појединачни циљеви истраживања

У складу са овим главним циљем дефинисани су конкретни задаци:

1. Испитивање когнитивног статуса код оболелих од МС РР тока.
2. Испитивање полиморфизама у гену за АПОЕ код оболелих од МС РР тока.
3. Утврђивање постојања инсулинске резистенције код оболелих од МС РР тока.
4. Утврђивање повезаности примене имуномодулаторне терапије типа IFN $\beta$  16 (Бетаферон) са инсулинском резистенцијом
5. Утврђивање повезаности присуства инсулинске резистенције са постојањем и тежином когнитивног оштећења као и оштећења у појединачним когнитивним доменима (пажња, вербална и визуелна меморија, брзина обраде информација).
6. Утврђивање повезаности полиморфизама у гену за АПОЕ са постојањем и тежином когнитивног оштећења као и оштећења у појединачним когнитивним доменима (пажња, вербална и визуелна меморија, брзина обраде информација).
7. Утврђивање повезаности истовременог присуства алела  $\epsilon 4$  у гену за АПОЕ и инсулинске резистенције са постојањем и тежином когнитивног оштећења као и оштећења у појединачним когнитивним доменима (пажња, вербална и визуелна меморија, брзина обраде информација).
8. Утврђивање повезаности присуства алела  $\epsilon 4$  у гену за АПОЕ и/или инсулинске резистенције са различитим компонентама вербалне као и визуелне меморије.
9. Испитивање повезаности тежине когнитивног поремећаја са нивоом функционалног дефицита (EDSS) и са брзином прогресије болести (MSSS)
10. Испитивање повезаности полиморфизама у гену за АПОЕ са нивоом функционалног дефицита (EDSS) и са брзином прогресије болести (MSSS).

### 2.3 Радне хипотезе:

- постојање когнитивног оштећења је позитивно повезано са присуством инсулинске резистенције и/или  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ.
- истовремено присуство инсулинске резистенције и  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ представља позитиван показатељ меморијског оштећења код оболелих од МС РР тока.

# III

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### **3.1 Популација која се истражује:**

#### **3.1.1 Број испитаника**

Клиничка студија спроведена је у Клиници за неврологију ВМА. Пацијенти су пре укључивања у студију потписали образац сагласности за учешће у студији у складу са важећом регулативом Добре клиничке праксе, који је претходно одобрен од Етичког комитета ВМА.

Истраживањем је обухваћено 81 оболелих са дијагнозом клинички дефинитивне МС РР тока, постављеном на основу Мек Доналдових критеријума из 2010. године. Укупна група испитаника сачињена је из две подгрупе:

- подгрупа од 50 пацијената који од постављања дијагнозе МС РР тока добијају имуномодулаторну терапију типа интерферон бета 1б (Бетаферон) и
- подгрупа од 31 пацијената са дијагнозом МС РР тока који до сада нису добијали терапију која модификује природни ток болести.

Испитаници су истог етничког порекла, регрутовани међу болесницима који се испитују и лече у Клиници за неврологију Војномедицинске академије.

#### **3.1.2 Критеријуми за укључивање у истраживање**

##### **Укључујући критеријуми:**

1. Пацијенти оба пола старосне доби између 18 и 55 година
2. Потписан образац информисаног пристанка
3. Дијагноза клинички дефинитивне МС РР тока је постављена према ревидираним Мек Доналдовим критеријумима из 2010. год.
4. EDSS скор  $\leq 6.0$

##### **Искључујући критеријуми:**

1. Друге болести ЦНС-а (осим МС).
2. озбиљнија повреда главе у предходној медицинској историји.

3. Клинички дефинисан релапс основног обољења у протекла 3 месеца.
4. Примена кортикостероидне терапије у протекла 3 месеца.
5. Претходна примена имуномодулаторне терапије, осим IFN $\beta$  у лечењу МС.
6. Предходна историја хепатичке или реналне инсуфицијенције.
7. Предходна историја дијабетес мелитуса.
8. Артеријска хипертензија
9. Озбиљно психијатријско или органско обољење( психозе, депресија, малигна обољења. Скор >10 на „Beck Depression Inventory“ (BDI-II) упитнику.
10. Хронична употреба антиинфламаторних лекова, хормонске терапије, терапије која би утицала на метаболички статус
11. Употреба алкохола и психоактивних супстанци
12. Оштећење слуха.
13. Бинокуларна визуелна активност  $\leq 75\%$ .
14. Трудноћа испитаника.

## **3.2 Протокол**

### **3.2.1 Врста студије**

Клиничка опсервациона студија пресека.

### **3.2.2 Узорковање**

#### **Опис поступка:**

Испитаници су упућени од изабраних неуролога на узорковање крви, физикални и неуролошки преглед и когнитивно тестирање. Све прегледе је обавио исти клинички неуролог, а након потписивања информисаног пристанка пацијената.

Сви демографски податци, наведени у обележјима посматрања, прикупљени су од свих испитаника клиничким интервјуом и упитником дизајнираним за ову студију.

Извршена је провера укључујућих и искључујућих критеријума.

Пацијенти су попунили BDI-II, упитник за процену постојања и тежине депресије која је искључујући критеријум за даље учешће у студији.

Учињен је физикални преглед као и антропометријска мерења (телесна тежина, телесна висина).

Узорковање крви вршено је у раним јутарњим сатима након 12 часовног гладовања и том приликом је испитаницима пласирана венска канила. Одређиване су базалне вредности глукозе пункцијом јагодице прста и базалне вредности инсулина у серуму преко венске каниле.

Потом су учесници замољени да током 3 минута попију раствор који садржи 75g глукозе растворене у 250 ml воде.

Узорковање крви за анализу гликемије и инсулинемије је потом вршено на исти начин, након 30 мин и 120 мин од глукозног оптерећења- ОГТТ. Анализе узорака крви обављене су истог дана, одмах по узорковању.

Из венске крви болесника је идвојен узорак за генетску анализу полиморфизама у гену за АПОЕ.

Учињен је клинички неуролошки преглед са одређивањем EDSS и MSSS скорa.

Спроведено когнитивно тестирање пацијената у мирној соби у преподневним сатима.

Сви прегледи су обављени унутар три узастопна дана.

### **3.3 Обележја посматрања**

#### **3.3.1. Лабораторијске биохемијске и генетске анализе:**

1. Базална концентрација инсулина у серуму ( $I_0$ ) процењивана је након 12 сати гладовања. Након ОГТТ-а одређивана је концентрација инсулина у 30 мин ( $I_{30}$ ) и 120 мин ( $I_{120}$ ). Концентрације инсулина у плазми процењене су коришћењем методе хемилуминесцентног имуноодређивања (енг. chemiluminescence immunoassay) на анализатору марке (Architect, Abbott Diagnostics Division, Wiesbaden, Germany) у Институту за биохемију ВМА.
2. Базална концентрација глукозе ( $G_0$ ) у серуму процењивана је након 12 сати гладовања, ензимском методом, коришћењем аутоанализатора (Dimension RxL Simens Health Care Diagnostics, Erlangen, Germany) радиоимунолошком методом у Институту за биохемију ВМА.



3. Полиморфизми у гену за АПОЕ. Крв за генске анализе узимана је из кубиталне вене и пуна крв са Na-цитратом је замрзнута и чувана на -20 степени С°. Генетске анализе су обављене у Лабораторији за радиобиологију и молекуларну генетику у Институту за нуклеарне науке у Винчи. Генотипизација је обављена методом PCR (енг. polymerase chain reaction) и рестрикционом дигестијом

### **3.3.2. Параметри који су процењени на основу базалних вредности инсулина и глукозе:**

1. Homeostasis Model Assessment (НОМА) је широко прихваћен, суругат, инструмент за процену ИР у клиничким и епидемиолошким студијама који добро корелира са глукозним клампом и минималним моделом као директним и прецизним методама за процену ИР и ИС (145,146).  
НОМА1-ИР индекс представља вредност добијену из производа вредности базалне инсулинемије ( $I_0$  mU/ mL) и базалне гликемије ( $G_0$  mmol/L) подељеног константом 22.5 (19). Инсулинска резистенција у општој популацији детерминисана је вредношћу  $\text{НОМА-ИР} \geq 2.5$  (147).
2. Ажурирани НОМА 2 компјутерски модел коришћен је такође за процену ИР (НОМА2-ИР) као и за одређивање ИС (НОМА2-%S) и функције бета ћелија (НОМА 2-%  $\beta$ ) из базалних вредности глукозе и инсулина. Излаз овог модела је баждарен тако да нормална  $\beta$  ћелијска функција износи 100%, а нормална ИР  $\leq 1$  (148). (<http://www.dtu.ox.ac.uk/Homacalculator/download.php>)

### **3.3.3 Параметри који су добијени из ОГТТ теста:**

1. Глукозна толеранција, где је оштећена толеранција глукозе (ОГТ) дефинисана вредностима  $G_0$  (5.6–6.9 mmol/l) и/или гликемијом у 2h теста  $G_{120}$  (7.8–11.0 mmol/l) (149).
2. Инсулиногени индекс у првих 30 мин теста ( $\text{IGI}_{30'}$ ), као мера прве фазе инсулинског одговора на глукозу, је параметар процене ативности  $\beta$  ћелија. Рана фаза инсулинске секреције рачуна се као количник инкремента концентрације инсулина и концентрације глукозе у првих 30 минута (146).

3. Површина испод криве за инсулин,  $AUC_{INS}$  (енг. area under the curve) и површина испод криве за глукозу,  $AUC_{GLU}$ , дефинисана је вредностима инсулина и глукозе у функцији времена  $t_j$  у различитим временским тачкама ОГТТ-а (0 мин., 30 мин., 120.мин) и израчуната је према правилу трапезоида (150,151).
4. Индекси инсулинске сензитивности: Cederholm index ( $ISI_{CED}$ ) представља меру периферне инсулинске сензитивности и Matsuda index ( $ISI_{MAT}$ ) индекс инсулинске сензитивности целог тела, који рефлектује композитну процену хепатичке и мишићне инсулинске сензитивности (152,153,154).

### 3.3.4 Клиничке оцене и неуропсихолошки тестови:

1. Године старости, пол, степен образовања, пушење цигарета.
2. Индекс телесне масе (BMI) добијен је из количника телесне масе (kg) и површине тела ( $m^2$ )
3. Клинички ток болести (PPMC), трајање болести, примена имуномодулаторне терапије, трајање терапије, укупан број релапса.
4. Степен функционалног неуролошког дефицита оцењен је помоћу Kurtzke-ове скале EDSS (енг. The Expanded Disability Status Scale). која одражава растући функционални неуролошки дефицит са распоном скорa од 0 до 10. Крајњи скор формира се на основу пацијентове способности хода и скорова у појединачним функционалним системима. (155) Неуролошким тестовима и прегледом процењује се дистанца коју пацијент може да пређе при самосталном или асистираним ходу и врши се оцењивање појединачних функционалних система (визуелни, мождано стабло, пирамидни, церебеларни, сензорни, функција сфинктера, ментални); EDSS= 5.5 је граница до које је пацијент способан да хода самостално 100м; EDSS >6 сматран је тежом функционалном онеспособљеношћу и искључујућим критеријумом у овом истраживању.
5. Степен прогресије болести процењен је MSSS (енг. Multiple Sclerosis Severity Score). Вредност се процењује појединачно за сваког болесника на основу табеле која садржи вредности EDSS скорова и трајање болести. MSSS представља

EDSS коригован за дужину трајања болести и користан је метод за поређење група пацијената, флукуације болести (156).

6. Присуство и тежина депресије процењени су применом „Beck Depression Inventory“ (BDI-II) упитника који је сачињен од 21 ставке која процењује карактеристичне знаке и симптоме депресије и који пацијенти сами попуњавају. Распон скорова је од 0 до 36; Скор >10 је био искључујући за учествовање у нашем истраживању (157,158).
7. Когнитивни статус испитаника процењен је коришћењем четири теста, који су део кратке неуропсихолошке батерије The Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests“ (BRB-N)-верзија А, издвојена ради евалуације најчешће оштећених когнитивних домена: комплексна пажња, брзина обраде информација, вербално и визуелно учење и памћење (159,160, 161). Тестови су преведени и клинчки валидни за примену на српском језику. Тестирање је обављао исти неуролог претходно трениран и са искуством у извођењу наведених тестова.

Пацијенти су тестирани по дефинисаном редоследу примене тестова:

7.1 The Selective Remanding Test (SRT)- процењује способност вербалног учења и памћења током шестоструког понављања листе од 12 речи. При сваком наредном понављању испитаник се подсећа само на речи које је у претходном покушају заборавио да наведе. Приликом скоровања постоје три компоненте које су важне у интерпретацији неуропсихолошког дефицита (Long term storage-LTS, Consistence Long Term Retrieval-CLTR, Delay Recall-DR). За реч која је поновљена у току два узастопна покушаја се сматра да је преведена у дугорочно памћење (LTS) од тог тренутка па надаље, без обзира да ли се у наредном покушају понављала или не. Уколико се реч која је већ меморисана као LTS понови при сваком наредном покушају интерпретације листе од 12 речи, дакле свих 6 пута, онда се скорује као CLTR. Речи које су поновљене после 15 минута се скорују као одложени одговори DR (159, 160,162).

7.2 The 10/36 Spatial Recall Test (SPART)- неуропсихолошки тест за процену визуо-просторног учења и памћења. Испитанику се у три наврата током 10 секунди приказује табла са 36 поља од којих је 10 попуњено карактеристично распоређеним црним круговима. Од испитаника се тражи да приликом

сваког покушаја (укупно три у процесу учења) упамти распоред кругова и потом их представи постављањем црних кругова на одговарајућа поља на празној табли. Одложено присећање распореда наведене визуелне шеме процењује се након 15 мин (159, 160, 162).

7.3 The Symbol Digit Modalities Test (SDMT)- неуропсихолошки скрининг тест који служи за процену комплексне пажње, брзина обраде информација, радне меморије и концентрације приликом сложене визуелне претраге. У овом истраживању коришћена је орална верзија теста.

Презентовано је девет различитих симбола и сваком од њих је придружен одговарајући број. Симболи су презентована у низу рандомним редоследом уз понављања. Од пацијента се тражи да сваком симболу, редом, придружи одговарајући број што је тачније и брже могуће. Скорује се број коректних одговора за време од 90 сек (159, 160, 163, 164).

7.4 The Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT 3) је неуропсихолошки тест погодан за процену брзине обраде информације аудитивно презентованог материјала, радне меморије и уједно мери способност задржавања и усмеравања пажње као и селективне инхибиције различитих стимулуса. Тест се састоји од 60 једноцифрених бројева презентованих преко аудио ЦД-а који се рандомно понављају у размаку од 3 секунде. Од испитаника се тражи да сабере два узастопна броја тако што ће сваки наредни број додати претходно регистрованом уз игнорисање вредности претходно израчунатог збира цифара (159, 160, 162).

8. Резултати SRT, SPART, SDMT, PASAT тестова упоређивани са нормативним вредностима установљеним за српску популацију, усклађеним у односу на пол, године старости и степен образовања (164).

Неуспешност на тесту дефинисана је као резултат који је за  $\geq 1$  стандардну девијацију нижи од одговарајуће нормативне вредности.

9. Когнитивни статус испитаника дефинисан је на следећи начин у зависности од броја оштећених когнитивних домена:

- а. Нема когнитивно оштећење- успешан на свим тестовима.
- б. Благ когнитивни дефицит- неуспешност на 1 од 4 теста.
- ц. Когнитивно оштећење- неуспешност на  $\geq 2$  теста.

### 3.4 Статистичка обрада података

У студији ће бити коришћене различите статистичке методе у зависности од дефинисаних циљева. Учесталост категоријских, односно независних варијабли биће одређена методом пребројавања (engl. gene counting method). За испитивање слагања дистрибуција добијених учесталости у групама испитиваног узорка биће примењен је  $\chi^2$  тест.

Дистрибуција вредности континуалних, односно зависних варијабли биће тестирана Колмогоров-Смирнов тестом. Релација између вредности категоријских и континуалних варијабли биће тестирана Т-тестом или анализом варијансе (ANOVA), уколико су вредности континуалних варијабли у нормалној расподели, или применом Mann–Whitney U теста или Kruskal-Wallis непараметријске ANOVA-е уколико вредности континуалних варијабли нису у нормалној расподели. За испитивање повезаности континуалних варијабли биће коришћена Пирсонова и Спирманова корелациона анализа. Вредности фенотипских варијабли биће представљене као бројеви и проценти, или као средња вредност са стандардном девијацијом ( $\pm$ SD). Униваријатна и мултиваријатна регресија ће бити коришћена за израчунавање односа шанси (коэффициент регресије) OR (engl. Odds Ratio), са интервалом поузданости (интервал поверења) 95% ( $\pm$ 95% CI, engl. Confidence Interval), који је мера асоцијације независних и зависних варијабли. У свим статистичким тестовима, вредност вероватноће  $p < 0.05$  сматраће се значајном. Све статистичке анализе биће урађене коришћењем програма "Statistica Software" верзија 8.0 ("Stat Soft Inc.") и Excel програмом.

**IV**  
**РЕЗУЛТАТИ**

#### 4.1. Основне карактеристике испитаног узорка оболелих од мултипле склерозе

У Табели 1. су приказани демографски и клинички параметри оболелих од МС укључених у студију. У испитаном узорку пацијената са МС пацијенти који нису лечени имају значајно краће трајање болести од групе која је на терапији ( $p=0.02$ ) (Табела 1.). За остале клиничке и демографске параметре приказане Табели 1. није утврђена значајна разлика између две подгрупе пацијената.

**Табела 1.** Демографске и клиничке карактеристике испитаника оболелих од МС

| Демографске и клиничке карактеристике  | Пацијенти на терапији<br>n=50 | Нелечени пацијенти<br>n=31 | Сви пацијенти<br>n=81 |
|--|-------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Пол, Ж/М n(%) <sup>§</sup>             | 21(42.0)/29 (58.0)            | 17 (54.8)/14 (45.2)        | 38 (46.9)/43 (53.1)   |
| Старост (године)                       | 38.14±9.27                    | 35.19±9.92                 | 37.01±9.57            |
| ВМИ (kg/m <sup>2</sup> )               | 23.81±3.66                    | 23.71±3.61                 | 23.77±3.62            |
| Трајање болести (године)               | 9.3±5.95                      | 6.21±5.18*                 | 8.12± 5.83            |
| Трајање терапије (месеци) <sup>#</sup> | 58.7± 45.1                    |                            |                       |
| Пушење, n (%) <sup>§</sup>             | 30 (60.0)/20 (40.0)           | 20 (64.5)/11 (35.5)        | 30 (37.03)            |
| Године школовања                       | 13.63±2.15                    | 13.45±2.20                 | 13.56±2.16            |
| EDSS <sup>#</sup>                      | 2.56±1.18                     | 2.56±1.09                  | 2.56±1.14             |
| MSSS <sup>#</sup>                      | 3.59± 2.07                    | 4.48±2.13                  | 3.93±2.13             |
| Број релапса <sup>#</sup>              | 3.6±3.2                       | 3.7±4.5                    | 3.7 ±4.1              |
| НОМА1-IR, n (%)                        | 13 (26.0)                     | 6 (19.4)                   | 19 (23.46)            |
| НОМА2-IR, n (%)                        | 27 (54.0)                     | 12 (38.7)                  | 39 (48.14)            |
| Оштећена ГТ, n (%)                     | 12 (24.0)                     | 8 (25.8)                   | 20 (24.69)            |

Вредности континуалних параметара су представљене као средња вредност±стандардна девијација; n-број пацијената, BMI- индекс телесне масе, EDSS - Expanded Disability Status Scale, MSSS-Multiple Sclerosis Severity Score, HOMA-IR- Homeostasis Model Assessment индекс инсулинске резистенције, ГТ-глукозна толеранција, t-тест,<sup>§</sup>  $\chi^2$ ,<sup>#</sup> Mann-Whitney U тест, \* $p<0.05$

У Табели 2. су приказани параметри метаболизма инсулина и глукозе код пацијената оболелих од МС укључених у студију

**Табела 2.** Параметри метаболизма глукозе и инсулина испитаника оболелих од МС

|                              | Пацијенти   |
|------------------------------|-------------|
|                              | n=81        |
| HOMA1-IR                     | 2.08 ± 1.29 |
| HOMA2-IR                     | 1.18 ± 0.68 |
| ISI <sub>MAT</sub>           | 5.61±2.37   |
| ISI <sub>CED</sub>           | 53.35±13.27 |
| AUC <sub>INS</sub>           | 90.11±47.84 |
| AUC <sub>GLU</sub>           | 14.70±2.63  |
| IGI <sub>30'</sub> (mU/mmol) | 17.35±29.51 |

Вредности континуалних параметара су представљене као средња вредност± стандардна девијација; n-број пацијената, HOMA-IR- индекс инсулинске резистенције , ISI-индекс инсулинске сензитивности, AUC-површина испод криве, INS-инсулин, GLU- глукоза, IGI<sub>30'</sub>. инсулиногени индекс у 30. мин.

Не постоји разлика између мушкараца и жена у средњим вредностима параметара метаболизма глукозе и метаболизма инсулина, осим граничне значајности у разлици вредности AUC<sub>GLU</sub> која је код жена нижа него код мушкараца (sr. vr. ± SD 14.08±2.20 у односу на 15.26± 2.87, p=0.046).

#### **4.2 Когнитивни статус испитаника оболелих од мултипле склерозе**

Постојање и тежина когнитивног оштећења код пацијената са МС је дефинисано као одсуство когнитивног оштећења, благи когнитивни дефицит и когнитивно оштећење у на основу постигнућа на неуропсихолошким тестовима процене.



**Tabela 3.** Когнитивни статус пацијената са МС у односу на примену имуномодулаторне терапије INFβ 1b

| Тежина оштећења                  | Th IFN beta<br>n (%) | Нелећени<br>n (%) | P    | Укупно<br>n (%) |
|----------------------------------|----------------------|-------------------|------|-----------------|
| Нема оштећења                    | 16 (32.00)           | 8 (25.81)         | 0.70 | 24 (29.63)      |
| Благи дефицит, 1 тест            | 16 (32.00)           | 9 (29.03)         |      | 25 (30.86)      |
| Когнитивно оштећење<br>≥ 2 testa | 18 (36.00)           | 14 (45.16)        |      | 32 (39.51)      |

n-број пацијената, Th-терапија, IFN- интерферон, p-  $\chi^2$

Испитана је разлика дистрибуције присуства и тежине когнитивног оштећења у групи која је на терапији у односу на групу пацијената која није лечена, и није утврђено да постоји статистички значајна разлика (Табела 3.). Примећено је да у групи која није лечена има мање пацијената који немају когнитивно оштећење и више пацијената са когнитивним оштећењем, међутим уочене разлике нису статистички значајне.

#### 4.3 Образац когнитивног оштећења испитаника са мултиплом склерозом

Испитана је учесталост неуспешности у појединачним когнитивним доменима (вербална и визуелна меморија, пажња, брзина обраде информација).

**Табела 4.** Фреквенција неуспешности на појединачним когнитивним тестовима између пацијената лечених INFβ 1b и пацијената који нису лечени.

| Неуспех на тесту | Th IFNβ 1b<br>n (%) | Нелечени<br>n (%) | P    |
|------------------|---------------------|-------------------|------|
| SRT              | 18 (36.00)          | 14 (45.16)        | 0.41 |
| SPART            | 31 (62.00)          | 18 (58.06)        | 0.72 |
| SDMT             | 11 (22.00)          | 9 (29.03)         | 0.48 |
| PASAT 3          | 4 (8.33)            | 6 (19.35)         | 0.15 |

n-број пацијената, Th-терапија, IFN-интерферон, p-  $\chi^2$ , SRT-selective remanding test, SPART- spatial recall test, SDMT- symbol digit modalities test, PASAT 3- paced auditory serial addition test 3s.

Није утврђена статистички значајна разлика у проценту успешности на појединачним испитаним когнитивним тестовима између пацијената на терапији и пацијената који нису лечени (Табела 4).

У испитаном узорку пацијената 70.37 % је имало лош резултат на бар једном од тестова. Когнитивни дефицит детектован на бар једном од меморијских тестова је присутан код 55 пацијената што чини 67.9 % испитаника. Од тога је 32 пацијента (39.51%) имало лош резултат на тесту вербалне меморије, а 49 (60.49%) је имало лош резултат на тесту визуелне меморије (Табела 4). Утврђено је да жене оболеле од МС у значајно већем проценту имају лошији резултат на тесту визуелне меморије од мушкараца (76.32 vs. 46.51,  $p=0.006$ ).

Пол је испитан као потенцијални фактор разлика и за успешност у осталим испитаним тестовима когнитивног статуса, као и за демографске и клиничке показатеље (доб, године школовања, трајање болести и прогресију МС) и није утврђено да постоји разлика између мушкараца и жена.

У табели 5. је дат приказ средњих вредности резултата примењених когнитивних тестова код испитаних болесника са МС и средње нормативне вредности здраве контролне групе из литературе, за популацију Србије (164).

**Табела 5.** Резултати когнитивних тестова испитаника у односу на нормативе у популацији Србије

|         | Пацијенти<br>n=81 | Контролна група <sup>\$</sup><br>n=120 |
|---------|-------------------|--|
| SRTLTS  | 48.69 ± 11.59     | 44.9±8.6                               |
| SRTCTRL | 38.80 ± 15.09     | 40.2±9.3                               |
| SRTDR   | 8.95 ±1.90        | 8.6±1.4                                |
| SPART   | 19.26 ±4.27       | 20.6±2.6                               |
| SPARTD  | 6.60±2.21         | 7.6±0.9                                |
| SDMT    | 50.28±14.84       | 49.8±7.3                               |
| PASAT3  | 46.79±14.34       | 36.4±6.6                               |

<sup>\$</sup>-средње кориговане нормативне вредности ± стандардна девијација резултата когнитивних тестова за популацију Србије (164). SRTLTS- selective remanding test-long term storage, SRTCLTR- selective remanding test-consistent long term retrieval, SRTDR selective remanding test-delayed recall, SPART spatial recall test, SDMT- symbol digit modalities test, PASAT 3- paced auditory serial addition test 3s.

#### 4.4 Фактори когнитивног оштећења код испитаника са мултиплом склерозом

##### 4.4.1 Асоцијација демографских и клиничких показатеља болести са когнитивним статусом испитаника

Испитани су демографски параметри и клинички показатељи тока и тежине болести у односу на постојање и тежину когнитивног оштећења код оболелих од МС.

**Табела 6.**

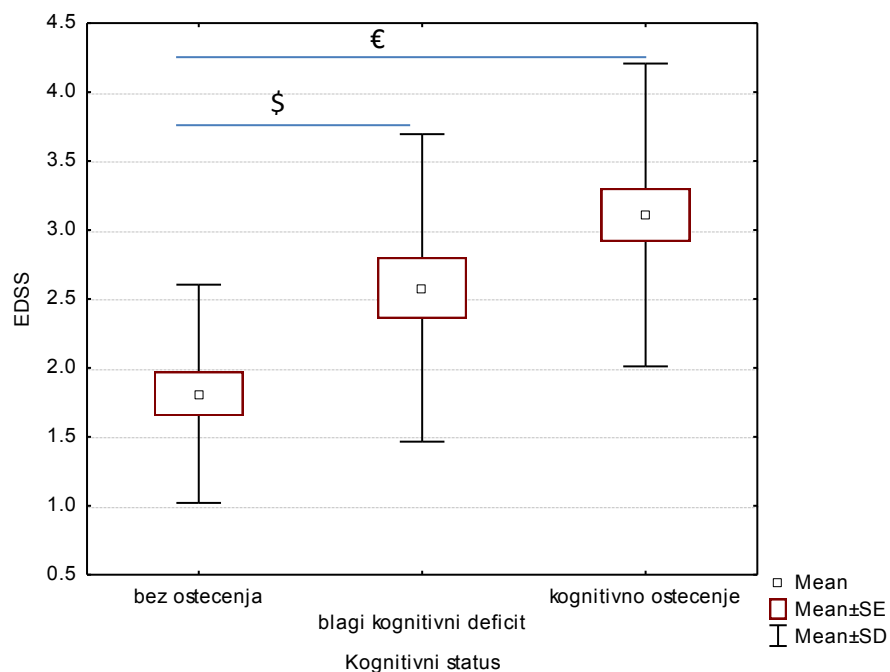
Демографски и клинички параметри у односу на когнитивни статус пацијената са МС

| Демографски и клинички показатељи | Нема оштећење        | Благи ког. дефицит    | Когнитивно оштећење     | p     |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|-------|
| Пол, Ж/М n(%) <sup>\$</sup>       | 9 (23.68)/12 (34.88) | 13 (34.21)/12 (27.91) | 16(42.11)/16 (37.21)    | 0.54  |
| старост                           | 32.96 ±7.13          | 35.40±7.23            | 41.31±11.15*            | 0.002 |
| Године школовања <sup>#</sup>     | 13.92±2.15           | 14.16±2.01            | 12.81±2.12 <sup>€</sup> | 0.03  |
| Дуж.трајања болести               | 6.68±4.15            | 7.96±5.48             | 9.31±6.98               | 0.15  |
| EDSS <sup>#</sup>                 | 1.81±0.79            | 2.58±1.12             | 3.11±1.10               | 0.001 |
| MSSS                              | 2.93±1.44            | 4.13±2.24             | 4.54±2.26               | 0.014 |
| Број релапса <sup>#</sup>         | 3.58±4.29            | 3.08 ±2.87            | 4.22±4.66               | 0.52  |
| Трајање терапије <sup>#</sup>     | 72.38                | 47.87                 | 56.22                   | 0.7   |

Вредности континуалних параметара су представљене као средња вредност± стандардна девијација, EDSS - Expanded Disability Status Scale, MSSS-Multiple Sclerosis Severity Score, <sup>\$</sup>  $\chi^2$ , <sup>#</sup>Mann-Whitney U тест, ANOVA, \*LSD post-hoc, когнитивно оштећење vs. нема оштећење, p=0.001; когнитивно оштећење vs. благи когнитивни дефицит, p= 0.016; <sup>€</sup> LSD post-hoc, когнитивно оштећење vs. благи когнитивни дефицит, p=0.02

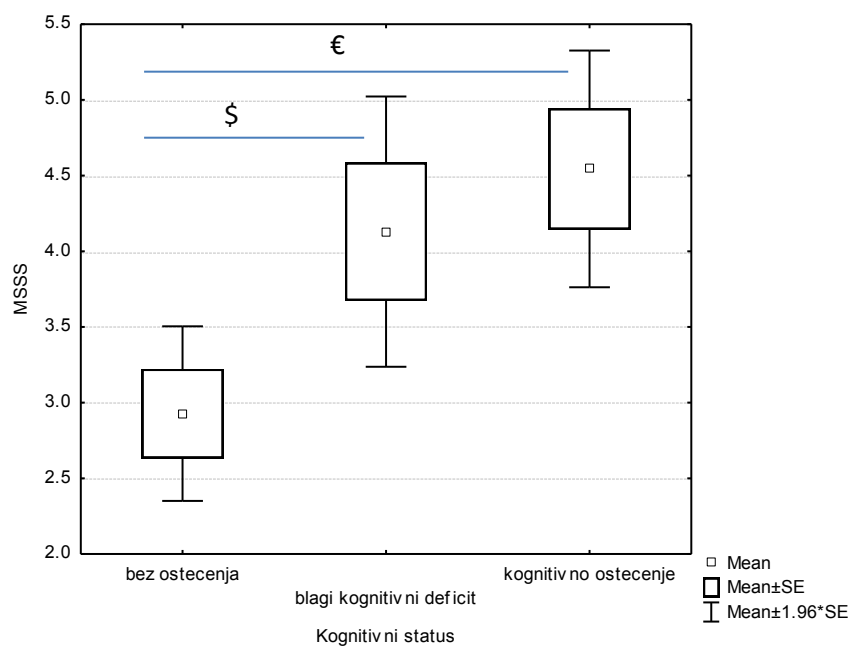
Утврђено је да су пацијенти са когнитивним оштећењем значајно старији од пацијената са благим когнитивним дефицитом и пацијената без когнитивног оштећења. Иста група пацијената има мањи степен образовања од пацијената са благим когнитивним дефицитом, као и значајно већи степен функционалне онеспособљености (График 1.) и прогресије болести (График 2.).

**График 1.** Когнитивни статус испитаника и EDSS



Kruskall Wallis ANOVA  $p=0.001$ , без оштећења vs. благи ког. дефицит,  $p=0.04^{\$}$ ; без оштећења vs. когнитивно оштећење,  $p=0.00007^{\text{€}}$

**График 2.** Когнитивни статус испитаника и MSSS



ANOVA  $p=0.015$ , LSD post-hoc, без оштећења vs. благи когнитивни дефицит,  $p=0.04^{\$}$ ; без оштећења vs. когнитивно оштећење,  $p=0.004^{\text{€}}$

#### 4.4.2 Корелације клиничких и демографских показатеља са резултатима појединачних когнитивних тестова

Испитане су корелације демографских и клиничких показатеља са резултатима на појединачним когнитивним тестовима. Резултати су приказани у Табели 8.

**Табела 7.** Корелације клиничких и демографских показатеља са резултатима појединачних когнитивних тестова

| Демографски и клинички показатељи | R SRT LTS | R SRT CTRL | SRT DR  | SPART   | SPART D | SDMT     | PASAT   |
|-----------------------------------|-----------|------------|---------|---------|---------|----------|---------|
| старост                           | -0.43***  | -0.40**    | -0.33** | -0.26*  | -0.32** | -0.24*   | ns      |
| Године школовања                  | ns        | ns         | 0.31**  | 0.32**  | ns      | 0.30**   | 0.40**  |
| Дуж. трајања болести              | -0.38**   | -0.30**    | -0.24*  | ns      | ns      | ns       | ns      |
| EDSS                              | -0.31**   | -0.39**    | -0.32** | -0.33** | -0.26*  | -0.45*** | -0.31*  |
| MSSS                              | ns        | ns         | ns      | ns      | ns      | -0.33**  | -0.34** |

Вредности у табели представљају коефицијент корелације-R, ns-где није утврђена значајна корелација између два параметра није представљен коефицијент корелације, EDSS - Expanded Disability Status Scale, MSSS-Multiple Sclerosis Severity Score, SRTLTS-selective remanding test-long term storage, SRTCLTR- selective remanding test-consistent long term retrieval, SRTDR- selective remanding test-delayed recall, SPART spatial recall test, SDMT- symbol digit modalities test, PASAT 3- paced auditory serial addition test 3s. Spearman test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$

Све три компоненте теста вербалне меморије значајно негативно корелирају са трајањем болести (Табела 8). Доб значајно негативно корелира са резултатима свих тестова осим теста. EDSS корелира значајно негативно са резултатима свих примењених когнитивних тестова. MSSS корелира значајно негативно са резултатима SDMT и PASAT3 тестова. Укупан број релапса у групи испитаних пацијената са МС није у значајној корелацији са резултатима појединачних когнитивних тестова (резултати нису приказани). Трајање терапије значајно позитивно корелира само са резултатима PASAT3 теста ( $n=50$ , коефицијент корелације 0.44,  $p=0.0015$ ).

#### 4.4.3. Имуномодулаторна терапија (IFN $\beta$ 1b) и когниција

Урађена је анализа резултата свих когнитивних тестова у односу на примену имуномодулаторне терапије (IFN $\beta$  1b). Утврђено је да пацијенти који су лечени имају статистички значајно боље постигнуће на PASAT 3 тесту (Табела 8.)

**Табела 8.** Средње вредности когнитивних тестова у односу на терапију IFN $\beta$  1b

| Th IFN $\beta$<br>1b | SRTLTS            | SRTCLTR           | SRTDR <sup>#</sup> | SPART            | SPARTD          | SDMT <sup>#</sup> | PASAT3 <sup>#</sup> |
|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| Лечени               | 48.92 $\pm$ 11.59 | 39.38 $\pm$ 13.64 | 8.98 $\pm$ 1.68    | 18.98 $\pm$ 4.80 | 6.64 $\pm$ 2.32 | 51.22 $\pm$ 14.45 | 49.59 $\pm$ 13.61   |
| Нелечени             | 48.32 $\pm$ 13.29 | 37.87 $\pm$ 17.37 | 8.90 $\pm$ 2.23    | 19.71 $\pm$ 3.26 | 6.54 $\pm$ 2.06 | 48.77 $\pm$ 15.57 | 42.35 $\pm$ 14.56   |
| p                    | 0.82              | 0.66              | 0.78               | 0.46             | 0.86            | 0.31              | 0.03                |

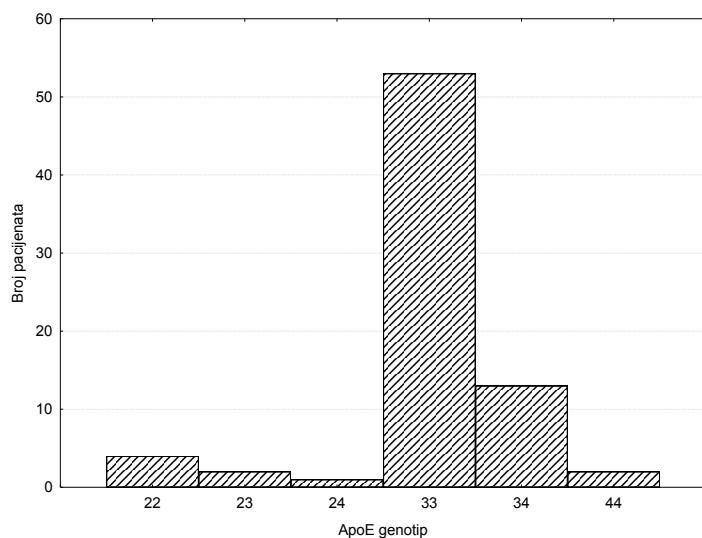
Вредности континуалних параметара су представљене као средња вредност $\pm$  стандардна девијација, t-тест, <sup>#</sup>Mann-Whitney U тест.

#### 4.5 Полиморфизам у гену за АПОЕ код оболелих од релапсно ремитентне мултипле склерозе

##### 4.5.1 Учесталост генотипова и алела полиморфизма у гену за АпоЕ код испитаника са мултиплом склерозом релапсно ремитентног тока

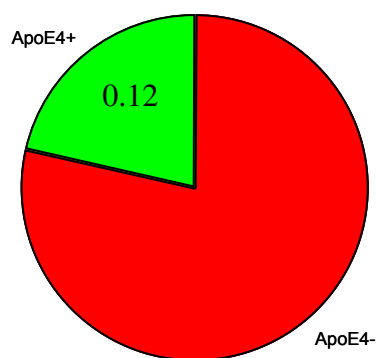
У групи оболелих од МС укључених у студију је испитана учесталост генотипова и алела полиморфизма у гену за АпоЕ. Фреквенције генотипова и алела полиморфизма у гену за АпоЕ детектоване код испитаника у овој студији (График 3.) су у складу са фреквенцијама претходно утврђеним у популацији Србије (194).

**График 3.** Фреквенције генотипова полиморфизма у гену за АПОЕ оболелих од МС



| Генотип<br>АПОЕ | n  | %    |
|-----------------|----|------|
| 22              | 4  | 5.3  |
| 23              | 2  | 2.7  |
| 24              | 1  | 1.4  |
| 33              | 53 | 70.6 |
| 34              | 13 | 17.4 |
| 44              | 2  | 2.6  |

**График 4.** Фреквенција присуства алела АПОЕ4 код оболелих од РР МС



Frekvencija odsustva/prisustva alela ApoE4

У испитаној групи оболелих од РР МС алел АпоЕ4 у гену за АпоЕ је присутан са фреквенцијом од 0.12.

**Табела 9.** Демографски и клинички показатељи у односу на присуство или одсуство алела АПОЕ4 у гену за АПОЕ

| Демографски и клинички показатељи | АПОЕ4-      | АПОЕ4+      | P    |
|-----------------------------------|-------------|-------------|------|
| Пол Ж/М, % <sup>§</sup>           | 80/77.5     | 20/22.5     | ns   |
| старост                           | 36.418±9.34 | 39.94±9.92  | 0.19 |
| Године школовања                  | 13.29±2.01  | 14.13±2.68  | 0.20 |
| Дужина трајања болести            | 8.42±6.33   | 7.880±3.76  | 0.78 |
| EDSS#                             | 2.62± 1.2   | 2.41± 1.04  | 0.65 |
| MSSS                              | 3.91±2.11   | 3.74±1.96   | 0.78 |
| Број релапса#                     | 3.59±4.15   | 4.38±4.45   | 0.58 |
| Трајање терапије#                 | 54.15±45.02 | 77.00±42.84 | 0.12 |
| BMI                               | 23.89±3.75  | 23.30±3.26  | 0.55 |

Вредности континуалних параметара су представљене као средња вредност± стандардна девијација, EDSS - Expanded Disability Status Scale, MSSS-Multiple Sclerosis Severity Score, t-тест, <sup>§</sup>  $\chi^2$ , #Mann-Whitney U тест.

Није уочена статистички значајна разлика ни за један од анализирани параметара, у односу на присуство алела АпоЕ4, који су представљених у Табели 9.

#### 4.5.2 Алел $\epsilon 4$ у гену за АПОЕ и когниција у мултиплој склерози

Анализирана је повезаност присуства  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ са постојањем и тежином когнитивног оштећења као и оштећења у појединачним когнитивним доменима (вербална и визуелна меморија, пажња, брзина обраде информација) код испитаника оболелих од МС.

**Табела 10.** Постигнућа на појединачним когнитивним тестовим у односу на присуство алела АПОЕ4

| n=75    | SRTLTS     | SRTCLTR     | SRTDR <sup>#</sup> | SPART      | SPARTD    | SDMT <sup>#</sup> | PASAT3 <sup>#</sup> |
|---------|------------|-------------|--------------------|------------|-----------|-------------------|---------------------|
| АпоЕ4 - | 48.5±11.92 | 38.57±15.00 | 8.88±1.94          | 19.65±4.28 | 6.67±2.33 | 50.20±15.37       | 46.74±14.71         |
| АпоЕ4 + | 48.37±9.79 | 38.25±12.92 | 8.94±1.73          | 18.44±3.91 | 6.12±1.50 | 50.81±14.85       | 48.38±12.44         |
| p       | 0.97       | 0.94        | 0.76               | 0.31       | 0.38      | 0.75              | 0.63                |

Вредности су представљене као средње вредности±стандардна девијација, n-број пацијената, t-тест, <sup>#</sup> Mann-Whitney U тест

Није утврђена статистички значајна разлика у постигнићима на когнитивним тестовима у односу на присуство или одсуство алела АпоЕ4 у гену за АпоЕ (Табела 10.).

Када су резултати сваког од когнитивних тестова категорисани као успешни и неуспешни и упоређена фреквенција неуспешности на тесту са фреквенцијом присуства алела АПОЕ4, такође није утврђена статистички значајна разлика (резултати нису приказани).

Испитана је и повезаност присуства алела АПОЕ4 у гену за АПОЕ са оштећењем у појединачним когнитивним доменима (вербална и визуелна меморија, пажња, брзина обраде информација). Није утврђена значајно већа фреквенција лошијих резултата код пацијената носиоца алела АпоЕ4 ни у једном од испитаних когнитивних домена.

#### 4.6 Метаболизам глукозе и инсулина у мултиплој склерози

Код испитаника оболелих од МС анализирано је присуство поремећаја метаболизма глукозе и инсулина као и њихова повезаност са применом имуномодулаторне терапије IFN $\beta$  1b, демографским параметрима и клиничким показатељима тежине и тока болести.



#### 4.6.1 Толеранција глукозе код испитаника са мултиплом склерозом

**Табела 11.** Демографски и клинички параметри у односу на толеранцију глукозе код испитаника са МС

| Демографски и клинички показатељи | Добра толеранција глукозе | Нарушена толеранција глукозе | р     |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------|-------|
| Пол, Ж/М, % <sup>\$</sup>         | 76.32/74.42               | 23.68/25.58                  | 0.85  |
| старост                           | 35.25±9.11                | 42.40±9.12                   | 0.003 |
| Дуж. трајања болести              | 7.89±5.78                 | 8.80±6.10                    | 0.55  |
| EDSS <sup>#</sup>                 | 2.41±1.10                 | 3.03±1.19                    | 0.05  |
| MSSS                              | 3.71±1.95                 | 4.61±2.51                    | 0.10  |
| Број релапса <sup>#</sup>         | 3.64±3.64                 | 3.80±5.22                    | 0.97  |
| Трајање терапије <sup>#</sup>     | 60.37±45.74               | 53.50±44.62                  | 0.61  |
| Пушење, (%) <sup>\$</sup>         | 28.00                     | 22.60                        | 0.42  |
| BMI                               | 23.74±3.82                | 23.86±2.98                   | 0.90  |

Вредности континуалних параметара су представљене као средња вредност± стандардна девијација, BMI- индекс телесне масе, EDSS - Expanded Disability Status Scale, MSSS-Multiple Sclerosis Severity Score , t-тест, <sup>\$</sup>  $\chi^2$ , <sup>#</sup>Mann-Whitney U тест

Уочено је да су пацијенти код којих је детектована патолошка глукозна толеранција били значајно старији и да су имали значајно већу вредност EDSS.

**Табела12.** Фреквенција оштећене глукозне толеранције код пацијената са МС у односу на примену терапије INF $\beta$  1b.

|                         | Добра толеранција глукозе | Оштећена толеранција глукозе | Укупно    | р    |
|-------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------|------|
| Th INF $\beta$ 1b,n (%) | 38 (76.00)                | 12 (24.00)                   | 50 (61.7) | 0.85 |
| Нелечени, n (%)         | 23 (74.19)                | 8 (25.81)                    | 31 (38.3) |      |

n-број пацијената, Th-терапија, IFN- интерферон, р-  $\chi^2$

Није утврђена статистички значајна разлика у фреквенцији патолошке глукозне толеранције код испитаних пацијената са МС у односу на примену терапијског третмана.

Испитани су и параметри метаболизма глукозе ( $G_0$ ,  $G_{30}$ ,  $G_{120}$ ,  $AUC_{GLU}$ ) у односу на терапију INF $\beta$  1b и нису утврђене значајне разлике (резултати нису представљени).

#### 4.6.2 Инсулинска резистенција код испитаника са мултиплом склерозом

**Табела 13.** Демографски и клинички параметри у односу на инсулинску резистенцију

| Клиничко демографски показатељи | Нема инсулинску резистенцију | Постојање инсулинске резистенције | р    |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------|
| Пол,Ж/М % <sup>\$</sup>         | 73.68/79.07                  | 26.32/20.93                       | 0.57 |
| Старост                         | 36.90±9.97                   | 37.37±8.38                        | 0.85 |
| Дуж. трајања болести            | 7.75±5.93                    | 9.32±5.49                         | 0.31 |
| EDSS <sup>#</sup>               | 2.55±1.17                    | 2.61±1.09                         | 0.74 |
| MSSS                            | 3.99±2.22                    | 3.75±1.80                         | 0.68 |
| Број релапса <sup>#</sup>       | 3.50±3.60                    | 4.26±5.35                         | 0.72 |
| Трајање терапије <sup>#</sup>   | 57.78±46.10                  | 61.38±43.86                       | 0.62 |
| BMI                             | 23.43±3.33                   | 24.83±4.33                        | 0.14 |

Вредности континуалних параметара су представљене као средња вредност± стандардна девијација, BMI- индекс телесне масе, EDSS - Expanded Disability Status Scale, MSSS-Multiple Sclerosis Severity Score , t-тест, <sup>\$</sup>  $\chi^2$ , <sup>#</sup>Mann-Whitney U тест .

Ни један од испитаних демографских и клиничких параметара оболелих од МС се није разликовао код пацијената код којих је детектована ИП у односу на пацијенте без ИП. Испитане су корелације клиничких параметара (EDSS, MSSS, број релапса и дужине трајања болести). Уочено је да постоји значајна позитивна корелација дужине трајања болести са HOMA1-IR (Spearman R=0.24, p=0.03) и тренд позитивне корелације укупног броја релапса са HOMA1-IR вредностима (Spearman R=0.20, p=0.06).

**Табела 14.** Фреквенција инсулинске резистенције код пацијената у односу на терапију

|                   | Нема инсулинску резистенцију | Постојање инсулинске резистенције | Укупно    | р    |
|-------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------|------|
| Th INFβ 1b, n (%) | 37 (75.5)                    | 13 (25.5)                         | 50 (61.7) | 0.49 |
| Нелечени, n (%)   | 25 (80.6)                    | 6 (19.4)                          | 31 (38.3) |      |

n-број пацијената, Th-терапија, IFN- интерферон, р-  $\chi^2$

Није утврђена статистички значајна разлика у фреквенцији инсулинске резистенције код испитаних пацијената са МС у односу на примену терапијског третмана.

Испитани су и појединачни параметри метаболизма инсулина ( $I_0$ ,  $I_{30}$ ,  $I_{120}$ ,  $AUC_{INS}$ ,  $ISI_{CED}$  index,  $ISI_{MAT}$ ) у односу на терапију ИФН Бета и нису утврђене значајне разлике (резултати нису представљени).

Двосмерном анализом варијансе је испитан ефекат терапије и глукозне толеранције (Th x ГТ,  $p=0.28$ ) и терапије и инсулинске резистенције (Th x ИП,  $p= 0.86$ ) на клиничке параметре и није утврђено да постоји значајан комбиновани ефекат испитаних предиктора на клиничке параметре (трајање болести, укупан број релапса EDSSи MSSS).

#### 4.6.3 Асоцијација когнитивног статуса са толеранцијом глукозе и инсулинском резистенцијом

| ГТ               | SRTLTS      | SRTLCTR     | SRTDR <sup>#</sup> | SPART      | SPARTD    | SDMT <sup>#</sup> | PASAT3 <sup>#</sup> |
|------------------|-------------|-------------|--------------------|------------|-----------|-------------------|---------------------|
| Нормална<br>n=61 | 48.87±12.31 | 39.85±15.95 | 8.95±2.04          | 19.82±4.01 | 6.92±2.19 | 51.54±15.06       | 45.90±13.79         |
| Оштећена<br>n=20 | 48.15±9.27  | 35.6 ±11.90 | 8.95±1.39          | 17.55±4.66 | 5.65±2.03 | 46.45±13.83       | 49.63±16.04         |
| p                | 0.81        | 0.28        | 0.81               | 0.038      | 0.02      | 0.11              | 0.87                |

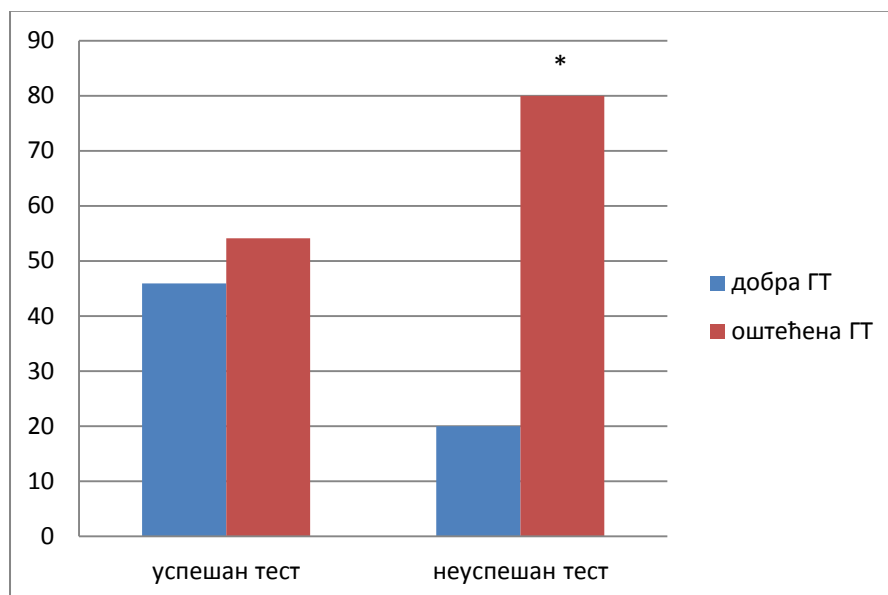
**Табела 15.** Резултати когнитивних тестова у односу на глукозну толеранцију.

Вредности су представљене као средње вредности±стандардна девијација, n-број пацијената, ГТ- глукозна толеранција, t-тест, <sup>#</sup> Mann-Whitney U test

Постигнућа на појединачним тестовима у односу на глукозну толеранцију, у групи која толерише и групи која не толерише глукозу у односу на континуалне вредности тестова су приказане у Табели 14. Утврђен је статистички значајно лошији резултат на SPART и SPARTD тестовима код пацијената са МС који имају оштећену толеранцију на глукозу.

Испитана је повезаност присуства оштећене глукозне толеранције са оштећењем у појединачним когнитивним доменима (вербална и визуелна меморија, пажња, брзина обраде информација). Утврђена је значајно већа заступљеност пацијената који су имали лошије постигниће на тесту за визуелну меморију у групи која је имала оштећену глукозну толеранцију у односу на групу која је имала нормалну глукозну толеранцију (80% vs. 54.10%,  $p=0.04$ , График 5).

**График 5.** Постигнуће на тесту визуелне меморије у односу на глукозну толеранцију



\*  $\chi^2$ ,  $p=0.04$

Постигнућа на појединачним когнитивним тестовима у односу на инсулинску резистенцију, у групи која има инсулинску резистенцију и групи која нема инсулинску резистенцију, у односу на континуалне вредности резултата тестова су приказане у Табели 16.

**Табела 16.** Резултати когнитивних тестова у односу на инсулинску резистенцију

| ИР              | SRTLTS       | SRTLCTR     | SRTDR #   | SPART      | SPARTD    | SDMT #      | PASAT3 #    |
|-----------------|--------------|-------------|-----------|------------|-----------|-------------|-------------|
| нема<br>n=62    | 48.65±11.51  | 39.35±15.20 | 9.02±2.06 | 19.35±4.21 | 6.69±2.15 | 51.23±15.27 | 46.43±15.33 |
| постоји<br>n=19 | 48.845±12.15 | 37±14.98    | 8.741.24  | 18.95±4.56 | 6.32±2.43 | 47.21±13.27 | 47.95±10.81 |
| p               | 0.95         | 0.56        | 0.44      | 0.72       | 0.52      | 0.45        | 0.97        |

Вредности су представљене као средње вредности±стандардна девијација, ИР-инсулинска резистенција, n-број пацијената, t-тест, # Mann-Whitney U тест

Није детектована значајна разлика у резултатима тестова у односу на инсулинску резистенцију.

Испитана је повезаност присуства инсулинске резистенције са оштећењем у појединачним когнитивним доменима (вербална и визуелна меморија, пажња, брзина обраде информација). Није утврђена значајно већа фреквенција лошијих резултата код пацијената са инсулинском резистенцијом ни у једном од испитаних когнитивних домена.

#### 4.6.4 Асоцијација осталих параметара метаболизма глукозе и инсулина са постигнућима на појединачним тестовима.

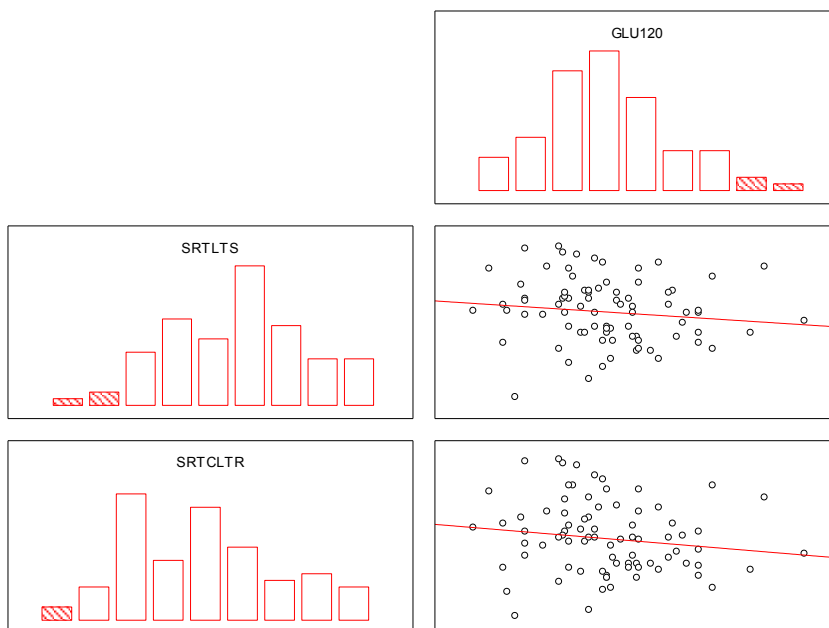
Остали испитани параметри метаболизма глукозе, који подразумевају вредности глукозе по временским тачкама ОГТТ-а, инсулински одговор на глукозну стимулацију и индексе инсулинске сензитивности анализирани су у односу на успешност на когнитивним тестовима, укључујући и подтестове, који су кодирани као бинарна варијабла.

Пацијенти који су имали лош резултат на SDMT тесту имали су значајно ниже вредности Cederholm-ovog индекса ( $p=0.04$ ).

Није детектована значајна разлика у постигнућима осталих тестова у односу на све остале испитане параметре метаболизма глукозе и инсулина.

Када су резултати појединачних когнитивних тестова, укључујући и подтестове, као континуалне вредности корелиране са континуалним вредностима анализираних параметара метаболизма глукозе и инсулина није утврђена статистички значајна корелација ни за један од тестова ни са једним од испитаних параметара. Ипак, примећен је тренд негативне корелације резултата тестова SRTLTS и SRTCTRL са вредностима  $G_{120}$  (Графикб).

**График 6.** Корелација резултата SRTLTS и SRTCLTR тестова са вредностима  $G_{120}$



SRTLTS, Spearman  $R=-0.21$ ,  $p=0.06$ ; SRTCLTR, Spearman  $R=-0.20$ ,  $p=0.07$

#### 4.7 Глукозну толеранција, инсулинска резистенција, алел АПОЕ4 и когнитивни статус испитаника са мултиплом склерозом

Испитана је заступљеност, глукозне толеранције, инсулинске резистенције и алела АпоЕ4 код испитаника са МС у односу на присуство и тежину когнитивног оштећења градираног према установљеном критеријуму (нема когнитивног уштећења, благи когнитивни дефицит, когнитивно оштећење).

**Табела 17.** Когнитивни статус испитаника у односу на глукозну толеранцију, инсулинску резисенцију и алел АпоЕ4

|           | Нема оштећење<br>n (%) | Благи когнитивни<br>дефицит<br>n (%) | Когнитивно<br>оштећење<br>n (%) | p    |
|-----------|------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|------|
| ГТ +/-    | 3 (15.00)/21 (34.43)   | 7 (35.00)/18 (29.51)                 | 10 (50.00)/22 (36.07)           | 0.25 |
| ИР +/-    | 6 (31.58)/18 (29.03)   | 6 (31.58)/19(30.65)                  | 7 (36.84)/25 (40.32)            | 0.96 |
| АПОЕ4 +/- | 2 (12.50)/19 (32.20)   | 9 (56.25)/15 (25.42)                 | 5 (31.25)/25 (42.37)            | 0.05 |

n=75  
n-број пацијената, ГТ-глукозна толеранција, ИР-инсулинска резистенција, p-  $\chi^2$

Утврђена је гранична статистичка значајност у разлици дистрибуције алела АПОЕ4 у односу на когнитивни статус пацијената са МС, где је алел АПОЕ4 најзаступљенији у групи са блажим когнитивним оштећењем (Табела 16).

Двосмерном анализом варијансе је испитано да ли постоји заједнички утицај присуства алела АпоЕ4 и инсулинске резистенције или глукозне толеранције на постигнућима когнитивних тестова. Није утврђен комбиновани утицај испитаних параметара на резултате тестова сагледана као континуалне вредности.

#### 4.8 Мултифакторијална анализа предиктора когнитивног оштећења

У циљу дефинисања предиктора когнитивног статуса пацијената са МС и оштећења у појединачним когнитивним доменама урађена је мултиваријатна регресиона анализа параметара који су испитивани у овој студији.

**Табела 18.** Мултиваријатна логистичка анализа утицаја глукозне толеранције, инсулинске резистенције и присуства алела  $\epsilon 4$  у гену за АПОЕ на когнитивни статус оболелих од МС.

|       | Нема оштећења vs. Благи когнитивни дефицит |       | Благи когн. дефицит vs. Когнитивно оштећење |      | Нема оштећења vs. Когнитивно оштећење |      |
|-------|--|-------|---|------|---------------------------------------|------|
|       | OR (95% CI)                                | p     | OR (95% CI)                                 | p    | OR (95% CI)                           | p    |
| АПОЕ4 | 5.55 (0.96-32.25)                          | 0.049 | 0.32 (0.1-1.20)                             | 0.08 | 1.50 (0.22-10.19)                     | 0.70 |
| ГТ    | 3.75(0.59-23.83)                           | 0.15  | 1.06 (0.3-3.68)                             | 0.93 | 3.86 (0.69-21.52)                     | 0.11 |
| ИР    | 1.02(0.22-4.69)                            | 0.98  | 0.77 (0.20-2.93)                            | 0.69 | 1.12 (0.27-4.61)                      | 0.87 |

OR-однос шанси, 95% CI- интервал поверења, ГТ-глукозна толеранција, ИР-инсулинска резистенција, p- мултиваријатна логистичка регресија.

Повезаност оштећене глукозне толеранције, присуства инсулинске резистенције и алела АПОЕ4 са когнитивним статусом пацијената са МС је испитана поређењем пацијената који имају благи когнитивни дефицит са пацијентима који немају когнитивно оштећење, поређењем групе пацијената код којих је детектовано когнитивно оштећење са групом која има благи когнитивни дефицит и поређењем групе код које је присутно когнитивно оштећење са групом која нема когнитивно оштећење.

Резултат указује на значајан независни негативан ефекат присуства алеле  $\epsilon 4$  у гену за са АпоЕ за настанак благог когнитивног дефицита (OR=5.55, 95% CI, 0.96-32.25, p=0.049, коригован на ефекат глукозне толеранције и инсулинске резистенције (Табела 18).

Даљом анализом су у мултиваријатни регресиони модел укључивани и остали фактори испитивани у овој студији, у циљу дефинисања статистички најзначајнијег мултифакторијалног модела који са највећим коригованим процентом објашњава варијабилност когнитивног статуса пацијената са МС укључених у студију.

**Табела 19.** Мултиваријатна регресиона анализа предиктора благог когнитивног оштећења

|                        | Beta  | St. Gr. Beta | p      |
|------------------------|-------|--------------|--------|
| Пол                    | -0.25 | 0.12         | 0.04   |
| Дужина трајања болести | 0.50  | 0.15         | 0.002  |
| Укупан број релапса    | -0.35 | 0.13         | 0.017  |
| MSSSS                  | 0.63  | 0.14         | 0.0001 |
| АПОЕ4 +                | 0.42  | 0.13         | 0.002  |
| ISI <sub>МАТ</sub>     | 0.24  | 0.13         | 0.08   |

R<sup>2</sup>=0.49, Кориговани R<sup>2</sup>=0.40, p=0.0003, MSSSS-Multiple Sclerosis Severity Score, ISI<sub>МАТ</sub>-индекс инсулинске сензитивности (Matsuda)

У Табели 19. су приказани резултати анализе потенцијалних предиктора благог когнитивног дефицита у односу на пацијенте који немају когнитивно оштећење. Фактори укључени у мултифакторијални модел представљен у табели обашњавају 40% варијабилности благог когнитивног дефицита .

**Табела 20.** Мултиваријатна регресиона анализа предиктора когнитивног оштећења

|                        | Beta  | St.Gr. Beta | p      |
|------------------------|-------|-------------|--------|
| Пол                    | -0.20 | 0.11        | 0.07   |
| Доб                    | 0.19  | 0.14        | 0.18   |
| Дужина трајања болести | 0.38  | 0.15        | 0.01   |
| MSSS                   | 0.50  | 0.13        | 0.0004 |
| ISI <sub>СЕД</sub>     | -0.07 | 0.12        | 0.56   |

R<sup>2</sup>=0.39, Кориговани R<sup>2</sup>= 0.33, p<0.0011, MSSS-Multiple Sclerosis Severity Score, ISI<sub>СЕД</sub>- индекс инсулинске сензитивности (Cedelhorm).

У Табели 20. су приказани резултати анализе потенцијалних предиктора когнитивног оштећења у односу на пацијенте који немају когнитивно оштећење. Фактори укључени у мултифакторијални модел представљен у табели обашњавају 33% варијабилности когнитивног оштећења.



**Табела 21.** Мултиваријатна регресиона анализа предиктора меморијског дефицита

|                      | Beta  | Sr. Gr. Beta | p        |
|----------------------|-------|--------------|----------|
| Пол                  | -0.33 | 0.10         | 0.002    |
| Дуж. трајања болести | 0.50  | 0.12         | 0.0001   |
| Укупан број релапса  | -0.23 | 0.11         | 0.043    |
| MSSS                 | 0.59  | 0.11         | 0.000004 |
| АПОЕ4+               | 0.17  | 0.10         | 0.09     |
| IGI <sub>30'</sub>   | 0.20  | 0.12         | 0.09     |
| AUC <sub>INS</sub>   | -0.30 | 0.11         | 0.01     |

$R^2=0.38$ , Кориговани  $R^2=0.31$ ,  $p<0.00006$ , MSSS-Multiple Sclerosis Severity Score,

IGI<sub>30'</sub>- инсулиногени индекс (30мин), AUC<sub>INS</sub>-површина испод криве за инсулин.

У Табели 21. су приказани резултати анализе потенцијалних предиктора меморијског дефицита у односу на пацијенте који немају меморијски дефицит. Фактори укључени у мултифакторијални модел представљен у табели обашњавају 31% варијабилности меморијског дефицита.

**V**

**ДИСКУСИЈА**

## 5.1 Когнитивни статус болесника са мултиплом склерозом.

Когнитивно оштећење је честа карактеристика клиничке слике МС која значајно доприноси нарушеној функционалности болесника али је и један од симптома који се најчешће превиде при рутинским прегледима оболелих од МС. До скора се није придавала посебна пажња когнитивном поремећају и сматрало се мање важним од физичке онеспособљености. Међутим чињеница да когнитивно оштећење у великој мери нарушава свакодневни живот болесника у многим аспектима скренула је пажњу клиничара на значај његовог благовременог откривања (42).

Последњу деценију обележила су бројна истраживања која су се управо фокусирали на когнитивни проблем у МС. Заступљеност когнитивног оштећења варира најчешће између 40%-70% у зависности од методолошких разлика у студијама које су се односиле на карактеристике група испитиваних пацијената као и различитост инструмената и начина процене когнитивног оштећења (165,166,167).

Когнитивно оштећење може бити присутно још од најранијих фаза болести чак и пре физичке онеспособљености и предиктивно је за будуће когнитивно погоршање као и прогресију болести код болесника са благим функционалним дефицитом (41,45,46,50). Исто тако, когнитивно погоршање само по себи може бити индикатор прогресије болести у одсуству напредовања физичке онеспособљености (166,168). Имајући у виду претходно наведено, веома је важно испитати когнитивни статус пацијента и уврстити га у процедуре обавезног и рутинског прегледа свих пацијената са МС.

Наша студија је управо имала за циљ да испита заступљеност и образац когнитивног оштећења на релативно хомогеном узорку болесника који делом репрезентује српску популацију оболелих од МС, хомогену по клиничком току болести, РРМС, са нижим степеном функционалне онеспособљености, просечан EDSS скор 2.56 ( $SD \pm 1.14$ ), чија је просечна старост износила 37.01 ( $SD \pm 9.57$ ), а дужина трајања болести 8.12 година ( $SD \pm 5.83$ ) (Табела 1).

Од укупне групе испитаника ( $n=81$ ) издвојене су две такође хомогене подгрупе, у односу на то да ли су добијале терапију која модификује природни ток болести или не. У подгрупи лечених испитаника ( $n=50$ ) сви пацијенти су од самог почетка болести примали IFN $\beta$  1b (Бетаферон), док су другу подгрупу ( $n=31$ ) чинили болесници са природним током болести, који од момента постављања дијагнозе МС нису добијали

ДМТ. Ове две групе испитаника се према демографским и клиничким карактеристикама нису битније разликовале изузев значајно краћег просечног трајања болести у нелеченој групи болесника 6.21 год. ( $SD \pm 5.18$ ) којем су допринели новодијагностиковани пацијенти, наспрам 9.3 год. ( $SD \pm 5.95$ ) у групи лечених болесника са МС (Табела 1) .

У до сада спроведеним когнитивним студијама, било да су опсервационе или су се бавиле лонгитудиналним праћењем болесника, углавном су праћене и поређене међусобно когнитивне перформансе испитаника на различитим терапијским опцијама или у односу на контролу групу здравих испитаника (61,62, 169,170). Такође су многе студије у испитивање укључивале болеснике са различитим формама болести, нису биле ограничене на РРМС групу, а познато је да је когнитивно оштећење чешће и проминентније у прогресивној МС.

У укупном узорку наших испитаника присуство когнитивног оштећења детектовано је код 39.51% пацијената што је у сагласности са литературним подацима који процењују да је когнитивно оштећење присутно код 40-70% оболелих од МС (165,167). (Табела 3). Специфичност наше групе испитаника је у томе што су селектовани само пацијенти са РРМС те је заступљеност когнитивног оштећења ближа доњој границе опште процењене. Италијанска когнитивна студија (Portaccio и сар. 2009.) издвојила је такође само групу болесника са РРМС и нижим степеном функционалне онеспособљености, сличних демографских карактеристика али са нешто дужим трајањем болести 15.9 година ( $SD \pm 9.3$ ). Методолошки, у односу на одабир испитаника, начин процене когнитивног оштећења као и чињеницу да се ради о испитаницима европске (италијанске популације) резултати би се најбоље могли поредити са резултатима нашег узорка оболелих од МС. Заступљеност когнитивног оштећења износила је 44,8 %, у Portaccio-вој групи, што је у сагласности са нашим резултатима, као и у студији у немачкој популацији оболелих од МС и латино-америчкој студији која у РРМС групи пацијената процењује присуство когнитивног дефицита код 37.6 % оболелих (171,172,173).

Наша студија је ближа италијанској студији у погледу процене когнитивног статуса. У обе студије коришћен је сличан начин градирања когнитивног оштећења као тестови за процену појединачних домена. Наиме, имајући у виду чињеницу да алат за процену треба да буде прецизан, а уједно и економичан у погледу захтвности и дужине трајања,

ми смо се одлучили за примену 4 теста из BRB-N батерије за коју постоје нормативи у српској популацији, с тим да смо издвојили тестове који експлоришу најчешће погођене когнитивне домене у MC (164). Епозидично памћење процењено је у вербалном и визуелном модалитету SRT и SPART тестом, док су пажња, брзина обраде информација и егзекутивне функције процењене SDMT и PASAT 3 тестом. Тест процене семантичке флуентности је искључен обзиром да је показано да су језичке функције резистентније на оштећење у MC, и оно се обично јавља у каснијим стадијумима (167,174). Из процене је искључена и тежа форма PASAT 2 тест, обзиром да примена обе форме теста захтева много веће ангажовање пацијента и тиме је стресогенија а лакша верзија PASAT 3 је сматрана довољном и специфичнијом (167). Исти одабир тестова процене коришћен је проспективној студији праћења протективног ефекта когнитивне и мождане резерве на когнитивну детериорацију код болесника са MC који је спровела италијанска и српска група истраживача (175).

У студији Portaccio и сарадника коришћена су оба начина процене, краћа верзија BRB-N батерије која садржи три теста (SRT, SDMT, PASAT 3) и екстензивнија когнитивна батерија BRB-N + Stroop test, чиме је уједно показано да је кратка верзија BRB-N једнако ефикасна у детекцији когнитивно оштећених пацијената са MC (сензитивност од 94%, специфичност од 84%, и тачност од 89 %) (171).

У нашем раду коришћен је тест више обзиром да смо сматрали да је неопходно експлорисати и домен визуелног памћења.

У подгрупи наших болесника који су лечени IFN $\beta$  1b нађена је мања заступљеност когнитивног оштећења, које подразумева неуспешност на два и више тестова процене, код 36% болесника у односу на нелечену групу 45.16% болесника и упркос дужем трајању болести у леченој групи. Овај резултат, иако није досегао статистичку значајност, би могло сугерисати могући протективни ефекат терапије на прогресију когнитивног оштећења. Са друге стране, такође је проценат пацијената који нису имали когнитивно оштећење (успешност на свим тестовима процене) био мањи у групи нелечених 25,8% у односу на групу лечених болесника 32% што је у сагласности са претходним размишљањем. (Табела 3).

Patti и сарадници су објавили резултате студије пресека који се односе на когнитивне карактеристике пацијената са РРМС који нису претходно лечени имуномодулаторном терапијом. Ови резултати су део проспективне студије COGIMUS, и одражавају когнитивне карактеристике испитаника пре започињања терапије IFN $\beta$  1a.

У њиховој студији, 22% нелечених РРМС пацијената је процењено као когнитивно оштећено, што је значајно мање у односу на нашу групу нелечених испитаника, међутим пацијенти у њиховој студијису су имали краће трајање болести 5.0 год. ( $SD \pm 5.3$ ) и нижи EDSS скор 1.8 ( $SD \pm 1.0$ ) и нешто другачији критеријум дефинисања когнитивног оштећења (176).

Amato и сар, 2010. селектује сличну групу испитаника у свом проспективном испитивању, који су до почетка студије нелечени, а потом се у терапију уводи IFN $\beta$  16 Критеријум за когнитивно оштећење и њиховом раду задовољило је 30.6% што је ближе нашем резултату(46).

Међу нашим болесницима 70, 37% болесника је ималао лош резултат на бар једном од тестова, градиран као благи когнитивни поремећај, што сведочи о великој заступљености когнитивне дисфункције у популацији МС пацијената чак и у ранијим фазама болести. Италијанска студија која је утврђивала повезаност благог когнитивног поремећаја у МС са МР показатељима болести, код РР МС пацијената са краћим трајањем болести и нижим степеном функционалне онеспособљености, нашла је да 56% пацијената има благи когнитивни поремећај (неуспешност на барем 1 тесту BRB-N батерије). Код ове групе болесника установљен је значајно смањен кортикални волумен мозга у односу на когнитивно очуване пацијенте и здраве контроле. Према томе, чак и благи когнитивно поремећај може имати предиктивни значај у погледу тежине можданог оштећења, превасходно оштећења неокортикалне сиве масе, а тиме и прогресије болести, когнитивног оштећења и онеспособљености болесника (165,177,178).

Код болесника са првом манифестацијом болести, КИС, присуство когнитивног поремећаја у тој фази болести значајно је корелирало са прогресијом у клинички дефинитвну МС (50). Међу пацијенатима са КИС око 80 % болесника имало је оштећење на једном, а 57% болесника на два и више когнитивних тестова (179). Когнитивно оштећење једном детектовано по природи је прогресивно, има тенденцију постепеног погоршања, ретко стагнира или се побољшава.

## 5.2 Профил когнитивног оштећења

У погледу обрасца когнитивног оштећења, епизодично памћење је једно од најчешће захваћених когнитивних домена у МС (167).

У нашој групи испитаника 67% болесника имало је оштећење на барем једном меморијском тесту. Пацијенти су били лошији на задатку визуелног учења и памћења, где је неуспех на тесту показало чак 60,49 % пацијената. Неуспех на тесту вербалног памћења испољило је 39.51% пацијената (Табела 4).

Меморијско оштећење је једно од најчешћих у МС и јавља се у 40-60 % болесника захваћајући процес учења и приступа материјалу ускладиштеном у дугорочно памћење. Други аспекти памћења (краткорочно памћење, семантичко, имплицитно памћење, рекогниција) ретко су погођени домени у МС (180).

У студији Amato и сар, болесници РРМС у раном стадијуму болести најчешће су иницијално оштећење испољили у домену вербалног памћења и PASAT теста, међутим у даљој еволуцији, ре-евалуацијом након 3 године, број когнитивних домена захваћених оштећењем се проширио и најизразитије погоршање било је на тестовима визуелног памћења и PASAT тесту (46). Болесници са дужим трјањем болести у нашој групи били су значајно лошији на тестовима вербалног и визуелног памћења.

Резултати студија корелације когнитивног и структурног оштећења показале су да оштећење памћења у МС умерено позитивно корелира са волуменом T1 и T2 лезија на МР мозга (176).

Успорена брзина процесуирања информација је једна од основних карактеристика когнитивног оштећења у МС и она доприноси меморијском оштећењу као и поремећају пажње. Поремећај комплексне пажње и егзекутивних функција такође чине профил когнитивног оштећења у МС и присутни су још у раним фазама болести (167).

Међу пацијентима који су чинили нашу групу испитаника на SDMT тесту који експлорише пажњу, брзину процесуирања у визуелном модалитету, неуспешност је показало 24, 69% болесника што је у складу са литературним подацима. На PASAT 3 тесту који претражује сличне домене укључујући и радну меморију, делом и егзекутивне функције, на основу вербално презентованог материјала, неуспешно урадило 12,34% пацијената (43). (Табела 4). Интересантно је да су средње нормативне вредности PASAT 3 теста у нашој популацији нешто ниже у односу на италијанску и немачку тј. да су здрави испитаници у српском узорку показали генерално слабије

постигнуће на овом тесту, те отуда проценат оболелих у нашем узорку који је постигао неуспех на овом тесту у односу на нормативе није био висок (164). (Табела 5)

### **5.3 Фактори који доприносе когнитивном оштећењу**

Показано је да је старост болесника један од снажнијих предиктора настанка и прогресије когнитивног оштећења у МС (44, 165, 172, 174).

У нашој групи болесника когнитивно оштећење је било значајније заступљено код старијих болесника и старост је показала негативну повезаност са успешношћу на готово свим тестовима, а посебно на тестовима који процењују меморијске функције (Табела 6).

Примећено је такође, да су болесници са когнитивним оштећењем имали значајно нижи степен образовања у односу на болеснике са благим когнитивним поремећајем. Пацијенти са више година школовања постигли су значајно боље резултате на суб-тестовима вербалног и визуелног епизодичног памћења као и на оба теста која одражавају ефикасност комплексне пажње, брзине обраде информација, егзекутивне способности (Табела 6). Ова чињеница би се могла објаснити феноменом когнитивне резерве. Истраживања су показала да су особе које су током живота обогативале своја сазнања, бавећи се интелектуалним радом и упражњавајући разнолике активности друштвеног живота, на неки начин обезбедиле „протекцију“ од когнитивног оштећења. Ово не значи да су такве особе заштићене од испољавања когнитивног поремећаја, већ да постојање когнитивне резерве амортизује оштећење у основи којег лежи одређена мождана патологија. Код оболелих од МС примећено је да неки болесници никада не развију когнитивни поремећај иако имају промене на МР које би могле представљати корелат когнитивног оштећења (175,181,182).

Установљено је да су промене у мозгу које су израз прогресије МС, као што су мождана атрофија, повећање оптерећености лезијама, показале много снажнију повезаност са когнитивним пропадањем код пацијената који су имали нижи степен образовања и интелектуалног обогативања кроз живот као и нижу мождану резерву.

Дакле, исти степен мождане патологије може манифестовати различит степен когнитивног оштећења у зависности од тога да ли постоји когнитивна резерва или не. Према теорији когнитивне резерве особе супериорније у погледу интелектуалног рада и образовања имају ефикасније образце неуро-когнитивног процесуирања који заправо



штите њихово когнитивно функционисање упркос постојања болести тј. патолошког процеса у мозгу. Отуда би се могло закључити да су у нашој групи испитаника болесници са већим степеном образовања, израженим кроз године школовања, показали блажи степен когнитивног оштећења вероватно захваљујући когнитивној резерви, иако се према показатељима тежине и прогресије МС нису битније разликовали од остатка групе.

Бројне студије су до сада анализирале степен функционалне онеспособњености, трајање болести и форму болести као факторе који доприносе степену когнитивног оштећења у МС. Анализом података наилазимо на мноштво контрадикторних налаза.

Релативно је конзистентан налаз да је когнитивно оштећење чешће у прогресивној форми у односу на РР МС (167). Показано је да се и образац когнитивног оштећења разликује тако што су болесници са РРМС чешће испољавали меморијске поремећаје док су егзекутивне функције и брзина процесуирања информација били више погођени у прогресивним формама болести, што је у складу са налазима наше студије која се фокусира на РРМС популацију болесника (43,167).

Међутим питање је колико је ток болести сам по себи довољан да се дефинише као предиктор когнитивног поремећаја обзиром да не можемо занемарити допринос година, дужине трајања болести и тежине функционалног оштећења у различитим формама МС.

EDSS скор као мера тежине функционалног дефицита показао је благу до умерену повезаност са когнитивним оштећењем у МС (165, 168,174,183).

Са друге стране Archion и сар. истичу да је EDSS један од снажнијих предиктора когнитивног оштећења у МС (43). Посебно је слаба повезаност EDSS скорa и когнитивног оштећења уочена код болесника у раној фази РРМС и КИС (165,184).

EDSS сам по себи дизајниран је преваходно за мерење тежине и напредовања моторног оштећења и нема сензитивност за откривање когнитивног оштећења (155).

Сличне контраверзе постоје и по питању повезаности когнитивног оштећења са дужином трајања болести. Различити резултати углавном произлазе из различитих методолошких приступа. Оно што испливава као закључак након анализа различитих студија је да когнитивни дефицит има тенденцију појављивања и погоршавања са напредовањем болести. Погоршању су изгледа склонији они болесници који су већ на почетку болести испољили неку врсту когнитивног оштећења (47,184,185).

Код наших испитаника већи EDSS скор је показао значајну повезаност како са постојањем когнитивног оштећења тако и са лошијим постигнућима унутар појединачних когнитивних домена. Најснажнију негативну повезаност показао је са постигнућем на SDMT тесту са којим повезаност показује и MSSS скор (који говори о брзини прогресије болести) (Табела 7)

SDMT је у многим студијама показао добру сензитивност за праћење промена и тока болести, као и снажну повезаност са скалама онеспособљености, степеном церебралне атрофије на MP, те је отуда и предложен као најпоузданији скрининг тест за откривање когнитивног оштећења (174,185).

Болесници са благим когнитивним дефицитом у нашем истраживању, имали су значајно већи степен функционалне онеспособљености у односу на пацијенте који су когнитивно очувани, а још већа статистичка значајност уочена је код болесника са когнитивним оштећењем у односу на оне са одсуством когнитивног оштећења (График 1).

Дужина трајања болести сама по себи није показала значајнију повезаност са постојањем и тежином когнитивног оштећења али када су анализирани појединачни когнитивни домени дужина трајања болести показале се као фактор који значајно доприноси меморијском оштећењу посебно у модалитету који испитује вербално учење и памћење, што је у складу са налазима појединих студија које су у РРМС истакле меморијско оштећење као подручје подложно оштећењу (46,167). (Табела 7)

Када, са друге стране, обратимо пажњу на MSSS скор који представља меру прогресије МС узимајући у обзир EDSS коригован за дужину трајања болести, налазимо да је он показао значајнији степен повезаност код болесника који су имали било какво когнитивно оштећење у односу на болеснике који су когнитивно очувани (График 2). Отуда се намеће закључак да су, гледано кроз време, вероватно они пацијенти који немају когнитивно оштећење на неки начин резистентнији на погоршање условљено тежином и гомилањем функционалног дефицита.

Студије које су пратиле и поредиле когнитивне способности болесника у односу на примену различитих врста DMT сугеришу повољан ефекат теписе IFN $\beta$  на стабилизацију или чак побољшање когнитивног статуса пацијената са МС (165,170,186,187). Проспективно праћење болесника са природним током болести тешко је изводљиво обзиром да у свету већина болесника са МС прима имуномодулаторну терапију.

У нашем узорку болесника глобални когнитивни статус није показао значајније разлике у односу на присуство /одсуство терапије али је нелечена група болесника имала лошији резултат PASAT3 теста у односу на групу која прима терапију (Табела 8). PASAT 3 се показао као сензитиван тест и широко се примењује у дискриминацији когнитивно оштећених у МС (188,189).

У нашој студији је такође дужина трајања терапије значајно позитивно утицала на резултат PASAT теста. Дуже лечени болесници имали су значајно веће скорове, боље постигнуће, на PASAT 3 тесту. Овакав налаз је у складу са резултатима BENEFIT студије која се бавила проценом ефекта раног започињања терапије IFN $\beta$  1 b код болесника са КИС. Након једногодишњег, а потом и након 5 годишњег праћења ефекта терапије на когнитивне функције мерене PASAT 3 тестом, значајно боље резултате показала је група болесника лечена IFN $\beta$  1 б у односу на групу која је добијала плацебо (170).

Примена имуномодулаторне терапије у МС би се могла сматрати фактором који доприноси когнитивном очувању код оболелих од МС.

#### **5.4 Полиморфизам у гену за АПОЕ и мултипла склероза**

Повезаност АПОЕ гена са ризиком обољевања од МС је много пута испитивана при чему није потврђена битна значајност (190).

Међутим по питању повезаности са тежином болести добијају се различити подаци. Алел  $\epsilon$ 4 у гену за АПОЕ доведен је у везу са тежим исходом болести и ПП формом МС, што је показано и у популацији оболелих од МС у Србији, док на супрот томе друге студије не потврђују значај истог у погледу клиничког исхода болести (190,191,192,193).

У нашој групи болесника са МС дистрибуција генотипова полиморфизама у гену за АПОЕ (График 3) у складу је са налазима која је претходно добијени у српској популацији оболелих од МС (194).

Заступљеност  $\epsilon$ 4 алела износила је 12% у целокупном узорку болесника (График 4).

Подгрупа носилаца  $\epsilon$ 4 алела чинила је 21% свих испитаника.

Слична заступљеност носилаца  $\epsilon$ 4 алела добијена је и на узорку италијанских пацијената са РРМС (66).

Група носилаца и група која је  $\epsilon 4$  алел негативна, у нашем истраживању, биле су међусобно усаглашене у погледу дистрибуције полова, старости и степена образовања. У односу на клиничке показатеље тежине болести такође нису уочене битније разлике зависно од присуства  $\epsilon 4$  алела у нашој групи болесника. Степен функционалне онеспособљености и прогресије болести, дужина трајања болести, укупан број релапса, нису битније одступале код особа носилаца потенцијално ризичног  $\epsilon 4$  алела (Табела 9)

### **5.5 Алел $\epsilon 4$ у гену за АПОЕ и когнитивно оштећење у мултиплој склерози**

Ген за АРОЕ је један од свакако најиспитиванијих гена у односу на когницију код људи.

Етиологија когнитивног оштећења у МС још увек представља велику непознаницу и последњих деценија велики број студија проучавао је потенцијалне биолошке корелате когнитивног оштећења у МС (166,167).

Развој савремених неуровизуализационих техника пружио је нова сазнања у погледу повезаности и карактеристика когнитивног оштећења са структурним и метаболичким показатељима ткивног оштећења али све заједно још увек није у потпуности разјаснило многа питања. Пре свега, питање хетерогености у погледу присуства, тежине, обрасца, прогресије когнитивног оштећења код болесника са МС. У потрази за генетским факторима који би могли пружити додатна објашњења, у протеклој деценији фокус је стављен на полиморфни ген за АПОЕ, због његове осведочене повезаности са когницијом, пре свега ризиком обољевања од АД као и лошијим когнитивним постигнућима код недементних старијих особа (71,73,75,87,89).

Неколико студија у МС испитивало је повезаност АПОЕ гена са когнитивним оштећењем и структурним корелатима когнитивног оштећења при чему су добијени неконзистентни налази (66, 92,93,94,98,99,100,193,195,196,197).

Когнитивне студије које су међу првима спровођене на ову тему сугерисале су могућу повезаност поседовања  $\epsilon 4$  алела са израженијом когнитивном дисфункцијом у МС, са посебним акцентом на оштећење вербалне меморије где је  $\epsilon 4$  алел означен као значајан предктор (94,195,197). Истраживања које су потом спровођена последњих година, међутим нису потврдиле овакав налаз (66, 98,99,193).

У нашем раду уочено је да је дистрибуција  $\epsilon 4$  алела значајније била заступљена у групи болесника који су испољили когнитивно оштећење (Табела 17). Када смо градирали

когнитивно оштећење издвојили смо групу која је имала неуспех на једном когнитивном тесту, према критеријуму скор нижи за  $\geq 1$  SD у односу на нормативе дефинисане у српској популацији, као групу са блажим когнитивним дефицитом у односу на оне испитанике који су неуспех показали на два и више тестова и тиме се сврстали у групу са тежим когнитивним оштећењем. Управо у групи испитаника која је показала оштећење према нижем критеријуму ( благи когнитивни дефицит)  $\epsilon 4$  алел је био значајније заступљен. У претходном поглављу истакнуто је да је ова група испитаника имала значајно већи степен образовања у односу на групу која је дефинисана по строжијем критеријуму, који би заправо могао бити разлог због којег они манифестују боље постигнуће на тесту можда чак и упркос израженијој можданој патологији. Такође су испитаници ове групе били значајније млађи у доносу на групу са тежим когнитивним оштећењем. На ово питање би свакако бољи одговор могла пружити корелација неуропсихолошких налаза са структурним показатељима оштећена на МР која у овом раду није била предмет посматрања али свакако је отворила пут за даље истраживање. Такође би било значајно пратити проспективно ове пацијенте и посматрати даљу прогресију когнитивног оштећења, посебно у светлу чињенице да је једном испољен когнитивни поремећај код оболелих од МС предиктиван за његово даље погоршање (41, 46).

Истраживање италијанских истраживача спроведено на пацијентима са РР МС, као и истраживање спроведено у Шпанији на сличном узорку, нису установила било какву повезаност присуства  $\epsilon 4$  алела са укупним когнитивним статусом нити домен специфичним оштећењем (66, 99). Сличан резултат дала је и канадска студија која је укључила и ПП МС и СП МС болеснике (98). Одсуство повезаности у студији Portaccio и сар. такође је потврђено када су налази кориговани у односу на параметре МР прегледа (66).

Када смо у нашем раду, пратили резултате појединачних тестова као и успешност на појединачним тестовима, нисмо уочили значајне разлике у дистрибуцији  $\epsilon 4$  алела (Табела 10). Дакле, несупешност у било ком испитиваном домену когниције у нашем узорку није била значајније повезана са присуством  $\epsilon 4$  алела, при чему смо посебну пажњу усмерили на меморијску групу тестова. Разлика међу половима у погледу успешности у појединим когнитивним доменима у односу на поседовање  $\epsilon 4$  алела која је добијена у раду Savettieri и сар, у нашем раду није посебно испитивана имајући у

виду чињеницу да такав закључак не би имао довољну снагу обзиром на додатно редукован број испитаника (197).

Узевши у обзир све наведено, резултати наше опсервације налазили би се негде између досадашњих налаза који нису стриктно аргументовали ставове ни „за“ ни „против“ доприноса и значаја  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ у настанку когнитивног оштећења у МС. Ми смо установили значајније чешћу заступљеност  $\epsilon 4$  међу пацијентима који су имали когнитивни дефицит блажег степена у односу на пацијенте који нису имали когнитивни поремећај, што их можда чини осетљивијим за будуће оштећење. Са друге стране нисмо установили да је  $\epsilon 4$  био повезан са лошијим постигнућима у домену меморије нити у другим појединачним доменима. Неконзистентност у погледу резултата досадашњих испитивања лежи знатним делом у различити карактеристикама узорака испитаних болесника. По том питању, испитаници у нашој кохорти су униформни по току болести РРМС, средње старости 37.01 год. са нижим степеном онеспособљености (средњи EDSS скор 2.56) приближно испитаницима шпанске и италијанске студије, мада је група Portaccio и сар. имала нижи просечни EDSS скор (EDSS 1.7) (66,99).

Са друге стране студије Shi-a и Parmetner-a, које су су установиле повезаност  $\epsilon 4$  са когнитивним оштећењем уврстиле су и испитанике са ПП МС и СП МС, са нешто већим степеном функционалног дефицита и и старије животне доби (92,195).

Студија Shi-a која је болеснике затим проспективно пратила током годину дана указала је на изразитије когнитивно погоршање код носилаца  $\epsilon 4$  алела (93).

Свакако да се налази морају сагледавати у ширем контексту укључујући и чиниоце који са своје стране доприносе когнитивном оштећењу у будућим боље контролисаним студијама. Оно што је посебно важно је праћење ових болесника кроз време обзиром да је  $\epsilon 4$  алел удружен са повећаним ризиком за развој АД посебно у особа са амнестичким благим когнитивним поремећајем, што не искључује могућност да су и  $\epsilon 4$  носиоци међу МС пацијентима са когнитивним поремећајем, на послетку предодређени да развију АД независно или пак удружено са већ постојећим оштећењем које носи МС.

## 5.6 Поремећај метаболизма глукозе и инсулина у мултиплој склерози

Значај инсулина у многим функцијама у ЦНС последњих година буди велико интересовање истраживача. Резултати истраживања недвосмислено истичу повезаност ИР и ДМ тип 2 са когнитивним оштећењем и повећаним ризиком за настанак АД али истичу везу и са другим неуродегенеративним обољењима (119,126, 128,134,135). Са друге стране наводи се да је системска хронична инфламација уплетена у патогенезу ИР. Примећено је да оксидативни стрес заправо води у стање ИР промовишући експресију проинфламаторних цитокина који редукују инсулинску сензитивност. Инсулинске абнормалности такође, доприносе појачавању инфламаторног одговора и доприносе оксидативном стресу. ИР прати многа аутоимуна обољења (139,198, 199,200).

Код болесника са системским еритемским лупусом је истакнута повезаност и могућа улога адипоцитокина у патофизиологији ИР, док је у реуматоидном артритису (РА) уочена повезаност серопозитивности за реуматоидни фактор и анти цитрулинска антитела (199, 200). Установљена је повећана продукција инсулина у групи болесника са РА, те је постављено да би заједнички окидач аутоимуности могао допринети и стварању антитела усмерених на инсулински рецептор доводећи до ИР, пре него деструкција  $\beta$  ћелија (200).

МС у својој патогенези обједињује инфламаторне и неуродегенеративне процесе и у развоју своје хетерогене клиничке слике, где когнитивно оштећење може настати било када и представљати проминентни симптом.

Све заједно намеће питање да ли су оболели од МС у повећаном ризику за настанак поремећаја метаболизма инсулина и глукозе, као и да ли истовремено присуство ових поремећаја у МС утиче на клиничке карактеристике болести, пре свега да ли модификује степен и образац когнитивног оштећења.

Смањена физичка активност, честа употреба кортикостероида у лечењу релапса као и сама имуномодулаторна терапија IFN $\beta$  доприносе ризику за настанак ИР (141,143,144,201).

У протекле две године објављени су резултати свега две судије у којима се наводи да је код болесника са МС уочена већу учесталост ИР и чак 2.5 пута већа шанса да развију ИР у односу на здраве испитанике, такође је код новодијагностикованих болесника са МС примећена хиперинсулинемија и смањена ИС (139,140).



Недавно објављени прелиминарни резултата нашег истраживања указали су по први пут на постојање ИП у природном току МС, код оболелих са РР формом болести који нису лечени ни једним видом терапије која мења природни ток болести (142).

У жељи за бољом експлорацијом поремећаја глукозног метаболизма у МС у овом истраживању применили смо ОГТТ тест код свих испитаника, како би смо стекли увид у то каква је глукозна толеранција, инсулински одговор на стимулацију глукозом као и сензитивност периферних ткива на инсулин.

У нашој групи испитаника од 81 болесника са РРМС, нарушену глукозну толеранцију (ГТ) испољило је 24,69 % (Табела 1).

Болесници који су патолошки толерисали глукозу били су значајно старији и имали су значајно већи EDSS скор (Табела 11).

Познато је да старија животна доб доприноси настанку поремећаја толеранције глукозе, као и код наших болесника, а да је поремећај толерисања глукозе удружен са високим ризиком за настанак ДМ тип 2 (203, 204).

Већа вредност EDSS скорa упућује на тежи степен онеспособљености који је скопчан са смањеном физичком активношћу што са своје стране покреће читав низ патофизиолошких дешавања која доводе до смањене ИС и глукозне интолеранције. Особе које имају изолован поремећај ГТ имају умерену или врло изражену ИП у мишићима. Могуће је да би механизми на нивоу самих мишићних ћелија као што је смањена сензитивност на инсулин, редукована инсулинска сигнализација као и нарушен енергетски метаболизам у ћелијама могли допринети поремећају ГТ у МС независно од смањене физичке активности (205).

Подаци из литературе који говоре о преваленцији нарушене глукозне толеранције и ДМ тип 2 у МС су неконзистентни (206, 207, 208).

Неколико студија изнело је закључке на основу процене базалних концентрација глукозе што не даје адекватну процену постојања нарушене ГТ у односу на 2h ОГТТ (209, 210).

Недавно објављени резултати белгијске студије Wens-a и сарадника, указали су да у узорку од такође 81 болесника са МС где су 65% чинили болесници са РР формом а 35% болесници са прогресивном МС, на основу ОГТТ-а, 11% болесника са МС је имало оштећену глукозну толеранцију што је било статистички значајно више у односу на популацију здравих (205).



Дизајн наше студије није подразумевао постојање контролне групе испитаника али је заступљеност болесника са оштећеном ГТ била већа у односу на налаз Wensa и сар. и врло слична налазу Пенсове и сар. који су нарушену ГТ детектовали код 26,3% новодијагностикованих болесника са МС 140, 205).

У студији Mahler и сар на малом узорку од 16 боленика са МС, након ОГТТ-а није установљена патолошка ГТ ни код једног болесника (138).

У нашем предходном истраживању у групи нелечених болесника са РРМС показано је да су пацијенти једнако добро толерисали глукозу као и здрави контролни испитаници. Овај резултат свакако заслужују даљу проверу, обзиром да је добијен на мањем броју испитаника и да су контролну групу чинили само здрави испитаници мушког пола (142).

Када говоримо о параметрима који дефинишу ИР у нашем узорку, 19 болесника од укупног броја (23,4%) је имало ИР на основу вредности НОМА1-ИР индекса (Табела 1). Популационе студије спроведене у различитим географским подручјима указале су на постојање изразитих варијабилности у граничним вредностима НОМА1-ИР које дефинишу ИР (42). Студије ове врсте, нажалост, нису до сада урађене у нашој популацији те је коришћена опште прихваћена гранична вредност за ИР > 2.5 (119).

Када је у питању ажурирани, компјутерски модел НОМА 2-ИР проценат заступљености ИР по том критеријуму је нешто већи у нашем узорку и износи 48,14% (Табела 1).

У предходном истраживању нашег тима спроведеном код нелечених болесника са РРМС, заступљеност ИР дефинисана по овом критеријуму изражена НОМА1-ИР индексом показала је тренд значајности у односу на контролну групу здравих испитаника. Када су, међутим, поређене вредности оба модела НОМА индекса ИР, међу нашим испитаницима који деле исте географске, културолошке карактеристике и сличну генетску позадину, пацијенти са МС су као група имали статистички значајно веће вредности у односу на здраву контролну групу. Такође је утврђено да су нелечени болесници са МС имали значајно веће концентрације базалног инсулина, значајнији пораст инсулина након оптерећења глукозом као и снижену ИС у односу на здраве испитанике (142).

У раду Oliveira и сар. преваленца ИР процењена НОМА1-ИР индексом, међу болесницима са МС у његовом узорку који су чинили и болесници са РРМС и прогресивном МС који су добијали имуномодулаторну терапију, износила је 40%. Обојели од МС су имали значајно веће вредности индекса ИР у односу на здраве испитанике (139).

Пенесова је у своја истраживању обухватила групу нелечених тек дијагностикованих РР МС пацијената, са кратким трајањем болести, одмах након прве епизоде симптома и мањим степеном функционалне онеспособљености (просечни EDSS скор 1.1). Она у свом раду примењује 2h ОГТТ и у поменутој групи болесника не налази статистички значајну разлику у вредностима НОМА индекса ИР између групе МС болесника и здравих али је показано да су болесници са МС имали значајну хиперинсулинемију и снижену ИС у односу на здраве испитанике. Са друге стране наше прелиминарно истраживање указује на хиперинсулинемију, ИР и смањену инсулинску сензитивност код оболелих од МС у одсуству ДМТ као потенцијално доприносиоћег фактора али са дужим трајањем болести и нешто већим ЕДСС скором у нашој посматраној групи (140, 142).

Обзиром на чињеницу да би примена терапије IFN  $\beta$  1b могла бити један од фактора који доприносе настанку глукозне дисрегулације и ИР, што је детаљније објашњено у уводу овог рада, упоредили смо у овом истраживању параметре метаболизма инсулина у групи лечених и групи болесника која није примала ДМТ.

Установили смо да примена терапије IFN  $\beta$  1b није допринела значајнијим разликама у параметрима глукозног и инсулинског метаболизма у групи наших болесника са МС (Табела 12 и 14). ИР није била значајније заступљена у групи болесника лечених IFN  $\beta$  1b у односу на нелечену групу наших испитаника са МС, нити је било разлике у индексима ИС као и инсулинском одговору на глукозну стимулацију.

Студија Mahler и сар. спроведена нешто раније 2012. год. на мањем узорку од 16 болесника са РР МС, лечених глатирамер ацетатом, која је испитивала постојање метаболичке флексибилности о наведеној групи пацијената, није указала на постојање поремећаја постпрандијалног метаболизма глукозе нити знаке ИР у посматраној групи (138).

Испитивањем повезаности клиничких показатеља болести са присуством ИР у нашој групи испитаника, уочено је да је дужина трајања болести показала значајну позитивну повезаност са вредностима индекса ИР. Болесници код којих је болест дуже трајала имали су значајно веће вредности индекса ИР по НОМА1-ИР ( $R=0.24$ ,  $p=0.03$ ), ова чињеница би делом могла да објасни разлике у подацима досадашњих истраживања у којима су се испитаници са МС разликовали између осталог и по овом параметру.

Група оболелих у нашем прелиминарном и садашњем истраживању је по дужини трајања болести била еквивалентна групи Oliviera и сар. док су болесници у групи Пенесове имали краће трајање болести (139,140,142). Дуже трајање болести могло би се

довести у везу са пролонгираним утицајем неповољних фактора, хроничне инфламације и оксидативног стреса значајних у патогенези ИР.

Инфламаторни цитокини tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-6, IL-17, (IFN)- $\gamma$  TNF, који су повишени код пацијената са МС, уплетени су у негативне интеракције на нивоу инсулинских рецептора, сигналних путева и регулације гена одговорних за нормалну инсулинску активност, као и на нивоу механизма укључених у процесе реакције на инсулин и преузимања глукозе на периферији (211, 212).

Oliviera и сар. су показали да пацијенти са ИР имају већи ниво инфламаторних цитокина и оксидативног стреса у односу на оне који нису показали постојање ИР. (139).

Број релапса који су пацијенти доживели током целокупног трајања болести ближио се значајности када је испитивано постојање повезаности са индексом ИР у нашој групи испитаника. Уочен је тренд позитивне повезаности укупног броја релапса и вредности НОМА1-ИР индекса. ( $R=0.20$ ,  $p=0.06$ ). Већи број релапса одликује инфламаторну фазу болести и указује на већу активност болести, са друге стране број релапса болести указује на чешћу примену пулсне кортикостероидне терапије за коју је познато да индукује стање реверзibilне ИР и хиперинсулинемије. Понављана стања овакве јатрогене ИР могла би изазвати и дугорочније последице на метаболизам глукозе и инсулина (130,143,144).

Степен функционалне онеспособљености и прогресије болести није показао значајнију повезаност са индексима ИР и ИС у нашем раду. Могуће да нижи просечни EDSS скор у групи наших болесника не лимитира битније њихову физичку активност што анулира могући утицај снижене физичке активности на ИР.

Овај налаз је у сагласности са налазом Пенесове и сар. као и са нашим ранијим налазом који такође нису потврдили ову врсту повезаности код новодијагностикованих МС болесника, као и у групи нелечених болесника са РРМС (140,142).

Сличан налаз добила је група грчких истраживача који у резултатима своје недавно објављене студије код болесника са РРМС истичу да се параметри метаболизма глукозе нису битније разликовали у групи болесника са већим EDSS скором у односу на групу са нижим степеном функционалне онеспособљености (213).

Насупрот овоме, у раду Оливиера и сар истакнут је значај повезаности ИР са тежим степеном функционалне онеспособљености, при чему треба имати у виду да су њихову групу болесника чинили и оболели са прогресивном формом МС (139).

Када смо у нашем раду двосмерно анализирали ефект терапије и ГТ као и терапије и ИР на клиничке показатеље болести није утврђено да постоји значајна повезаност, односно комбиновани ефекат наведених потенцијалних предиктора у односу на клиничке показатеље болести.

Из свега наведеног могло би се закључити да поремећаји метаболизма глукозе и инсулина нису ретки код оболелих од МС и да су фактори који би потенцијално могли допринети њиховом испољавању могли бити старост болесника, дуже трајање болести, као већи степен функционалне онеспособљености, евентуално примена симптоматске и имуномодулаторне терапије. Са друге стране колики допринос поремећаји метаболизма глукозе и инсулина имају у патогенези МС, да ли и на који начин дају допринос хетерогеном клиничком испољавању ове болести и даље стоји као питање које захтева додатна истраживања и будуће провере.

### **5.7 Инсулинска резистенција и когнитивни поремећај у мултиплој склерози**

Мало је података у литератури уопште који говоре о поремећају метаболизма инсулина и глукозе у МС, а не налазимо студије које говоре о њиховој повезаности са когнитивним оштећењем у МС.

Пилот студија аутора овог рада, спроведена пре осам година, установила је негативну повезаност повишеног индекса ИР насталог у току примене пулсне кортикостероидне терапије са постигнућима на меморијским тестовима код болесника са МС (143).

Повезаност ИР са когнитивним оштећењем показана је како код здравих појединаца тако и у болестима које одликује когнитивно оштећење, пре свега АД (131).

Показано је да ДМ тип 2 одликује когнитивни поремећај пре свега психомоторне ефикасности, учења и памћења, пажње и егзекутивних функција (214).

Особе са ИР које немају ДМ тип 2 испољиле су поремећај учења и памћења (131).

Такође је уочено да су особе са ДМ тип 2 средње животне доби које су лошије толерисале глукозу имале смањени волумен хипокампуса (214,215).

Младе особе са ДМ тип 1 показују когнитивни поремећај много пре развоја васкуларних поремећаја, што све заједно упућује да метаболизам инсулина и глукозе има директан ефекат на когнитивне, преваходно меморијске функције (204).

Као што смо већ навели у нама доступној литератури до сада не налазимо истраживања која су била директно усмерена на испитивање повезаности метаболизма глукозе и инсулина са когницијом у МС.

У нашем истраживању показано је да код оболелих од МС није било значајније разлике у дистрибуцији нарушене ГТ и ИР између група које су чинили болесници који су били когнитивно очувани, који су имали блажи когнитивни дефицит и они болесници са когнитивним оштећењем. (Табела 17). Дакле, сам степен когнитивног оштећења није био повезан са различитом заступљеношћу метаболичког поремећаја глукозе и инсулина, међутим када су затим анализирани резултати појединачни когнитивних тестова у односу на толеранцију глукозе, показало се да су оболели од МС који су имали нарушену ГТ имали лошије резултате и постигнућа на тесту визуелне меморије и то како у подтесту учења тако и на подтесту одложеног присећања визуелно презентованог материјала. (Табела 15; График 5).

Овакав налаз је донекле у сагласности са резултатима недавне студије Backeström и сар. који су спровели истраживање на здравој популацији испитаника средњих година, где су показали да је повишена концентрација базалне глукозе била значајно негативно повезана са постигнућима на тестовима епизодичног памћења код жена док није уочена значајна повезаност концентрација инсулина и ИР се епизодичним и семантичким памћењем (216).

Истраживање Messier и сар. обухватила је млађу популацију здравих 20-годишњих студената где је такође уочено да су више вредности глукозе биле повезане са лошијим резултатима тестова епизодичног памћења, независно од пола (217). Међутим, када су испитивани здрави појединци старије животне доби (просечно 63 године) показано је да је у том случају ИР имала већи значај, оштећење епизодичног памћења значајно је корелирало са повишеном резистенцијом на инсулин (218).

Слично је показано и у изданку Фрамингамске студије где су код старијих испитаника који нису имали ДМ повишена ИР и базални инсулин били удружени са лошијим постигнућима на тестовима епизодичног памћења (219).

Могуће је да су године живота заправо један од фактора који обједињује у доприноси испољавању повезаности поремећаја инсулина и глукозе са оштећењем меморије.

У нашем истраживању старија животна доб је била повезана са чешћом заступљеношћу когнитивног оштећења као и са нарушеном ГТ.

У нашем истраживању такође није уочена значајна повезаност присуства ИР са резултатима тестова као ни са успешношћу на појединачним тестовима тј. у специфичним когнитивним доменима (Табела 16).

Показано је да су међу показатељима поремећеног метаболизма глукозе вредности гликемије у 2 сату након глюкозног оптерећења, базални инсулин, НОМА- IR били повезани са повећаним ризиком за настанак сенилних плакова у АД независно од година, пола, крвног притиска и цереброваскуларне болести (220).

Када су у питању параметри инсулинског одговора и ИС показало се да су наши испитаници који су имали ниже вредности индекса ИС (по Cederholm-у) постигли лошије резултате на тесту процене брзине обраде информација и комплексне пажње, SDMT, који је уједно препоручен као најпоузданији тест у детекцији когнитивног оштећења у МС

Анализом повезаност појединачних фактора метаболизма глукозе и инсулина са резултатима тестова уочен је тренд негативне повезаности вредности глукозе у 120. мин ОГТТ-а са вредностима тестова вербалног учења и енкодирања информација у дугорочно памћење (График 6).

Нарушену толеранцију глукозе подразумевала је било повишену гликемију наше тз. оштећена гукоза наше (ОГН) или повишену гликемију у 120. мин након глюкозног оптерећења тз. изолована патолошка толеранција глукозе (ПТГ) или оба.

Јасно је да су оболели од МС са нарушеном ГТ у нашој студији генерално гледано, испољиле поремећај у домену епизодичног памћења и то са више неуспеха у тестовима визуелног памћења. Међутим, резултати тестова вербалног учења и памћења су значајније негативно корелирали са налазом повишене гликемије у другом сату тј. другој фази инсулинског одговора на глюкозу.

Током ОГТТ-а особе са изолованим ПТГ ће имати гликемије наше сличне онима који имају нормалну толеранцију глукозе. Међутим, након оралног оптерећења глюкозом долази до пораста глукозе током целог теста, а глюкоза остаје повишена и након 120 минута. Са друге стране код особа које имају изоловано ОГН њихова базична гликемија виша је у односу на оне особе које имају нормалну ГТ и ПТГ, и то се у 30. и 60. мин теста одржава да би након тога дошло до пада и нормализације глукозе у 120 минути. Ове две врло различите криве толеранције глукозе израз су различитих патофизиолошких поремећаја у глюкозној хомеостази. И ОГН и ПТГ су одраз стања ИР, разликују се у односу на њено место и механизам деловања. Особе са ОГН преобладајуће имају ИР у јетри, а особе које имају изолован ПТГ имају нормалну или

врло благо снижену ИС у јетри, али доминантну ИР у мишићима, могућа је и комбинација ова два поремећаја глукозне хоомеостазе (221).

Анализирањем заједничког утицаја присуства нарушене ГТ, ИР и алела  $\epsilon 4$  у гену за АПОЕ код наших болесника са МС на когнитивна постигнућа по тестовима није установљен значајнији утицај њиховог удруженог ефекта на резултате тестова.

Међутим у другим истраживањима, која уистину нису везана за популацију са МС, показан је на изврстан начин међузависни утицај ИР и АПОЕ на когницију.

У студији која је обухватила нешто старије испитанике преко 60 година са благим когнитивним поремећајем, повишену ИР пратила су лошија постигнућа на тестовима семантичког памћења али само код оних испитаника који су били носиоци  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ (222).

Са друге стране значајна разлика у повезаности ИР са когнитивним поремећајем установљена је у односу на присуство  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ и женског пола у популационој студији код здравих испитаника средњих година. Код особа женског пола уочена је снажна негативна повезаност вредности НОМА-ИР са постигнућима на тестовима вербалне флуентности (егзекутивне функције) али само код оних које нису поседовале  $\epsilon 4$  алел у гену за АПОЕ (223).

Интраназална терапија инсулином код оболелих од АД значајно је побољшавала когнитивне перформансе оболелих преваходно у домену вербалног памћења. (119).

Међутим, показано је да  $\epsilon 4$  алел и гену за АПОЕ модификовао позитиван ефекат интраназалне терапије инсулином на когницију код оболелих од АД и благог когнитивног поремећаја, тако да су особе које нису биле носици овог алела имале повољнији ефекат ове терапије. Носиоци  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ резистентнији су на централно деловање инсулина могуће услед израженије мождане патологије удружене са присуством овог ризичног алела (224).

## **5.8 Завршна разматрања**

Мултипла склероза као комплексна болест, недефинисана етиопатогенетски има значајно заступљен когнитивни дефицит али је сам процес којим долази до оштећења когнитивних функција непознат. Когнитивни дефицит је присутан и у фази болести када доминира инфламација и у фази одмакле болести у којој су доминантни процеси неуродегенерације. Прати али и независно постоји од оштећења других функционалних система, моторних, церебеларних, сензитивних. Шта доминантно

доводи у патогенетском процесу до опадања когниције? Има ли места да у том етиопатогенетском процесу може допринети поремећај инсулина и генетска предиспозиција услед присуства  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ, била су кључна питања која су покренула наше истраживање.

Један од основних циљева нашег истраживања био је да се испита да ли постоји комбиновани утицај испитиваних потенцијалних фактора ризика, присуство алела  $\epsilon 4$  у гену за АПОЕ и ИР или ГТ на испољавање когнитивног оштећења. Двосмерном анализом варијансе није утврђен комбиновани утицај поменутих параметара на когнитивни статус процењен кроз континуалне вредности тестова. Међутим мултиваријатном логистичком анализом утицаја наведених параметара на когнитивни статус пацијената оболелих од МС показан је значајан независни негативни ефекат присуства алела  $\epsilon 4$  у гену за АПОЕ за настанак благог когнитивног дефицита, тако да оболели од МС има 5.5 пута већи ризик да ће развити благи когнитивни дефицит у колико је носилац  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ, независно од тога да ли постоји ИР и нарушена ГТ. (OR=5.55, 95% CI, 0.96-32.25,  $p=0.049$  коригован на ефекат глукозне толеранције и инсулинске резистенције (Табела 18).

Наведено јасно потврђује и налаз који је добијен када је повезаност оштћене ГТ, ИР и присуства алела  $\epsilon 4$  у гену са АПОЕ појединачно посматрана у односу на степен когнитивног оштећења. Учињено је поређење група пацијената који имају благи когнитивни дефицит и пацијената који немају когнитивно оштећење и поређење пацијената са когнитивним оштећењем са групом која има благи когнитивни дефицит, у односу на присуство наведених чиналаца. Показана је гранична статистичка значајност у разлици дистрибуције  $\epsilon 4$  алела у односу на когнитивни статус, на начин да је алел  $\epsilon 4$  био најзаступљенији у групи са благим когнитивним дефицитом, уз изостанак ефекта друга два потенцијална фактора ризика на когнитивно оштећење уопште (Табела 17).

Алел  $\epsilon 4$  у гену са АПОЕ у нашој испитиваној популацији, као што је већ речено, био независни предиктор благог когнитивног дефицита. У тој групи пацијената алел  $\epsilon 4$  је најзаступљенији и статистички значајно чешћи у односу на групу која нема когнитивни дефицит. Испитаници у групи са благим когнитивним поремећајем поред тога што су имали чешће заступљен алел  $\epsilon 4$  имали су значајно већи EDSS и MSSS у односу на групу која нема когнитивни дефицит. Међутим присуство  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ није показало позитивну повезаност са већим EDSS скором и MSSS скором у укупној групи



испитаника што говори да би присуство  $\epsilon 4$  алела у овој групи болесника могло бити у основи настанка когнитивног дефицита а не и прогресивнијег тока болести, како је показано у претходном истраживању у популацији оболелих од МС у Србији (194).

Групу са благим когнитивним поремећајем одликовала је статистички значајно млађа животна доб и виши степен образовања у односу на групу са когнитивним оштећењем, што би суштински могло да релативизује испољени степен когнитивног оштећења (благих когнитивних дефицит) обзиром на присуство веће когнитивне резерве. Када у истим групама болесника упоредимо степен функционалног оштећења и степен прогресије болести уочавамо да је разлика између група већа у EDSS скору него у MSSS скору што говори у прилог прогресивније болести у групи са благим когнитивним поремећајем. Међутим иако је познато да степен когнитивног дефицита не мора увек да прати и степен функционалног оштећења управо је показано да се MSSS налази у групи потенцијалних предиктора благог когнитивног дефицита. Наиме, када су даљом анализом и остали клинички фактори, испитивани у овом истраживању у смислу предиктора когнитивног оштећења, укључени у мултиваријантни регресиони модел у циљу дефинисања статистички најзначајнијег мултифакторијалног модела који са највећим коригованим процентом објашњава варијабилност когнитивног статуса пацијената са МС показано је следеће. Анализом потенцијалних предиктора благог когнитивног поремећаја у односу на пацијенте који су когнитивно очувани указано је да мултифакторијални модел који чини пол оболелог, дужина трајања болести, укупан број релапса, MSSS и присуство алела  $\epsilon 4$  у гену за АПОЕ има предиктивни значај. Највећи степен значајности показује степен прогресије болести иза чега се налази дужина трајања болести и присуство испитиваног генетског фактора ризика са истим степеном значајности. Са друге стране такође значајан предиктор био је и мањи број релапса што може бити објашњено тиме да број релапса опада са дужином трајања болести обзиром да болест патогенетски прелази из инфламаторне у дегенеративну фазу.

Показано је да је женски пол потенцијални предиктор како за благи когнитивни дефицит тако и за оштећење меморије, уз мању значајност (на нивоу тренда  $p=0.07$ ) за теже когнитивно оштећење у односу на пацијенте који немају когнитивно оштећење (Табеле 19, 20, 21). У нама доступној литератури нема конзистентних података који указују да се когнитивно оштећење чешће јавља код жена у МС за разлику од обољевања од АД која преобладају у женском полу. Како група оболелих жена није

имала већу заступљеност испитиваних чинилаца (старост, степен образовања, АПОЕ ε4, EDSS, MSSS, дужина трајања болести) који су повезани са ризиком за когнитивно оштећење у овом истраживању, у односу на мушкарце, овај резултат даје додатни значај женском полу као потенцијалном предиктору за настанак когнитивног оштећења. У нашој групи испитаника је било мање припадница женског пола због анализе специфичне, претежно војне, популације пацијената, што није случај у реалној расподели полова у самој болести. Све заједно би могло да укаже да би реалнија расподела пола у анализираној групи пацијената могла да буде повезана са већом заступљеношћу когнитивног поремећаја. Могуће је да се исто односи и на остале показане потенцијалне предикторе когнитивног оштећења обзиром да се њихова дистрибуција по полу није разликовала.

Поред пола као потенцијалног предиктора когнитивног оштећења, бржа прогресија болести изражена MSSS као и дуже трајања болести су мултиваријатном регресионом анализом показани као конзистентни потенцијални предиктори присуства когнитивног поремећаја у нашој групи пацијената независно од његовог степена изражености (благи или изразитији), као и за специфични домен меморијског оштећења (Табела 19, 20, 21).

Од параметара метаболизма инсулина и глукузе мултиваријатна регресиона анализа као једини потенцијални предиктор когнитивног оштећења дефинише нижи инсулински одговор на стимулацију глукозом (површина испод криве за инсулин која је одређена вредностима инсулина увременским тачкама ОГТТ у 0, 30. и 120. мин) и то само за домен меморијског оштећења на начин да је мања површина испод криве за инсулин представљала фактор ризика за присуство меморијског дефицита (Табела 21). Наведено би се могло сматрати неочекиваним резултатом за разлику од уоченог да је оштећена ГТ у нашој групи испитаника доводила до лошијих резултата на тестовима епизодичног памћења како визуелног тако и вербалног као и да је појединачном анализом постигнућа на СПАРТ тесту који процењује брзину процесуирања информација и комплексну пажњу, установљена повезаност са нижом сензитивношћу ткива на инсулин. Заправо механизам поремећаја инсулина и глукозе у МС није довољно разјашњен. Могуће је да обзиром да се ради о аутоимуној болести у оквиру које се не искључује ни аутоимуни процес на нивоу панкреаса који би на другачији начин конфигурирао у патофизиологији поремећаја глукозног метаболизма у односу на познате механизме у предиабетесу тип 2.

Сложени патофизиолошки процеси у настанку метаболичких поремећаја глукозе и инсулина додатно се усложњавају посматрани у контексту МС, нарочито када се у причу укључи сложени механизам аутоимуности, инфламације и неуродегенерације, као и мождана ИР која би пак са своје стране могла имати ефекат на регулацију метаболизма на периферији и самим тим на мерљиве параметре којима се ми тренутно руководимо. Који би механизми заправо били одговорни за настанак ИР код појединих болесника са МС и да ли и којим механизмом би могли допринети когнитивном оштећењу и даље остаје непознаница и свакако својом сложеносту захтева даље испитивање и мутидисциплинарни приступ у сагледавању.

**VI**  
**ЗАКЉУЦИ**

## 6. Закључци:

1. Заступљеност когнитивног оштећења износила је 39,51 %, док је 70.37% болесника имало лош резултат на најмање једном тесту. У обрасцу когнитивног оштећења најзаступљенији је неуспех на меморијским тестовима који је показан код 67% пацијената.
2. Постојању когнитивног оштећења значајно доприноси, старост, нижи степен образовања, степен функционалне онеспособљености процењен EDSS-ом и брзина прогресије болести изражена MSSS-ом са превасходним утицајем на брзину обраде информација, док EDSS доприноси оштећењу свих процењиваних когнитивних домена.
3. Подгрупа носилаца  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ чинила је 21% док је његова заступљеност у целокупном узорку болесника износила 12%, без повезаности са фенотипом болести.
4. Нарушену глукозну толеранцију испољило је 24,69 % оболелих , док 23,4% испитаника има инсулинску резистенцију на основу НОМА1-IR индекса. Болесници који су патолошки толерисали глукозу били су значајно старији и имали су значајно већи EDSS скор. Болесници код којих је болест дуже трајала имали значајно веће вредности индекса инсулинске резистенције, НОМА1-IR.
5. Примена имуномодулаторне терапије типа IFN $\beta$  1b не показије повезаност ни са једним од испитиваних параметара (параметри метаболизма инсулина и гулозе, когнитивни статус.)
6. Инсулинска резистенција и оштећена глукозна толеранција нису повезане са постојањем и тежином когнитивног оштећења. Нарушена толеранција глукозе повезана је са оштећењем визуелне и вербалне меморије.
7. Алел  $\epsilon 4$ у гену за АПОЕ значајније је заступљен у групи болесника са блажим когнитивним дефицитом без повезаности са специфичним когнитивним доменима.
8. Истовремено присуство  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ и инсулинске резистенције није показало комбиновани ефекат на постојање и тежину когнитивног оштећења као ни на оштећење меморије.
9. Постоји значајан независни негативни ефекат алела  $\epsilon 4$ у гену за АПОЕ за настанак благог когнитивног дефицита. Присуство алела  $\epsilon 4$  носи 5.5 пута већи

ризик оболелог да ће развити благи когнитивни дефицит независно од присуства показатеља инсулинске резистенције.

10. Установљени предиктори благог когнитивног дефицита су женски пол, дуже трајање болест, мањи број релапса, прогресивнији ток болести (изражен MSSS-ом) и присуство  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ.
11. Установљени предиктори когнитивног оштећења су дуже трајање и прогресивнији ток болести.
12. Установљени предиктори меморијског оштећења су женски пол, дуже трајање болести, мањи број релапса, прогресивнији ток болести и нижи инсулински одговор на стимулацију глукозом.

## **VII**

# **ЛИТЕРАТУРА**

## 7. Литература

1. Kamm PC, Uitdehaag MB, Polman HC. Multiple Sclerosis: Current Knowledge and Future Outlook . *Eur Neurol* 2014;72:132–41.
2. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L, Milanov I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe (review). *Eur J Neurol* 2006; 13: 700–22.
3. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology (review). *Lancet Neurol* 2010; 9: 520–32.
4. Tullman JM. Overview of the Epidemiology, Diagnosis, and Disease Progression Associated With Multiple Sclerosis. *Am J Manag Care* 2013;19:S15-S20.
5. Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008; 255 [Suppl 6]:2–6.
6. Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 1996; 119: 449–55.
7. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev* 2012; 248: 87–103.
8. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Bronnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler* 2005; 11: 504–10.
9. Sadovnick AD, Yee IM, Ebers GC. Factors influencing siblings risks for multiple sclerosis. *Clin Genet* 2010; 58:431–35
10. Dinčić E , Živković M. Geni i multipla skleroza. Beograd: Calibris; 2012.
11. Oksenberg JR, Baranzini SE, Barcellos LF, Hauser SL. Multiple sclerosis: genomic rewards. *J Neuroimmunol* 2001 Feb 15;113(2):171-84.
12. Sloka S, Silva C, Pryse-Phillips, Patten S, Metz L, Yong VW. A quantitative analysis of suspected environmental causes of MS. *Can J Neurol Sci* 2011; 38: 98–105.
13. Mandia D, Ferraro EO, Nosari G, Montomoli C, Zardini E, Bergamaschi R. Environmental Factors and Multiple Sclerosis Severity: A Descriptive Study. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11: 6417-32.
14. Simpson S Jr, Taylor B, Bizzard A et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;68:193–203.
15. Mowry EM, Waubant E, Mcculloch CE et al. Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2012;72:234–40.
16. Lunemann JD, Munz C. EBV in MS: guilty by association? *Trends Immunol* 2009;30:243–8.



17. Wammes LJ, Mpairwe H, Elliott AM, Yazdanbakhsh M. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological and clinical considerations. *Lancet Infect Dis* 2014;14:1150–62.
18. Rejdak K, Eikelenboom MJ, Petzold A, Thompson EJ, Stelmasiak Z, Lazeron RHC, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BMJ, Giovannoni G. CSF nitric oxide metabolites are associated with activity and progression of multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 63: 1439–45.
19. Steinman L. A rush to judgment on Th17. *J Exp Med* 2008;205:1517-22.
20. Čovičković Šternić N, urednik. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje multiple skleroze. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, Beograd; 2013.
21. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010; 162: 1-11.
22. Venken K, Hellings N, Liblau R, et al. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2010; 16: 58-68.
23. Lucchinetti C, Brueck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707–17.
24. L Haider, T Zrzavy, S Hametner, R Höftberger. The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain* 2016; 139: 807–15.
25. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2015; 14: 183–93.
26. Stadelmann C, Wegner C, Bruck W. Inflammation, demyelination, and degeneration - Recent insights from MS pathology. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:275–282.
27. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 2002; 125:1676–95.
28. Hans Lassmann<sup>1</sup>; Wolfgang Brück<sup>2</sup>; Claudia F. Lucchinetti. The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. *Brain Pathol* 2007;17:210–18.
29. Miller DH, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *The Lancet Neurology* 2005; 4 (5): 281 – 88.
30. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502–17.

31. 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; 69:292–302.
32. Torkildsen O, Myhr KM, Bo L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications.. *Eur J Neurol* 2016 Jan;23 Suppl 1:18-27.
33. Hauser SL, Chan JR, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: prospects and promise. *Ann Neurol* 2013; 74: 317–27.
34. Mendes A, Sa MJ. Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis: how it acts, how it works. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011 Jun;69(3):536-43.
35. Kieseier CB. The Mechanism of Action of Interferon- $\beta$  in Relapsing Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 2011;25(6):491-502.
36. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74(Suppl 1):S17-S24.
37. Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, Hoffmann LA, Kumpfel T, Pellkofer H, Derfuss T, Ionescu C, Starck M, Hafner C, Hohlfeld R, Meinl E. Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain* 2008;131:1455-63.
38. Marnett G, Serra C, Astone V, et al. Inhibition of multiple-sclerosis-associated retrovirus as biomarker of interferon therapy. *J Neurovirol* 2008;14:73-7.
39. Narayanan S, De Stefano N, Francis GS, et al. Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J Neurol* 2001; 248:979-86.
40. Rao SM, Leo GJ, Ellington L, Nauertz T, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning. *Neurology* 1991; 41(5): 692–96.
41. Amato MP, Ponziani G, Siracusa G, Sorbi S. Cognitive dysfunction in early-onset multiple sclerosis: a reappraisal after 10 years. *Arch Neurol* 2001; 58(10):1602-6.
42. Flensner G, Landtblom AM, Soderhamn O, Ek AC. Work capacity and health-related quality of life among individuals with multiple sclerosis reduced by fatigue: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 2013; 13:224.
43. Achiron A, Chapman J, Magalashvili D, Dolev M, Lavie M, Bercovich E et. Modeling of cognitive impairment by disease duration in multiple sclerosis: a cross-sectional study. *PloS One* 2013; 8:e71058.

44. Lovera J, Kovner B. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012; 12(5):618-27.
45. Lebrun C, Blanc F, Brassat D, Zephir H, de Seze J, CFSEP. Cognitive function in radiologically isolated syndrome. *Mult Scler* 2010; 16(8): 919–25.
46. Amato MP, Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Iudice A, Della Pina D et al. Relevance of cognitive deterioration in early relapsing-remitting MS: a 3-year follow-up study. *Mult Scler* 2010;16:1474–82.
47. Hankomaki E, Multanen J, Kinnunen E, Hamalainen P. The progress of cognitive decline in newly diagnosed MS patients. *Acta Neurol Scand.* 2014; 129(3):184-91.
48. Kujala P, Portin R, Ruutiainen J. The progress of cognitive decline in multiple sclerosis. A controlled 3-year follow-up. *Brain* 1997;120(Pt 2):289–97.
49. Feuillet L, Reuter F, Audoin B, Malikova I, Barrau K, Cherif AA, Pelletier J. Early cognitive impairment in patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007;13:124–27.
50. Zipoli V, Goretti B, Hakiki B, Siracusa G, Sorbi S, Portaccio E. et al. Cognitive impairment predicts conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. *Mult Scler* 2010; 16(1): 62–7.
51. Portaccio E, Stromillo ML, Goretti B, Zipoli V, Siracusa G, Battaglini M. et al. Neuropsychological and MRI measures predict short-term evolution in benign multiple sclerosis. *Neurology* 2009; 73(7): 498–503.
52. Arnett PA, Rao SM, Bernardin L, Grafman J, Yetkin FZ, Lobeck L. Relationship between lobe lesions and Wisconsin Card Sorting Test performance in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1994; 44(3 Pt 1): 420–25.
53. Swirsky-Sacchetti T, Mitchell DR, Seward J, Gonzales C, Lublin F, Knobler R. et al. Neuropsychological and structural brain lesions in multiple sclerosis: a regional analysis. *Neurology* 1992; 42(7): 1291–95.
54. Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F, Mattisi I, Grossi P, Favaretto A. et al. Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66(9): 1144–50.
55. Yaldizli O, Penner IK, Frontzek K, Naegelin Y, Amann M, Papadopoulou A. et al. The relationship between total and regional corpus callosum atrophy, cognitive impairment and fatigue in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2014; 20(3): 356–64.
56. Edgar C, Jongen PJ, Sanders E, Sindic C, Goffette S, Dupuis M, Jacquerye P, Guillaume D, Reznik R, Wesnes K. Cognitive performance in relapsing remitting multiple sclerosis: a

- longitudinal study in daily practice using a brief computerized cognitive battery. *BMC Neurol* 2011;11:68.
57. Llufríu S, Martínez-Heras E, Fortea J, Blanco Y, Berenguer J, Gabilondo I, Ibarretxe-Bilbao N, Falcon C, Sepulveda M, Sola-Valls N, Bargallo N, Graus F, Villoslada P, Saiz A. Cognitive functions in multiple sclerosis: impact of gray matter integrity. *Mult Scler* 2014; 20(4):424-32.
  58. Hulst HE, Steenwijk MD, Versteeg A, Pouwels PJ, Vrenken H, Uitdehaag BM, Polman CH, Geurts JJ, Barkhof F. Cognitive impairment in MS: impact of white matter integrity, gray matter volume, and lesions. *Neurology* 2013; 80(11):1025-32.
  59. Rao SM, The Cognitive Function Study Group of the National Multiple Sclerosis Society. A manual for the Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests in multiple sclerosis. Milwaukee: Section of Neuropsychology, Medical College of Wisconsin; 1990.
  60. Benedict RH, Fischer JS, Archibald CJ, Arnett PA, Beatty WW, Bobholz J et al. Minimal neuropsychological assessment of MS patients: a consensus approach. *Clin Neuropsychol* 2002;16:381–97.
  61. Melanson M, Grossberndt A, Klowak M, Leong C, Frost EE, Prout M, et al. Fatigue and cognition in patients with relapsing multiple sclerosis treated with interferon beta. *Int J Neurosci* 2010;120(10):631–40.
  62. Patti F, Amato MP, Bastianello S, Caniatti L, DiMonte E, Ferrazza P, et al. Effects of immunomodulatory treatment with subcutaneous interferon beta-1a on cognitive decline in mildly disabled patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010;16(1):68–77.
  63. Farrer, LaCLHJL, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: A meta-analysis. *JAMA* 1997; 278(16):1349-56.
  64. Holtzman DM, Fagan AM. Potential role of apoE in structural plasticity in the nervous system; implications for disorders of the central nervous system. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8: 250–55.
  65. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer’s disease. *Trends Neurosci* 1994;17: 525–30.
  66. Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Nacmias B, Stromillo ML, Bartolozzi ML, Siracusa G, Guidi L, Federico A, Sorbi S, De Stefano N, Amato MP. APOE-epsilon4 is not associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15(12):1489-94.

67. Ghaffaro, Feinstein A. APOE  $\epsilon$ 4 and Cognitive Dysfunction in Multiple Sclerosis: A Review. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 2010; 22:155–165:1208–14.
68. Lahoz C, et al. Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001; 154:529–37.
69. Frieden C, Garai K. Structural differences between apoE3 and apoE4 may be useful in developing therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:8913–8.
70. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res.* 2011; 50(1): 62-74.
71. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997; 278(16):1349-56.
72. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):8098-102.
73. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Abstract Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2013 ;9(2):106-18.
74. Svennerholm L, Gottfries CG. Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (Type I) and demyelination in lateonset form (Type II). *J Neurochem.* 1994; 62:1039–47.
75. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 2009; 63:287–303.
76. Deane R, et al. ApoE isoform-specific disruption of amyloid  $\beta$  peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 2008; 118:4002–13.
77. Barthel H, et al. Cerebral amyloid-beta PET with florbetaben (18F) in patients with Alzheimer's disease and healthy controls: a multicentre phase 2 diagnostic study. *Lancet Neurol* 2011; 10:424– 35.
78. Berlau DJ, Corrada MM, Head E, Kawas CH. APOE epsilon2 is associated with intact cognition but increased Alzheimer pathology in the oldest old. *Neurology* 2009;72(9):829-34.

79. Polvikoski, T, Sulkava, R, Haltia, M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, Niinisto L, Halonen P, Kontula K. Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta amyloid protein. *N Engl J Med* 1995; 333(19): 1242–7.
80. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(23):11183-6.
81. Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekoni L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scarce-Levie K, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW, Huang Y. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(19):10966-71.
82. Dumanis SB, et al. ApoE4 decreases spine density and dendritic complexity in cortical neurons in vivo. *J Neurosci* 2009; 29:15317–22.
83. Mu Y, Gage F. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2011; 6:85.
84. Ringman JM, EDGDH, et al. Plasma signaling proteins in persons at genetic risk for alzheimerdisease: Influence of apoe genotype. *Arch Neurol.* 2012; 69:757–64.
85. Jack CR Jr<sup>1</sup>, Shiung MM, Gunter JL, O'Brien PC, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Cha RH, Tangalos EG, Petersen RC Comparison of different MRI brain atrophy rate measures with clinical disease progression in AD. *Neurology* 2004;62(4):591-600.
86. Zhong N, Weisgraber KH: Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer's disease: clues from its structure. *J Biol Chem* 2009; 284:6027–31
87. Bookheimer S, Burggren A. APOE-4 genotype and neurophysiological vulnerability to Alzheimer's and cognitive aging. *Annu Rev Clin Psychol* 2009;5:343–62.
88. Shi.J, Han. P, Kuniyoshi SM.Cognitive Impairment in Neurological Diseases: Lessons from Apolipoprotein E. *Journal of Alzheimer's Disease* 2014;38(1):1-9.
89. Marioni ER, Campbell A, Hayward C, Porteous JD, Deary JI. Differential effects of the APOE e4 allele on different domains of cognitive ability across the life-course *European Journal of Human Genetics* 2015; doi: 10.1038/ejhg.2015.210
90. Flory JD, Manuck SB, Ferrell RE, Ryan CM, Muldoon MF. Memory performance and the apolipoprotein E polymorphism in a community sample of middle-aged adults. *Am J Med Genet* 2000;96(6):707-11.

91. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, Saunders AM, Hardy J. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 284–9.
92. Parmenter BA, Denney DR, Lynch SG, et al: Cognitive impairment in patients with multiple sclerosis: association with the APOE gene and promoter polymorphisms. *Mult Scler* 2007; 13:25–32.
93. Shi J, Tu JL, Gale SD, Baxter L, Vollmer TL, Campagnolo DI, Tyry TM, Zhuang Y, Kuniyoshi SM. APOE ε4 Is Associated With Exacerbation of Cognitive Decline in Patients With Multiple Sclerosis *Cognitive & Behavioral Neurology* 2011; 24(3):128-33.
94. Koutsis G, Panas M, Giogkaraki E, et al. APOE epsilon4 is associated with impaired verbal learning in patients with MS. *Neurology* 2007; 68:546–9.
95. Fazekas F, Strasser-Fuchs S, Schmidt H, et al. Apolipoprotein E genotype related differences in brain lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69:25–8.
96. Enzinger C, Ropele S, Smith S, et al. Accelerated evolution of brain atrophy and “black holes” in MS patients with APOE epsilon. *Ann Neurol* 2004; 55:563–9.
97. Enzinger C, Ropele S, Strasser-Fuchs S, et al. Lower levels of N-acetylaspartate in multiple sclerosis patients with the apolipoprotein E epsilon4 allele. *Arch Neurol* 2003; 60:65–70.
98. Ghaffar O, Reis M, Pennell N, O'Connor P, Feinstein A. APOE ε 4 and the cognitive genetics of multiple sclerosis *Neurology* 2010;74:1611–8.
99. Carmona O, Masuet C, Santiago O, Alira P, Moral E, Alonso- Magdalena L, Casado V, Arbizu T. Multiple sclerosis and cognitive decline: is ApoE-4 a surrogate marker? *Acta Neurol Scand* 2011; 124: 258–63.
100. Lanzillo R, Prinster A, Scarano V, et al. Neuropsychological assessment, quantitative MRI and APOE gene polymorphisms in a series of MS patients treated with IFN beta-1b. *J Neurol Sci* 2006; 245:141–5.
101. Vienberg SG, Bouman SD, Sorensen H, Stidsen CE, Kjeldsen T, Glendorf T, et al. Receptor-isoform-selective insulin analogues give tissue-preferential effects. *Biochem J* 2011;440(3):301–8.
102. Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24(8):855–72.

103. Blazquez E, Velazquez E, Hurtado-Carneiro V, Ruiz-Albusac JM. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and alzheimer's disease. *Front Endocrinol* 2014; 5: 161.
104. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000;289:2122–5.
105. Sarah M. Gray, Rick I. Meijer and Eugene J. Barret Insulin Regulates Brain Function, but How Does It Get There? *Diabetes* 2014;63:3992-7.
106. Wallum BJ, Taborsky GJ Jr., Porte D Jr., et al. Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:190–4.
107. Kern W, Benedict C, Schultes B, et al. Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia* 2006;49:2790–9.
108. Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol* 2013;47:145–71.
109. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transport expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 2004; 490(1–3):13–24.
110. Piroli GG, Grillo CA, Hoskin EK, Znamensky V, Katz EB, Milner TA, et al. Peripheral glucose administration stimulates the translocation of GLUT8 glucose transporter to the endoplasmic reticulum in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 2002; 452(2):103–14.
111. Yanagita T, Nemoto T, Satoh S, Yoshikawa N, Maruta T, Shiraishi S, Sugita C, Murakami M. Neuronal insulin receptor signaling: a potential target for the treatment of cognitive and mood disorders. InTech 2013, Rijeka, in: Kocabasoglu N (ed) *Mood disorders*. pp 263–288.
112. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci* 2003; 23(18):7084–92.
113. Rensink AA, Otte-Holler I, deBoer R, Bosch RR, tenDonkelaar HJ, deWaal RM, et al. Insulin inhibits amyloid beta-induced cell death in cultured human brain pericytes. *Neurobiol Aging* 2004; 25(1):93–103.
114. Garg R, Chaudhuri A, Munschauer F, Dandona P. Hyperglycemia, insulin, and acute ischemic stroke: a mechanistic justification for a trial of insulin infusion therapy. *Stroke* 2006; 37(1):267–73.
115. Heni M. et al. Impaired insulin action in the human brain: causes and metabolic consequences. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(12):701-11.



116. Kleinridders, A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes* 2014; 63: 2232–43 .
117. Špirić Ž. Povezanost hroničnog posttraumatskog stresnog poremećaja i sindroma insulinske rezistencije. Doktorska teza. Beograd 2003.
118. Heni M., Schopfer P, Peter A, Sartorius T, Fritsche A, Synofzik M, Haring HU, Maetzler W, Hennige AM. Evidence for altered transport of insulin across the blood–brain barrier in insulin-resistant humans. *Acta Diabetol* 2014; (51):679–81.
119. De la Monte SM. Intranasal insulin therapy for cognitive impairment and neurodegeneration: current state of the art. *Expert Opin Drug Deliv* 2013;10(12):1699-709.
120. Duarte JM. Metabolic Alterations Associated to Brain Dysfunction in Diabetes. *Aging and Disease* 2015 ;6(5):304-21.
121. Tschritter, O, Preissl H, Hennige AM, Sartorius T, Grichisch Y, Stefan N, Guthoff M, Düsing S, Machann J, Schleicher E, Cegan A, Birbaumer N, Fritsche A, Haring HU. The insulin effect on cerebrocortical activity is associated with serum concentrations of saturated nonesterified fatty acids. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(11):4600–7 .
122. Konner AC, Bruning, JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab* 2012; 16(2); 144–52
123. Reger MA. et al. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by *APOE* genotype. *Neurobiol. Aging* 2006;27: 451–8.
124. Schioth HB, Craft S, Brooks SJ, Frey WH 2nd, Benedict C. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Mol Neurobiol* 2012; 46(1):4-10.
125. Benedict C, Frey WH 2nd, Schioth HB, Schultes B, Born J, Hallschmid M. Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Exp Gerontol* 2011; 46(2-3):112-5.
126. Pasquier F, Boulogne A, Leys D, Fontaine P. Diabetes mellitus and dementia. *Diabetes Metab* 2006; 32(1):403-14 .
127. Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sunram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ et al. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol Psychiatry* 2006; 11(8): 721-36.
128. Monte SM. Brain Insulin Resistance and Deficiency as Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 2012;( 9): 35-66.

129. Langbaum JB, Chen K, Caselli RJ, Lee W, Reschke C, Bandy D, et al. Hypometabolism in Alzheimer-affected brain regions in cognitively healthy Latino individuals carrying the apolipoprotein E epsilon4 allele. *Arch Neurol* 2010; 67(4):462-8 .
130. Watson GS, Craft S. Insulinresistance, inflammation, and cognition in Alzheimer'sDisease: lessons for multiplesclerosis. *J Neurol Sci* 2006; 245(1-2):21-33
131. Kim B, Feldman EL. Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. *Experimental Molecular Medicine* 2015;(47): e149.
132. Whitmer RA. Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007; 7(5):373-80.
133. Tong M, de la Monte SM. Mechanisms of ceramide-mediated neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 2009;16(4):705-14.
134. Aviles-Olmos I, Limousin P, Lees A, Foltynie T. Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection. *Brain* 2013;136 ( 2):374-84.
135. Russo CV, Salvatore E, Saccà F, Tucci T, Rinaldi C, Sorrentino P, Massarelli M, Rossi F, Savastano S, Di Maio L, Filla A, Colao A, De Michele G. Insulin Sensitivity and Early-Phase Insulin Secretion in Normoglycemic Huntington's Disease Patients. *Journal of Huntington's Disease* 2013; 2(4): 501-7.
136. Tettey P, Simpson S Jr, Taylor BV, van der Mei IA The co-occurrence of multiple sclerosis and type 1 diabetes: shared aetiologic features and clinical implication for MS aetiology. *J Neurol Sci* 2015 ;348(1-2):126-31.
137. Zivadnov R, Raj B, Ramanathan M, Teter B, Durfee J, Dwyer MG, Bergsland N, Kolb C, Hojnacki D, Benedict RH, Weinstock-Guttman B. Autoimmune Comorbidities Are Associated with Brain Injury in Multiple Sclerosis.*AJNR Am J Neuroradiol* 2016 ; doi: 10.3174/ajnr.A4681 .
138. Mahler A, Steiniger J, BockM, Brandt AU, Haas V, BoschmannM, Paul F. Is metabolic flexibility altered in multiple sclerosis patients. 2012;7(8):e43675
139. Oliveira SR, Simao AN, Kallaur AP, de Almeida ER, Morimoto HK, Lopes J, Dichi I, Kaimen-Maciel DR, Reiche EM. Disability in patients with multiple sclerosis:influence of insulin resistance, adiposity, and oxidative stress. *Nutrition* 2014;(30):268–73.
140. Penesova A, Vlcek M, Imrich R, Vernerova L, Marko A, Meskova M, Grunnerova L, Turcani P, Jezova D, Kollar B. Hyperinsulinemia in newly diagnosed patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis* 2015;(4):895-901.

141. Wada T, Hoshino M, Kimura Y, Ojima M, Nakano T, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Both type I and II IFN induce insulin resistance by inducing different isoforms of SOCS expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;(300): E1112–E1123
142. Kostić S, Kolić I, Raičević R, Stojanović Z, Kostić D, Dinčić E. Insulin resistance in drug naive patients with multiple sclerosis. *Vojnosanitetski pregled* 2016; OnLine-First (00):82-82.
143. Popović S, Dinčić E, Pejović J, Obradović D, Grkić I, Raičević R. Uticaj pulsne kortikosteroidne terapije na promenu indeksa insulinske rezistencije i kognitivni status pacijenata sa multiplom sklerozom. U: Zbornik sažetaka.VII-XIII kongres neurologasa međunarodnim učešćem. Hotel „Šumarice“, Kragujevac, Srbija. 11-14 Septembar 2008. p.102.
144. Brunner R, Schaefer D, Hess K, Parzer P, Resch F, Schwab S. Effect of corticosteroids on short-term and long-term memory. *Neurology* 2005;64:335– 7.
145. Gayoso-Diz P, Otero-Gonzalez A, Rodriguez-Alvarez MX, Gude F, Cadarso-Suarez C, García F, De Francisco A. Insulin resistance index (HOMA-IR) levels in a general adult population: curves percentile by gender and age. The EPIRCE study. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 94(1):146-55.
146. Singh B, Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J Diabetes* 2010;1(2):36-44.
147. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412–9.
148. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;(27):1487–95.
149. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, Zimmet P; Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;(11):3160-7.
150. Matthews SJN, Altman GA, Campbell JM, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* 1990;300:230-5.
151. Allison DB, Paultre F, Maggio C, Mezzitis N, Pi-Sunyer FX. The use of areas under curves in diabetes research. *Diabetes Care* 1995;18(2):245-50.

152. Albareda M, Rodríguez-Espinosa J, Murugo M, de Leiva A, Corcoy R. Assessment of insulin sensitivity and beta-cell function from measurements in the fasting state and during an oral glucose tolerance test. *Diabetologia* 2000;(12):1507-11.
153. Cederholm J, Wibell L. Insulin release and peripheral sensitivity at the oral glucose tolerance test. *Diabetes Res Clin Pract* 1990;(10):167–75.
154. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999 Sep;22(9):1462-70
155. Kurtzke JF. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability scale. *Neurology* 1983; 33:1444-52.
156. 156 Roxburgh RH. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005;64(7):1144-51.
157. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. (1961) An inventory for measuring depression. *Archives of General Psychiatry* 1961;4: 561-71.
158. Beck, AT, Steer RA, Garbin MG. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation. *Clinical Psychology Review* 1988; 8(1): 77-100.
159. Rao SM and the Cognitive Function Study Group of the National Multiple Sclerosis Society. A manual for the Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests in multiple sclerosis. Milwaukee, WI: Medical College of Wisconsin;1990.
160. Amato MP, Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Ricchiuti L, De Caro MF, Patti F, Vecchio R, Sorbi S, Trojano M. The Rao's Brief Repeatable Battery and Stroop test: normative values with age, education and gender corrections in an Italian population. *Multiple Sclerosis* 2006; 12: 787-93.
161. Buschke H. Selective reminding for analysis of memory and learning. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior* 1973; 12: 543–50.
162. Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Iudice A, Pina DD, Malentacchi GM, et al. Reliability, practice effects, and change indices for Rao's brief repeatable battery. *Multiple Sclerosis Journal* 2010;16:611–7.
163. Smith A. Symbol digit modalities test. Western Psychological Services, Los Angeles;1991.
164. Obradovic D, Petrovic M, Antanasijevic I, Marinkovic J, Stojanovic T, Obradovic S. The Brief Repeatable Battery: psychometrics and normative values with age, education and gender corrections in a Serbian population. *Neurol Sci* 2012; 33:1369–74.

165. Amato MP, Zipoli V, Portaccio E. Multiple sclerosis-related cognitive changes: A review of cross-sectional and longitudinal studies. *Journal of the Neurological Sciences* 2006; 245 (1-2) 41 – 6.
166. DeLuca GC, Yates RL, Beale H, Morrow SA. Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis: Clinical, Radiologic and Pathologic Insights *Brain Pathol* 2015; 25(1):79-98.
167. Rogers JM, Panegyres PK. Cognitive impairment in multiple sclerosis: Evidence-based analysis and recommendations. *Journal of Clinical Neuroscience* 2007;14:919–27.
168. Guenter W, Jabłonska J, Bielinski M, Borkowska A. Neuroimaging and genetic correlates of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Psychiatr Pol* 2015; 49(5):897-910.
169. Flechter S, Vardi J, Finkelstein Y, Pollak L. Cognitive dysfunction evaluation in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b: an open-label prospective 1 year study. *Isr Med Assoc J* 2007;9(6):457-9.
170. Penner IK, Stemper B, Calabrese P, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, Miller DH, Montalbán X, Barkhof F, Pleimes D, Lanius V, Pohl C, Kappos L, Sandbrink R. Effects of interferon beta-1b on cognitive performance in patients with a first event suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012 ;18(10):1466-71
171. Portaccio E, Goretti B, Zipoli V, Siracusa G, Sorbi S, Amato MPA short version of Rao's Brief Repeatable Battery as a screening tool for cognitive impairment in multiple sclerosis. *Clin Neuropsychol* 2009 ;23(2):268-75.
172. Cáceres F, Vanotti S, Rao S. Epidemiological characteristics of cognitive impairment of multiple sclerosis patients in a Latin American country. *J Clin Exp Neuropsychol* 2011; 33(10):1094-8
173. Huijbregts SC, Kalkers NF, de Sonneville LM, de Groot V, Reuling IE, Polman CH. Differences in cognitive impairment of relapsing remitting, secondary, and primary progressive MS. *Neurology* 2004; 63(2):335-9.
174. Sepulcre J, Vanotti S, Hernández R, Sandoval G, Cáceres F, Garcea O, Villoslada P. Cognitive impairment in patients with multiple sclerosis using the Brief Repeatable Battery-Neuropsychology test. *Mult Scler* 2006;12(2):187-95.
175. Sumowski JF, Rocca MA, Leavitt VM, Dackovic J, Mesaros S, Drulovic J, DeLuca J, Filippi M. Brain reserve and cognitive reserve protect against cognitive decline over 4.5 years in MS. *Neurology* 2014;82(20):1776-83.
176. Patti F, Amato MP, Trojano M, Bastianello S, Tola MR, Goretti B, Caniatti L, Di Monte E, Ferrazza P, Brescia Morra V, Lo Fermo S, Picconi O, Luccichenti G; COGIMUS Study Group. Cognitive impairment and its relation with disease measures in mildly disabled

- patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: baseline results from the Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis (COGIMUS) study. *Mult Scler* 2009 ;15(7):779-88.
177. Portaccio E, Amato MP, Bartolozzi ML, Zipoli V, Mortilla M, Guidi L, Siracusa G, Sorbi S, Federico A, De Stefano N. Neocortical volume decrease in relapsing-remitting multiple sclerosis with mild cognitive impairment. *J Neurol Sci* 2006; 245(1-2):195-9.
  178. Zivadinov R, Sepcic J, Nasuelli D, De Masi R, Bragadin LM, Tommasi MA, Zambito-Marsala S, Moretti R, Bratina A, Ukmar M, Pozzi-Mucelli RS, Grop A, Cazzato G, Zorzon M. A longitudinal study of brain atrophy and cognitive disturbances in the early phase of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001 ;70(6):773-80.
  179. Feuillet L, Reuter F, Audoin B, Malikova I, Barrau K, Cherif AA, Pelletier J. Early cognitive impairment in patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007;13:124–7.
  180. Rao SM, Grafman J, DiGiulio D. Memory dysfunction in multiple sclerosis: Its relation to working memory, semantic encoding, and implicit learning. *Neuropsychology* 1993;7:364–74.
  181. Sumowski JF, Rocca MA, Leavitt VM, et al. Brain reserve and cognitive reserve in multiple sclerosis: what you’ve got and how you use it. *Neurology* 2013;80:2186–93.
  182. Sumowski JF, Leavitt VM. Cognitive reserve in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013;19:1122–7.
  183. Lynch SG, Parmenter BA, Denney DR. The association between cognitive impairment and physical disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11(4): 469–76.
  184. Jönsson A, Andresen J, Storr L, et al. Cognitive impairment in newly diagnosed multiple sclerosis patients: a 4-year follow-up study. *J Neurol Sci* 2006;245:77–85.
  185. Deloire MS, Bonnet MC, Salort E, et al. How to detect cognitive dysfunction at early stages of multiple sclerosis? *Mult Scler* 2006;12:445–52.
  186. Mokhber N, Azarpazhooh A, Orouji E, Rao SM, Khorram B, Sahraian MA, Foroghi-poor M, Gharavi MM, Kakhi S, Nikkhah K, Azarpazhooh MR. Cognitive dysfunction in patients with multiple sclerosis treated with different types of interferon beta: a randomized clinical trial. *J Neurol Sci* 2014 ;342(1-2):16-20.
  187. Flechter S, Jacob Vardi J, Finkelstein Y, Lea Pollak. Cognitive Dysfunction Evaluation in Multiple Sclerosis Patients Treated with Interferon Beta-1b: An Open-Label Prospective 1 Year Study. *Isr Med Assoc J* 2007 ;9(6):457-9.

188. Coo H, Hopman WM, Edgar CM, et al. The paced auditory serial addition test (PASAT): To what extent is it performed as instructed, and is it associated with disease course? *Mult Scler* 2005;11:85–9.
189. Sartori E, Edan G. Assessment of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2006;245(1-2):169-75.
190. Burwick RM, Ramsay PP, Haines JL, et al. APOE epsilon variation in multiple sclerosis susceptibility and disease severity: Some answers. *Neurology* 2006; 66: 1373–83.
191. Dinčić E, Živković M, Sanković A et al. Association of polymorphisms in CTLA-4, IL-1ra and IL-1 $\beta$  genes with multiple sclerosis in Serbian population. *Journal of Neuroimmunology* 2006; 177:146-150.
192. CoccoE, Sotigiu A, Costa G, et al. HLA-DR, DQ and APOE genotypes and gender influencein Sardinian primary progresive MS. *Neurology* 2005; 64, 564-6.
193. Van der Walt A, Stankovich J, Bahlo M, et al. Apolipoprotein genotype does not influence MS severity, cognition, or brain atrophy. *Neurology* 2009;73:1018 –25.
194. Dinčić E. Povezanost predispozicije, toka i težine multiple skleroze sa genskim polimorfizmima IL-1b, IL-1RA, CTLA-4 i APOE. Doktorska disertacija. Beograd 2004.
195. Shi J, Zhao CB, Vollmer TL, Tyry TM, Kuniyoshi SM. APOE epsilon 4 allele is associated with cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2008; 70: 185–90.
196. Oliveri RL, Cittadella R, Sibilila G, et al. APOE and risk of cognitive impairment in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1999;100:290 –5.
197. Savettieri G, Messina D, Andreoli V, et al. Gender-related effect of clinical and genetic variables on the cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol* 2004;251:1208– 14.
198. Lozovoy MA, Simao AN, Hohmann MS, Simao TN, Barbosa DS, Morimoto HK, et al. Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome. *Lupus* 2011;(20):1356–64.
199. Chung CP, Long AG, Solus JF, Rho YH, Oeser A, Raggi P, Stein CM. Adipocytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to inflammation, insulin resistance and coronary atherosclerosis. *Lupus* 2009;18(9):799-806
200. Mirjafari H, Farragher TM, Verstappen SM, Yates A, Bunn D, Marshall T, Lunt M, Symmons DP, Bruce IN. Seropositivity is associated with insulin resistance in patients with early inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Res Ther* 2011;13(5):R159.

201. Bergouignan A, Rudwill F, Simon C, Blanc S (2011) Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *J Appl Physiol* (1985) 2011; 111(4):1201-10.
202. Rafacho A, Ortsäter H, Nadal A, Quesada I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J Endocrinol* 2014 ;223(3):R49-62.
203. Messier CI. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiol Aging* 2005 ;26 Suppl 1:26-30.
204. Duarte JM. Metabolic Alterations Associated to Brain Dysfunction in Diabetes. *Aging Dis* 2015 ;6(5):304-21.
205. Wens I, Dalgas U, Deckx N, Cools N, Eijnde B. Does multiple sclerosis affect glucose tolerance? *Mult Scler* 2013;20(9):1273-6.
- 206.** Lavela SL, Prohaska TR, Furner S, et al. Chronic diseases in male veterans with multiple sclerosis. *Prev Chronic Dis* 2012; 9: E55.
- 207.** Hussein WI and Reddy SS. Prevalence of diabetes in patients with multiple sclerosis. *Diabetes Care* 2006; 29: 1984–5.
- 208.** Kang JH, Chen YH and Lin HC. Comorbidities amongst patients with multiple sclerosis: A population-based controlled study. *Eur J Neurol* 2010; 17: 1215–9.
- 209.** Sternberg Z, Leung C, Sternberg D, et al. The prevalence of the classical and non-classical cardiovascular risk factors in multiple sclerosis patients. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013; 12: 104–11.
210. Slawta JN, Wilcox AR, McCubbin JA, et al. Health behaviors, body composition, and coronary heart disease risk in women with multiple sclerosis. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84: 1823–30.
211. Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Keller P, Keller C, Pedersen BK. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;(286): E234–8.
212. Styskal J, Remmen HV, Richardson A, Salmon A. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med* 2012;(52):46–58
213. Triantafyllou N, Thoda P, Armeni E, Rizos D, Kaparos G, Augoulea A, Alexandrou A, Creatsa M, Tsivgoulis G, Artemiades A, Panoulis C, Lambrinouadaki I. Association of sex hormones and glucose metabolism with the severity of multiple sclerosis. *Int J Neurosci* 2015; 25:1-8.



214. Convit A. Links between cognitive impairment in insulin resistance: An explanatory model. *Neurobiology of Aging* 2005; 26 Suppl 1:31-5.
215. Convit A, Wolf OT, Tarshish C, de Leon MJ. Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(4):2019–22.
216. Backstrom A, Eriksson S, Nilsson LG, Olsson T, Rolandsson O. Glucose but not insulin or insulin resistance is associated with memory performance in middle-aged non-diabetic women: a cross sectional study. *Diabetol Metab Syndr* 2015;7:20
217. Messier C, Awad-Shimoon N, Gagnon M, Desrochers A, Tsiakas M. Glucose regulation is associated with cognitive performance in young nondiabetic adults. *Behav Brain Res* 2011;222(1):81–8.
218. Bruehl H, Sweat V, Hassenstab J, Polyakov V, Convit A. Cognitive impairment in nondiabetic middle-aged and older adults is associated with insulin resistance. *J Clin Exp Neuropsychol* 2010;32(5):487–93.
219. Tan ZS, Beiser AS, Fox CS, Au R, Himali JJ, Debette S, et al. Association of metabolic dysregulation with volumetric brain magnetic resonance imaging and cognitive markers of subclinical brain aging in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2011;34(8):1766–70.
220. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006; 5: 64–74.
221. Zdravković V. Odnos poremećaja insulinske rezistencije i sekrecije kod gojaznih adolescenata sa visokim rizikom za tip 2 dijabetesa. Doktorska disertacija. Beograd, 2015.
222. Kim TE, Lee DH, Kim YJ, Mok JO, Kim CH, Park JH et al. The relationship between cognitive performance and insulin resistance in non-diabetic patients with mild cognitive impairment. *Int J Geriatr Psychiatry* 2015;30(6):551-7.
223. Ekblad LL, Rinne JO, Puukka PJ, Laine HK, Ahtiluoto SE, Sulkava RO, Viitanen MH, Jula AM. Insulin resistance is associated with poorer verbal fluency performance in women. *Diabetologia* 2015 ;58(11):2545-53.
224. Claxton A, Baker LD, Wilkinson CW et al (2013) Sex and ApoE genotype differences in treatment response to two doses of intranasal insulin in adults with mild cognitive impairment or Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 35:789–97.

**VIII**  
**ПРИЛОГ**



# ПРИЛОГ

## 8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ 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:** Смиљана Костић

**Ментор/коментор-МН:** Евица Динчић

**Наслов рада-НР:** Когнитивни поремећај у мултиплој склерози:  
повезаност са инсулинском резистенцијом и  
полиморфизмима у у гену за аполипопротеин Е

**Језик публикације-ЈП:** Српски (ћирилица)

**Језик извода-ЈИ:** Српски/ Енглески

**Земља публикавања-ЗП:** Србија

**Уже географско подручје-УГП:** Шумадија

**Година-ГО:** 2016.

**Издавач-ИЗ:** Ауторски репринт

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

**Физичи опис рада-ФО:** Дисертација има 106 страница, 7, поглавља, 21 табелу, 1 слику, 6 графикана и 224 цитиране библиографске јединице.

**Научна област:** Медицина

**Научна дисциплина-ДИ:** Неуронауке

**Предметна одредница/  
кључне речи-ПО:** мултипла склероза, когнитивни поремећај  
инсулинска резистенција, АПОЕ4

**УДК**

**Чува се-ЧУ:** У библиотеци Медицинског Факултета  
Универзитета у Крагујевцу, Србија

**Важна напомена-ВН:**

**Извод-ИД:** Циљ рада је испитивање повезаности присуства инсулинске резистенције (ИР) и алела  $\epsilon 4$  у гену за АРОЕ независно и удружено са постојањем, тежином и обрасцем когнитивног оштећења код оболелих од МС. Наша хипотеза је да постојање когнитивног оштећења је позитивно повезано са присуством инсулинске резистенције и/или  $\epsilon 4$  алела у гену за АПОЕ.

Методе: Клиничка опсервациона студија пресека обухвата 81 оболелих са дијагнозом клинички дефинитивне МС РР тока. Укупна група испитаника сачињена је од подгрупа: 50 пацијената који од постављања дијагнозе добијају имуномодулаторну терапију IFN $\beta$  1b (Бетаферон) и 31 пацијената који до момента опорављања студије нису добијали терапију која модификује природни ток болести. Код свих испитаника је одређивано: присуство инсулинске резистенције (НОМА индекс); интолеранције на глукозу применом оралног теста толеранције глукозе (ОГТТ); полиморфизми у гену за АПОЕ; когнитивни статус на основу четири неуропсихолошка теста из кратке неуропсихолошке батерије “The Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests“, којима су испитивани најчешће оштећени когнитивни домени.

Резултати: Затупљеност когнитивног оштећења износила је 39,51. Најзаступљеније је оштећење епизодичног памћења, 67% пацијената. Значајно већа заступљеност пацијената са лошијим постигнућем на тесту визуелне меморије била је у групи која је имала оштећену глукозну толеранцију. (80% vs. 54.10%,  $p=0.04$ ). Утврђен је значајан независни негативан ефекат присуства алела  $\epsilon 4$  у гену за са АпоЕ за настанак благог когнитивног дефицита (OR=5.55, 95% CI, 0.96-32.25,  $p=0.049$ ). Присуство алела  $\epsilon 4$  носи 5.5 пута већи ризик оболелог да ће развити благи когнитивни дефицит независно од присутва показатеља ИР. Установљени предиктори благог когнитивног дефицита и меморијског оштећења су женски пол, дуже трајање болест, мањи број релапса, прогресивнији ток болести. Установљени предиктори когнитивног оштећења су дуже трајање и прогресивнији ток болести. Примена имуномодулаторне терапије типа IFN $\beta$  1b није показала повезаност ни са једним од испитиваних параметара.

Закључак: Студија по први пут испитује повезаност метаболичких поремећаја глукозе и инсулина са присуством и карактеристикама когнитивног оштећења у РР МС, независно и удружено са постојањем  $\epsilon 4$  алела у гену за АРОЕ. Чешћа заступљеност  $\epsilon 4$  алела међу пацијентима са когнитивним дефицитом блажег степена у односу на когнитивно очуване, издваја их као групу од интереса за даље праћење због могуће веће осетљивости за будуће когнитивно оштећење. Студија доприноси раном откривању и бољем разумевању когнитивног оштећења у МС које је присутно од најранијих фаза болести,

значајно у предвиђању тока болести, степена функционалне онеспособљености и представља важан фактор у детерминисању терапије која мења природни ток болести.

**Датум прихватања теме од стране ННВ-ДП:** 01. 07. 2015.

**Датум одбране-ДО:**

**Чланови комисије-КО:**

**Председник:** 1. Проф. др. Гордана Тончев, Медицински факултет у Крагујевцу.

**Члан:** 2. Проф. др. Ранко Раичевић, Медицински факултет ВМА,  
Универзитет одбране у Београду.

**Члан:** 3. Доц. др Владимир Јањић, Медицински факултет у Крагујевцу.

## 8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC**

**Accession number-ANO:**

**Identification number:**  
INO

**Documentation type-DT:** Monographic publication

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

**Contents code -CC:** PhD Thesis

**Author-AU:** Smiljana Kostić

**Menthor/co-mentor-MN:** Evica Dinčić

**Title-TI:** Cognitive impairment in multiple sclerosis:  
association with insulin resistance and  
apolipoprotein E polymorphism.

**Language of text-LT:** Serbian

**Language of abstract-LA:** Serbian/English

**Country of publication-CP:** Serbia

**Locality of publication:** Shumadia Municipality  
LP

**Publication year-PY:** 2016.



**Publisher-PU:** Authors reprint

**Publication place-PP:** 34000 Kragujevac, st. Svetozar Markovic 69

**Physical description-PD:** Thesis contains 106 pages, 7 chapters, 21 tables, 6 graphs, 1 image and 224 citations

**Scientific field-SF:** Medicine

**Scientific discipline-SD:** Neuroscience

**Subject/key words-SKW:** multiple sclerosis, cognitive impairment, insulin resistance, APOE4

**UDC**

**Holding data-HD:** Library of Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia

**Note-N:**

**Abstract-AB:**

The aim of this study is examining the relationship between the presence of insulin resistance (IR) and the  $\epsilon 4$  allele in the APOE gene, independently and associated with the existence, severity and pattern of cognitive impairment in patients with MS. According to our hypothesis the existence of cognitive impairment is positively correlated with the presence of insulin resistance and / or  $\epsilon 4$  allele of the APOE gene.

Methods: Clinical observational cross-sectional study includes 81 patients diagnosed with clinically definite MS with RR disease course. The total group of respondents is composed of subgroups: 50 patients are receiving the immunomodulatory therapy IFN $\beta$ 1b (Betaferon) from the moment of diagnosis and 31 patients did not, until the beginning of the study, receive any therapy that modifies the natural course of the disease. In all subjects we determined: the presence of insulin resistance (HOMA index); glucose intolerance using an oral glucose tolerance test (OGTT); the APOE

gene polymorphisms; cognitive status using four neuropsychological tests taken from a neuropsychological battery, "The Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests", which examined the most frequently impaired cognitive domains.

Results: The presence of cognitive impairment was 39.51. The most common is episodic memory impairment, in 67% of patients. Significantly higher incidence of patients with poor achievements in the visual memory test was in the group with an impaired glucose tolerance. (80% vs. 54.10%,  $p = 0.04$ ). We determined a significant independent negative effect of the presence of  $\epsilon 4$  allele in the ApoE gene on the occurrence of mild cognitive impairment (OR = 5.55; 95% CI, 0.96-32.25,  $p = 0.049$ ). The presence of the  $\epsilon 4$  allele represents 5.5 times the risk that the patient will develop a mild cognitive deficit independently from the presence of IR indicators. It was found that the predictors of mild cognitive deficits and memory impairment were female sex, longer illness duration, fewer relapses and more progressive course of the disease. The predictors of cognitive impairment are longer and more progressive course of the disease. Application of the immunomodulatory therapy IFN $\beta$ 1 showed no association with any of the tested parameters.

Conclusion: This study examines for the first time the association between glucose and insulin metabolic disorders with the presence and characteristics of cognitive impairment in RR MS, independently and associated with the existence of  $\epsilon 4$  alleles in the APOE gene. A more frequent presence of  $\epsilon 4$  allele among patients with mild cognitive deficit in comparison to the cognitively preserved ones makes them a group of interest for further observation because of the possible greater vulnerability to future cognitive impairment. The study contributes to the early detection and better understanding of cognitive impairment in MS which is present from the earliest stages of the disease. This is important in predicting the course of the disease, the degree of functional disability and represents an important factor in determining the therapy that alters the natural course of the disease.

**Accepted by the Scientific Board on-ASB:** 01. 07. 2015.

**Defended on-DE:**

**Thesis defended board**

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

|

Chairman : Prof. dr Gordana Tončev, Faculty of Medicine,  
University of Kragujevac, Kragujevac

Member: Prof. dr Ranko Raičević, Faculty of Medicine  
Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade

Member: Assist.Prof. dr Vladimir Janjić, Faculty of Medicine,  
University of Kragujevac, Kragujevac

## 8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

|  |
|--|
| <b><i>I. Аутор</i></b>   |
| Име и презиме: Смиљана Костић  |
| Датум и место рођења: 20.06.1972. Београд  |
| Садашње запослење: Војномедицинска академија, Клиника за неурологију.  |
|  |
| <b><i>II. Докторска дисертација</i></b>  |
| Наслов: „Когнитивни поремећај у мултиплој склерози: повезаност са инсулинском резистенцијом и полиморфозима у гену за аполипопротеин Е“                              |
| Број страница: 106   |
| Број слика: 1, слика, 6 графикана, 21 табела   |
| Број библиографских података: 224  |
| Установа и место где је рад израђен: Војномедицинска академија, Клиника за неурологију, Београд, Србија  |
| Научна област (УДК): Неуронауке  |
| Ментор: проф.др.Евица Динчић   |
|  |
| <b><i>III. Оцена и одбрана</i></b>   |
| Датум пријаве теме: 19. 11. 2014. године   |
| Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-347/15<br>01. 07. 2015.  |
| Комисија за оцену подобности теме и кандидата:<br>1. Проф. др. Гордана Тончев, председник;<br>2. Проф. др. Ранко Раичевић, члан;<br>3. Доц. др Владимир Јањић, члан. |
| Комисија за оцену докторске дисертације:<br>1. Проф. др. Гордана Тончев, председник;<br>2. Проф. др. Ранко Раичевић, члан;<br>3. Доц. др Владимир Јањић, члан.       |
| Комисија за одбрану докторске дисертације:<br>1. Проф. др. Гордана Тончев, председник;<br>2. Проф. др. Ранко Раичевић, члан;<br>3. Доц. др Владимир Јањић, члан.     |
| Датум одбране дисертације:   |

*Неизмерну захвалност за настанак ове докторске дисертације желим да изразим својој пријатељици и менторки проф. Евици Динчић која је била уз мене од тренутка рађања идеје о овом раду коју смо давне 2006.године назвале “Шумадијске поставке”. На сваком кораку овог дугог и тешког пута била је уз мене пружајући ми несебичну помоћ и подршку својим знањем, искуством, вером и љубављу.*

*Велику захвалност дугујем свом начелнику проф. Ранку Раичевићу на помоћи у анализи реализацији овог рада и пре свега на подршци, разумавању које је увек имао за мене.*

*Захваљујем се особљу наше Клинике за неврологију ВМА, драгим колегицама и колегама, који су ми својим радом на клиници направили простор за ангажовање на изради доктората. Посебно се захваљујем др Виктору Пасовском који ми је помогао у раду са пацијентима и прикупљању података. Захваљујем се свим медицинским техничарима, посебно Сузани Марковић и Гордани Мимовић на помоћи око узорковања крви и прикупљању резултата.*

*Захвалност изражавам др Маји Живковић и др Александри Станковић, научним саветницима из лабораторије за радиобиологију и молекуларну генетику Института за нуклеарне науке „Винча“, које су омогућиле израду генетских анализа и помогле при статистичкој обради и анализи резултата ове студије.*

*Захваљујем се нашим пацијентима који су имали воље и стрпљења да својим учешћем допринесу овом истраживању и без којих сав овај рад не би имао смисла.*

*Посебну захвалност дугујем својој ћерки, супругу, сестри и мајци. Њихову помоћ и разумевање не могу да измерим, а речи захвалности некако осташе мале наспрам огромне љубави коју су ми пружили.*