

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 05.06.2024. godine, broj 19/XXVI-1/3-AJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„ Investigation of the prevalence, epidemiological and clinical characteristics of familial occurrence of multiple sclerosis in the population of Belgrade (Istraživanje prevalencije, epidemioloških i kliničkih karakteristika porodične multiple skleroze u populaciji Beograda)“

kandidata dr Alekse Jovanovića. Mentor je prof. dr Tatjana Pekmezović a komentori prof. dr Ivana Novaković i prof. dr Šarlota Mesaroš.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Jelena Drulović, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Gorica Marić, docent na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Borut Peterlin, redovni profesor na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Alekse Jovanovića napisana je na ukupno 74 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi, material i metod, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 51 tabela i dva grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na engleskom i srpskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je najpre definisana multipla skleroza (MS), opisan je njen značaj kao vodećeg netraumatskog uzroka onesposobljenosti kod mladih odraslih osoba, ukratko je opisana učestalost MS u svetu i Evropi i definisani su fenotipovi MS. Zatim je ukratko opisana uloga

genetičkih faktora u etiologiji MS i navedene su definicije porodične multiple skleroze (fMS).

Dalje, obrađene su najvažnije odlike patofiziologije MS, opisana je klinička prezentacija MS, uključujući simptome i znake, i detaljnije su opisani fenotipovi MS. Opisane su ključne tehnike u dijagnostici MS, kao i dijagnostički kriterijumi za MS. Nakon toga, opisani su osnovni principi terapije pacijenata sa MS, kao i prognoza pacijenata sa MS, uključujući i kratke opise skala *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) i *Multiple Sclerosis Severity Score* (MSSS).

U nastavku je podrobnije opisana epidemiologija MS, uključujući njenu distribuciju, demografske karakteristike osoba sa MS i etiologiju, u okviru koje su obrađeni sredinski i genetski faktori rizika za nastanak MS. Na kraju uvoda, detaljnije su opisane odlike fMS poput prevalencije, distribucije među članovima porodice, razlike u kliničkoj prezentaciji i prognozi između fMS i sporadične MS (sMS), i dat je kratak opis fenomena anticipacije.

Ciljevi rada su precizno definisani. Oni uključuju procenu prevalencije fMS u populaciji Beograda, određivanje faktora rizika za nastanak fMS u poređenju sa sMS i kontrolama, utvrđivanje prediktivnih faktora povezanih sa ishodom bolesti kod osoba sa fMS i sMS i karakterisanje retkih varijanti gena kod pacijenata sa fMS pomoću sekvenciranja čitavog egzoma.

U poglavlju **materijal i metod** navedeno je da je istraživanje uključivalo dizajn od četiri opservacione studije, uključujući studiju preseka, dve studije slučajeva i kontrola, kao i retrospektivnu kohortnu studiju, kao i da su studije sprovedene u periodu 2021-2023. godine na Klinici za neurologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS) i na Kliničkom institutu za medicinsku genetiku Univerzitetskog medicinskog centra Ljubljana, Ljubljana, Slovenija.

Studija preseka sa ciljem procene prevalencije fMS u Beogradu sprovedena je na osnovu beogradskog populacionog MS registra koji postoji od 1996. godine na Klinici za neurologiju UKCS. Navedeno je da registar sadrži informacije o svim pacijentima sa MS dijagnozom u Beogradu, a podaci uključuju demografske i kliničke karakteristike pacijenta. Definicija korišćena za fMS bila je slučaj MS sa srodnikom prvog, drugog ili trećeg stepena srodstva sa članom porodice sa MS. Opisano je da su pacijenti sa registrovanim članovima porodice sa MS intervjuisani radi izrade rodoslovnog stabla za svakog probanda iz fMS porodica. Opisano je da je prevalencija fMS je izračunata kao proporcija slučajeva fMS među svim slučajevima

MS u Registru. Poređenja demografskih i kliničkih karakteristika između pacijenata sa fMS i sMS u registru su izvršena korišćenjem hi-kvadrat testa, t-testa za i Mann-Whitney U testa.

Studija slučajeva i kontrola sa ciljem da ispita faktore rizika za razvoj fMS sprovedena je na Klinici za neurologiju UKCS u periodu od marta 2021. do januara 2023. godine. Tri grupe su formirane za analizu: fMS grupa, sMS kontrolna grupa, sa ispitanicima individualno mečovanim sa fMS grupom po polu, uzrastu (± 2 godine) i formi bolesti i kontrolna grupa sa zdravim supružnicima (HC). Kriterijumi za uključivanje u fMS grupu su bili prisustvo srodnika prvog, drugog ili trećeg stepena sa MS i starost ≥ 18 godina. Navedeno je da je za prikupljanje podataka korišćen specifični upitnik koji je ranije preveden, validiran i kulturološki prilagođen za upotrebu u srpskoj populaciji. Opisano je da prvi deo upitnika sadrži pitanja o demografskim podacima učesnika, drugi deo o izlaganju suncu, treći deo o ishrani, četvrti deo o ličnoj i porodičnoj anamnezi, peti deo o faktorima rizika povezanim sa stilom života, a poslednji deo o hormonalnim faktorima koje su popunjavale samo žene. U analizi podataka korišćena je logistička regresija i računati su odnosi šansi (OR) sa odgovarajućim 95% intervalima poverenja (95% CI).

Retrospektivna kohortna studija za procenu prediktivnih faktora povezanih sa ishodima bolesti kod fMS i sMS je kao izvor podataka koristila istorije bolesti pacijenata sa Klinike za neurologiju, UKCS. Navedeno je da su svi učesnici evaluirani u pogledu toka MS i nivoa fizičke onesposobljenosti (EDSS i MSSS) od početka simptoma MS do kraja praćenja. Opisano je da je MSSS računat na osnovu poslednjeg EDSS skora i dužine trajanja bolesti. Kašnjenje u dijagnozi izračunato je kao razlika između starosti pri dijagnozi i starosti pri početku simptoma.

Studija slučajeva i kontrola sa ciljem karakterizacije retkih i neobičnih genskih varijanti kod pacijenata sa fMS korišćena je za istraživanje retkih genskih varijanti kod osoba sa fMS u srpskoj populaciji. Opisano je da je grupa slučajeva uključivala pacijente sa fMS sa srodnikom prvog stepena sa MS, dok su u kontrolnu grupu uključeni pacijenti sa drugim neurološkim bolestima osim MS. Obe grupe su regrutovane na Klinici za neurologiju, UKCS i isključivo su uključivale osobe srpske etničke pripadnosti. Opisano je da je korišćeno sekvenciranje celokupnog egzoma (WES), a da je analiza opterećenja retkih varijanti sprovedena korišćenjem generalizovanog linearnog modela (GLM) u R statističkom okruženju, sa korekcijom za stopu lažnog otkrivanja - *false discovery rate* (FDR)

U poglavlju **rezultati** detaljno su uz tabelarni i grafički prikaz opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana sistematično, jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije, za svaki od rezultata.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 263 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije “**Investigation of the prevalence, epidemiological and clinical characteristics of familial occurrence of multiple sclerosis in the population of Belgrade**“, autora dr Alekse Jovanovića, utvrđeno je ukupno podudaranje teksta koje iznosi 22% (Similarity index). Ovaj stepen podudarnosti je potpuno očekivan zato što je disertacija dr Alekse Jovanovića napisana na engleskom jeziku, po monografskom tipu. Sadržaj radova proisteklih iz doktorske disertacije, koji su prethodno publikovani, uključen je u tekst disertacije, pri čemu su tabele i grafikoni u disertaciji prikazani u identičnom obliku kako su i objavljeni u radovima, uz minimalne izmene radi ujednačenog formatiranja i stila disertacije, uz jasno navođenje izvora, što je u skladu sa Pravilnikom o doktorskim akademskim studijama na Univerzitetu u Beogradu–Medicinskom fakultetu.

Procenat preklapanja teksta disertacije sa tekstom prvog rada je 3%, a sa tekstom drugog rada je 2%.

Ostatak preklapanja (17%) posledica je pretežno, naziva citata, ličnih imena, navođenja korišćene statističkih tehnika, opšte prihvaćenih fraza, slučajnih preklapanja pojedinih reči ili brojeva, i citata, tzv. opštih mesta i podataka, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj (204/18)).

C) Kratak opis postignutih rezultata

Na dan prevalencije, 30. 6. 2022. u populacionom MS registru Beograda registrovano je 2765 osoba sa MS (PwMS), od kojih 1927 žena (69,7%), a 838 muškaraca (30,3%). Prosečna starost PwMS u registru bila je 56,3±14,4 godine. Distribucija PwMS prema fenotipu MS pokazuje da 1689 (63,2%) pacijenata ima relapsno remitentnu MS (RRMS), 638 (23,8%) ima

sekundarno progresivnu MS (SPMS), a 347 (13,0%) ima primarno progresivnu MS (PPMS).

Među svim pacijentima u registru, registrovano je 178 slučajeva fMS (prevalencija 6,4%). Prevalencija fMS bila je slična među polovima: 6,5% kod žena i 6,2% kod muškaraca. Poređenjem sa sMS slučajevima, pokazano je da su fMS slučajevi bili mlađi ($48,4 \pm 13,9$ naspram $56,9 \pm 14,2$ godina), imali raniji početak bolesti ($30,4 \pm 9,5$ naspram $32,3 \pm 10,1$ godina) i kraće trajanje bolesti ($18,3 \pm 11,9$ naspram $24,6 \pm 12,3$ godina). Takođe, medijana EDSS skora bila je niža kod fMS slučajeva (2,5, opseg 1,0-6,0) u poređenju sa sMS slučajevima (4,0, opseg 2,0-6,5). Intervju je sproveden sa 96 fMS probanda radi dobijanja njihovih punih rodoslovnih stabala. Najviša prevalencija MS među srođnicima osoba sa fMS primećena je kod sestara (27,1%), majki (22,9%) i ćerki (21,7%) fMS probanda, dok je najniža prevalencija nađena kod deda (1,0%). Prevalencija fMS bila je veća kod ženskih srođnika u svim kategorijama u poređenju sa muškim srođnicima. Uporedna analiza fMS slučajeva između generacija nije pokazala statistički značajne razlike u distribuciji polova, indeksu progresije ili fenotipu MS između starije i mlađe generacije. Međutim, mlađa generacija je imala raniji početak simptoma, sa prosečnom starošću od $25,8 \pm 7,2$ godine, u poređenju sa $35,7 \pm 11,6$ godina u starijoj generaciji ($p < 0,001$). Nakon prilagođavanja za različitu dužinu praćenja, razlika u starosti početka simptoma ostala je statistički značajna, ali sa manjom razlikom (početak simptoma sa $30,0 \pm 7,9$ godina za mlađu u poređenju sa $36,4 \pm 11,9$ godina za stariju generaciju, $p = 0,04$).

Navedeno je da je u studiji slučajeva i kontrola sa ciljem ispitivanja faktora rizika za nastanak fMS 393 ispitanika popunilo upitnik (131 fMS, 131 sMS, and 131 HC). Nijedan od faktora povezan za fototip kože nije se izdvojio kao faktor rizika za fMS ili sMS, kao ni izlaganje suncu leti, dok se izlaganje suncu zimi u uzrastu 16-25 godina izdvojilo kao protektivni faktor za nastanak fMS u poređenju sa HC, ali je ova povezanost nestala nakon kontrole za potencijalne konfaundere. Takođe, bavljenje profesionalnim aktivnostima napolju ili podjednako unutra i napolju se pokazalo kao protektivni faktor i za nastanak fMS i sMS u poređenju sa HC, pri čemu su ovi rezultati ostali statistički značajni za uzraste 21-25 i 26-30 i nakon kontrole za potencijalne konfaundere (fMS naspram HC – korigovani OR 0,38, 95% CI 0,18-0,78 za uzrast 21-25, korigovani OR 0,33, 95% CI 0,15-0,69 za uzrast 26-30; sMS naspram HC – korigovani OR 0,47, 95% CI 0,24-0,92 za uzrast 21-25, korigovani OR 0,51, 95% CI 0,26-0,99 za uzrast 26-30). Izlaganje suncu vikendima, UV lampama, kao i korišćenje zaštitnih krema nisu povezani sa rizikom za nastanak fMS niti sMS.

Od faktora vezanih za konzumiranje hrane u uzrastu od 13-19 godina, pokazano je da upotreba morskih plodova predstavlja zaštitni faktor za fMS u poređenju sa sMS (korigovani OR 0,50, 95% CI 0,26-0,95), dok je analiza pokazala da su upotreba sveže ribe (korigovani OR 0,52, 95% CI 0,30-0,90) i pastrmke (korigovani OR 0,57, 95% CI 0,33-0,95) zaštitni faktori za fMS u poređenju sa HC. Konzumiranje pastrmke je takođe pokazana kao zaštitni faktor za sMS u poređenju sa HC (korigovani OR 0,56, 95% CI 0,32-0,99).

Česta upotreba flaširane vode u uzrastu od 13-19 godina pokazala se kao faktor rizika za fMS (korigovani OR 4,95, 95% CI 1,77-13,88) i sMS (korigovani OR 3,40, 95% CI 1,12-10,31) u poređenju sa HC.

Što se tiče praksi dojenja, pokazano je da je ekskluzivno dojenje u trajanju od 7-9 meseci (korigovani OR 0,47, 95% CI 0,28-0,80) i preko 10 meseci (korigovani OR 0,48, 95% CI 0,29-0,81) zaštitni faktor za fMS u poređenju sa sMS. S druge strane, korišćenje kravljeg mleka (korigovani OR 1,97, 95% CI 1,13-3,44) i mleka u prahu (korigovani OR 2,07, 95% CI 1,07-4,02) u ranom detinjstvu povećava rizik od fMS u poređenju sa sMS.

Kada su upoređeni sa HC, pokazano je da pozitivna lična anamneza na infektivnu mononukleozu povećava rizik za fMS (OR 2,69, 95% CI 1,01-7,18) i sMS (OR 3,11, 95% CI 1,18-8,15). Nijedan drugi anamnestički podatak nije pokazao povezanost sa rizikom od fMS ili sMS. Porodična istorija psorijaze bila je povezana sa povećanim rizikom od fMS u poređenju sa HC, ali je ova povezanost nestala nakon korekcije za potencijalne konfaundere.

Veća samoprocenjena telesna figura u uzrastu od 30 godina i broj trudnoća ≥ 2 pokazali su se kao faktori rizika za fMS i sMS u poređenju sa HC, ali su ove povezanosti iščezle nakon korekcije za potencijalne konfaundere.

U mečovanoj retrospektivnoj kohortnoj studiji koja je obuhvatila 262 pacijenta (131 fMS i 131 sMS) nisu pronađeni statistički značajne razlike u bilo kojoj od kliničkih varijabli između fMS i sMS kohorti. Iako je prosečna starost na početku simptoma bila niža u fMS kohorti u poređenju sa sMS, ova razlika nije dostigla statističku značajnost ($29,9 \pm 9,3$ naspram $31,3 \pm 11,0$ godina, $p = 0,548$).

U studiji slučajeva i kontrola koja je ispitivala retke genske varijante kod fMS, identifikovano je 9 retkih varijanti koje su po predikciji patogene u fMS grupi. Među njima, 7 varijanti su bile misens mutacije sa umerenim predviđenim uticajem na funkciju gena, a 2 su bile stop-

gain mutacije, procenjene da imaju visok uticaj na funkciju gena. Nakon FDR korekcije nije pronađeno statistički značajno obogaćenje ovih varijanti u fMS grupi. Međutim, pet retkih varijanti: CLEC16A chr16:11126134_G/A, ALPK2 chr18:58523972_G/T, TYK2 chr19:10378250_C/T, SLC9B1 chr4:102932166_T/C i WWOX chr16:78115103_C/T pronađene su isključivo kod fMS pacijenata.

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Do sada nisu sprovedene studije u Republici Srbiji sa ciljem da ispituju razlike u profilima faktora rizika između fMS i sMS, kao ni koje su ispitivale opterećenje retkim varijantama gena kod osoba sa fMS u našoj populaciji. Takođe, u stranoj literaturi do sada nije opisan pristup razdvajanja faktora rizika za nastanak MS između porodične i sporadične forme bolesti.

Prevalencija fMS od 6,4% pronađena u ovoj studiji u skladu je sa literaturnim podacima, gde je prijavljen širok raspon prevalencije fMS, od 2,2% u Mađarskoj do skoro 33% u *Saskatchewan*-u, Kanada (Fricska-Nagy et al., 2007; Hader i Yee, 2014). Rezultati meta-analize objavljena 2021. godine procenili su globalnu prevalenciju fMS na 11,8% (95% CI: 10,7-13,0%) (Ehtesham, Rafie i Mosallaei, 2021). Ovaj sistematski pregled je našao sličnu prevalenciju među polovima (15,4% kod žena i 13,7% kod muškaraca), što je u skladu sa nalazima ove studije (6,5% kod žena i 6,2% kod muškaraca) (Ehtesham, Rafie i Mosallaei, 2021).

Korišćena je prevalencija MS među srodnicima probanda kako bi se približno procenio rizik za nastanak MS među srodnicima. Najviša prevalencija MS je primećena kod sestara probanda sa fMS (27,1%), zatim kod majki (22,9%) i ćerki (21,7%). Slični nalazi su dobijeni u australijskoj studiji (O'Gorman et al., 2011), gde je najviši sirovi rizik za MS primećen kod sestara probanda (2,88%), zatim kod majki (1,09%), ćerki (0,94%) i braće (0,94%) (O'Gorman et al., 2011). Druga studija izvedena u Velikoj Britaniji takođe je utvrdila da su sestre članovi porodice probanda sa najvišim sirovim rizikom za MS (3,74%), zatim braća (2,65%), majke (2,08%), očevi (1,96%) i ćerke (1,01%) (Robertson et al., 1996).

U studiji slučajeva i kontrola koja je uključivala 131 fMS slučaj, 131 sMS slučaj i 131 HC, istraživani su faktori vezani za fototip kože i izlaganje suncu do 30. godine koji bi mogli uticati na sintezu vitamina D u koži, zbog njegovog uticaja na rizik nastanka MS. To su: boja kože, očiju i kose, reakcija na tamnjenje, količina aktivnosti na otvorenom tokom zime, leta i

vikenda, mesto obavljanja profesionalnih aktivnosti (u zatvorenom naspram na otvorenom), izlaganje UV lampama i učestalost korišćenja krema za sunčanje. Nije pronađena povezanost između bilo kog od ovih faktora i rizika od fMS u poređenju sa sMS. S druge strane, obavljanje profesionalnih aktivnosti na otvorenom ili podjednako u zatvorenom i na otvorenom bilo je povezano sa smanjenim rizikom od MS u poređenju sa obavljanjem profesionalnih aktivnosti uglavnom u zatvorenom. Ovo je bio slučaj i pri poređenju fMS sa HC, i sMS sa HC. Ovi nalazi se mogu posmatrati u kontekstu da Srbija pokriva relativno malu geografsku oblast, sa većinom učesnika studije koji su najveći deo života proveli u državi. Stoga, utvrđeni efekat geografske širine na sintezu vitamina D i naknadni rizik od MS ne bi trebao biti toliko izražen u ovom okruženju (Simpson et al., 2019).

Što se tiče hrane bogate vitaminom D, utvrđeno je da konzumiranje morskih plodova u tinejdžerskim godinama smanjuje rizik od fMS u poređenju sa sMS (korigovani OR 0,50, 0,26-0,95), dok je konzumacija sveže ribe pokazala da je zaštitni faktor za fMS u poređenju sa HC, a konzumacija pastrmke bila je povezana sa smanjenim rizikom od fMS i sMS u poređenju sa HC. Upotreba ribljeg ulja u uzrastu od 13-19 godina pokazala se kao zaštitni faktor za sMS u poređenju sa HC, ali ne i za fMS. Nalazi o konzumiranju sveže ribe, morskih plodova i ribljeg ulja povezani sa smanjenjem rizika od MS primećeni su u nekoliko studija (Abdollahpour et al., 2021; Bäärnhielm, Olsson i Alfredsson, 2014; Black et al., 2020; Cortese et al., 2015; Hoare et al., 2016; Langer-Gould et al., 2020). Nalaz o konzumiranju morskih plodova u tinejdžerskim godinama koji doprinosi smanjenju rizika od fMS u poređenju sa sMS, iako intrigantan, treba tumačiti sa oprezom, jer je broj učesnika koji su konzumirali morske plodove u bilo kojoj grupi bio nizak, budući da je konzumiranje morskih plodova neuobičajeno u Srbiji, kao kontinentalnoj zemlji.

Interesantno je da je često korišćenje flaširane vode u uzrastu od 13-19 godina povezano sa povećanim rizikom od fMS i sMS u poređenju sa HC. Koliko je poznato, nijedna studija do sada nije prijavila ovu povezanost. Što se tiče drugih neuroloških bolesti, aluminijum koji se može naći u flaširanoj vodi povezan je sa povećanim rizikom od demencije (Rondeau et al., 2008). Ova povezanost je intrigantan nalaz, koji zahteva dalja istraživanja u drugim populacijama.

Možda najznačajniji nalaz ove studije je da ekskluzivno dojenje duže od 6 meseci u detinjstvu smanjuje rizik od fMS u odraslom dobu u poređenju sa sMS. Vodeće organizacije poput Svetske zdravstvene organizacije i UNICEF-a preporučuju ekskluzivno dojenje tokom prvih 6

meseći života (Svetska zdravstvena organizacija, 2021). Implikacija ovog nalaza je da bi moglo biti korisno za majke dece sa opterećenjem MS u porodici da produže ovaj period, jer je utvrđeno da isključivo dojenje 7-9 meseci i duže od 10 meseci predstavljaju zaštitne faktore za fMS u poređenju sa sMS.

Pokazano je da dojenje smanjuje rizik od različitih autoimunih bolesti (Diamanti, Capriati i Bizzarri, 2016; Patelarou et al., 2012; Vieira Borba, Sharif i Shoenfeld, 2017). Ovo važi i za MS (Alkhawajah et al., 2021; Brenton et al., 2017; Conradi et al., 2013; Hedström et al., 2020a; Holz et al., 2022). Međutim, ova studija je prva koja istražuje ovu povezanost kod fMS kao entiteta odvojenog od sporadičnih slučajeva (Jovanović et al., 2024). Autori multicentrične studije koristeći isti upitnik primetili su da dojenje u trajanju od 4 meseca i duže ima zaštitni efekat na rizik od MS (Ragnedda et al., 2015). Primetno je da ovaj efekat izgleda da je specifičan za populaciju, kao i za pol, pri čemu je povoljan efekat primećen među učesnicima iz Italije, ali ne i iz Norveške, kao i da je efekat prisutan samo kod muške populacije (Ragnedda et al., 2015). Nalazi ove studije koja razdvaja fMS od sMS takođe su našli povezanost samo kod muške populacije (Jovanović et al., 2024). Predloženo je nekoliko mehanizama zaštitnog efekta dojenja na razvoj MS. Oni uključuju njegove komponente interleukin 10, imunoglobuline, humane mlečne oligosaharide, koji imaju imunomodulatorna svojstva i povoljan efekat na crevnu mikrobiotu (Atarashi i Honda, 2011; Fernandez et al., 2013; Prioult, Pecquet i Fliss, 2004).

Iako je utvrđena ranija starost na početku simptoma među fMS u poređenju sa sMS u mečovanoj retrospektivnoj kohortnoj studiji ($29,9 \pm 9,3$ naspram $31,3 \pm 11,0$ godina), ova povezanost nije bila statistički značajna ($p=0,548$). To je verovatno zbog nedovoljne moći studije, imajući u vidu da nalazi iz studije prevalencije sprovedene na bazi populacionog registra ukazuju na raniju starost početka simptoma u grupi fMS u poređenju sa sMS. Učesnici u retrospektivnoj kohortnoj studiji su bili mečovani u odnosu na fenotip MS, sa 90% relapsirajuće MS i 10% PPMS. Uzrast u trenutku dijagnoze ($33,7 \pm 10,2$ kod fMS naspram $35,1 \pm 11,5$ godina kod sMS) takođe je bio niži kod fMS, ali bez statističke značajnosti, dok su kašnjenje u dijagnozi ($3,7 \pm 5,7$ kod fMS naspram $3,8 \pm 6,0$ godina kod sMS) i trajanje bolesti bili gotovo identični u dve kohorte ($10,4 \pm 8,9$ kod fMS naspram $10,5 \pm 9,6$ godina kod sMS). Takođe nije bilo značajne razlike u progresiji bolesti između fMS i sMS kohorti mereno MSSS ili indeksom progresije. Iako mečovanje prema fenotipu bolesti ima svoje prednosti u smislu eliminisanja uticaja ovog faktora na prognozu, nedostatak je što nije moguće testirati

efekat razlike u porodičnom i sporadičnom pojavljivanju MS na pojavu fenotipa bolesti. Veća studija sprovedena samo u porodicama sa prvim stepenom srodstva sa MS pokazala je da porodično javljanje MS povećava rizik od progresivnog toka bolesti (Hensiek et al., 2007). Međutim, u ovoj studiji nije pronađena razlika u prognozi (Hensiek et al., 2007). Slično tome, druga studija je pronašla povećanu stopu progresije kod fMS u poređenju sa sMS i nešto raniji početak bolesti, što je bilo statistički značajno zbog veličine uzorka (29,01 kod fMS prema 29,44 godina kod sMS, $p=0,049$) (Wellek et al., 2011). S druge strane, studija sprovedena u Španiji nije pronašla razliku u starosti početka bolesti između fMS i sMS (Regal et al., 2018). Zbog prirode MS, utvrđivanje tačnog uzrasta na početku bolesti ponekad može biti teško, jer svi pacijenti ne traže medicinsku pomoć nakon prvog napada bolesti, u zavisnosti od njegove težine i simptomatologije. Budući da svest o porodičnom riziku kod drugog i sledećih slučajeva MS u porodicama dovodi do ranije dijagnoze, korišćenje uzrasta u trenutku dijagnoze nije adekvatno rešenje. Potrebni su sofisticiraniji naponi kako bi se dalje razjasnio specifični klinički profil fMS.

Devet retkih ili neobičnih genskih varijanti predviđenih kao patogene sa CADD skorom većim od 20 pronađeno je u ovoj studiji. Od tih devet, pet retkih varijanti (sve sa gnomADe frekvencijom alela <1%): CLEC16A chr16:11126134_G/A, ALPK2 chr18:58523972_G/T, TYK2 chr19:10378250_C/T, SLC9B1 chr4:102932166_T/C, i WWOX chr16:78115103_C/T, pronađeno je isključivo kod fMS pacijenata. Neke od ovih varijanti su prethodno povezane sa MS, dok su neke novi nalazi u ovoj studiji. Nedavne GWAS studije identifikovale su 32 genske varijante u HLA regionu i dodatnih 201 varijanti van HLA regiona koje su povezane sa MS (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2019). Ovi nalazi obuhvataju oko 48% genske predispozicije za MS, što sugeriše da je značajan deo genske podložnosti rezultat neobičnih i retkih varijanti (MAF između 1-5% i manje od 1%, respektivno). Značajno opterećenje retkih varijanti rizika primećeno je kod pacijenata sa fMS u poređenju sa sMS (Everest et al., 2022).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Jovanovic, A., Pekmezovic, T., Mesaros, S., Novakovic, I., Peterlin, B., Veselinovic, N., Tamas, O., Ivanovic, J., Maric, G., Andabaka, M., Momcilovic, N., Drulovic, J. Exclusive breastfeeding may be a protective factor in individuals with familial multiple sclerosis. A population registry-based case-control study. *Multiple Scler Relat Dis*, 2024;82:105392. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.105392> **M22, IF 4.0**

2. Jovanovic, A., Pekmezovic, T., Mesaros, S., Novakovic, I., Peterlin, B., Veselinovic, N., Tamas, O., Ivanovic, J., Maric, G., Andabaka, M., Momcilovic, N., & Drulovic, J.). Earlier age of symptom onset in younger generation of familial cases of multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2024, doi: 10.1007/s10072-024-07512-w. **M22, IF 3.3**

3. Jovanovic, A., Pekmezovic, T., Mesaros, S., Novakovic, I. Significance of interactions between genetic and environmental factors in etiology of multiple sclerosis. *Medicinski podmladak*, 2025;76:3. doi: 10.5937/mp76-46939 **M53**

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Investigation of the prevalence, epidemiological and clinical characteristics of familial occurrence of multiple sclerosis in the population of Belgrade“ dr Alekse Jovanovića, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju prevalencije fMS, faktora rizika za njen nastanak, kao i opterećenja retkim genskim varijantama među ovim pacijentima.

Ova studija je imala za cilj da proceni različite epidemiološke, kliničke i genetske aspekte fMS-a. Utvrđeno je da je prevalencija fMS u beogradskom regionu 6,4%, a slična je bila i kod muškaraca i kod žena. Sestre su bile srodnici pacijenata sa fMS sa najvišom prevalencijom MS, zatim majke i ćerke, dok je najmanja prevalencija utvrđena kod deda. Prevalencija fMS bila je veća kod ženskih srodnika u okviru svih kategorija srodnika u poređenju sa muškim.

Prilikom procenjivanja profila faktora rizika pacijenata sa fMS u poređenju sa sMS, pokazano je da upotreba kravljeg mleka i mleka u prahu u detinjstvu povećava rizik za fMS u poređenju sa sMS. S druge strane, ekskluzivno dojenje se izdvojilo kao protektivni faktor za fMS u poređenju sa sMS, kao i konzumiranje morskih plodova u tinejdžerskim godinama.

U poređenju sa HC, rizik za fMS je povećan u slučaju pozitivne istorije mononukleoze, kao i kod osoba koje su koristile flaširanu vodu kao primarni izvor vode u uzrastu 13-19 godina. Sa druge strane, obavljanje profesionalnih delatnosti na otvorenom u uzrastu 21-30 godina, konzumiranje sveže ribe i pastrmke su izdvojeni kao protektivni faktori za nastanak fMS u poređenju sa HC.

Koristeći sekvenciranje celog egzoma, pronađeno je 9 retkih varijanti gena koje su po predikciji patogene među pacijentima sa fMS. Dve od njih su bile stop-gain mutacije sa predviđenim visokim uticajem na funkciju gena, dok su 7 varijanti bile misense mutacije sa

umerenim predviđenim uticajem na funkciju gena. Iako analiza nije pokazala statistički značajno obogaćenje ovih varijanti u fMS grupi nakon FDR korekcije, otkriveno je da je pet retkih varijanti prisutno isključivo kod pacijenata sa fMS a ne i u kontrolnoj grupi.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Alekse Jovanovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 06. 06. 2024.

Članovi Komisije:

Prof. dr Jelena Drulović

Doc. dr Gorica Marić

Prof. dr Borut Peterlin

Mentor:

Prof. dr Tatjana Pekmezović

Komentori:

Prof. dr Šarlota Mesaroš

Prof. dr Ivana Novaković