

UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Dejan Savić

**ZNAČAJ NIVOVA VITAMINA D I POLIMORFIZAMA
GENA POVEZANIH SA NJEGOVIM DELOVANJEM
KOD OBOLELIH OD MULTIPLE SKLEROZE**

-doktorska disertacija-

Niš, 2013

UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Dejan Savić

**ZNAČAJ NIVOVA VITAMINA D I POLIMORFIZAMA
GENA POVEZANIH SA NJEGOVIM DELOVANJEM
KOD OBOLELIH OD MULTIPLE SKLEROZE**

-doktorska disertacija-

Mentor: Prof. dr Slobodan Vojinović

Niš, 2013

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

Prof.dr Zoran Perić, predsednik

Prof.dr Slobodan Vojinović, mentor i član

Prof.dr Evica Dinčić, član

Datum odbrane: _____

Skraćenice:

MS – multipla skleroza

RRMS – relapsno remitentna forma multiple skleroze

SPMS – sekundarno progresivna forma multiple skleroze

PPMS – primarno progresivna forma multiple skleroze

PRMS – progresivno remitentna forma multiple skleroze

CIS – klinički izolovani sindrom

CNS – centralni nervni sistem

EAE – eksperimentalni (autoimuni) alergijski encefalomijelitis

MBP - mijelin bazični protein

MOG - mijelin oligodendrocitni protein

PLP - proteolipidni protein

WHO – eng. World Health Organisation (Svetska zdravstvena organizacija)

UVB – ultraljubičasto zračenje B spektra

IL – interleukin

APC – antigen prezentujuća ćelija

SNP – eng. single nucleotide polymorphism (pojedinačni nukleotidni polimorfizam)

GWAS – eng. genome wide association studies (studije asocijacije celokupnog genoma)

VDR – vitamin D receptor

CYP – citohrom P450

VDB (GC) – vitamin D vezujući protein, GC protein

HLA – humani leukocitarni antigen

SADRŽAJ

UVOD	1
KLINIČKE, PATOLOŠKE I IMUNOLOŠKE KARAKTERISTIKE MULTIPLE SKLEROZE.	2
DIJAGNOSTIKA MULTIPLE SKLEROZE.....	8
GENETIKA MULTIPLE SKLEROZE.....	11
VITAMIN D HORMON.....	13
Vitamin D hidroksilaze	
Kalcidiol – 25(OH)D	
Vitamin D vezujući protein – VDB, GC protein	
Vitamin D receptor - VDR	
SUFICIJENTNOST VITAMINA D.....	17
GEOEPIDEMIOLOGIJA MULTIPLE SKLEROZE.....	21
GENETIKA VITAMINA D.....	22
VITAMIN D I IMUNI SISTEM.....	23
Indukcija tolerogenih svojstava u mijeloidnim dendritičnim ćelijama	
Modulacija efektorne limfocitne funkcije	
Pojačanje regulatorne t ćelijske funkcije	
Vitamin D i EAE	
VITAMIN D HORMON U MULTIPLOJ SKLEROZI.....	26
CILJEVI.....	28
HIPOTEZE.....	29
MATERIJAL I METODE.....	30
REZULTATI.....	36
DISKUSIJA.....	45
ZAKLJUČAK.....	54
LITERATURA.....	55

UVOD

Multipla skleroza (MS) predstavlja hronično inflamatorno oboljenje centralnog nervnog sistema (CNS) sa autoimunim i neurodegenerativnim karakteristikama (1). Iako je MS oboljenje od koga prema nekim procenama boluje oko 2,5 miliona ljudi širom sveta i koje predstavlja glavni neurološki uzrok onesposobljenosti kod mladih i osoba srednjih godina (2), ostaje primer bolesti čiji su precizni uzroci, mehanizmi i ciljevi imunološkog oštećenja krajnje nejasni, dok samo oboljenje pokazuje visok stepen kliničke heterogenosti među pacijentima (3). Prema današnjim shvatanjima, multipla skleroza pripada kompleksnim bolestima, grupi oboljenja okarakterisanih blagim rizikom nasledjivanja i višestranim interakcijama gen-okruženje (4). Kompleksne bolesti su: multifaktorijalne (u njihov nastanak su uključeni i genetski faktori i faktori okruženja); poligenetske (uključeno je više gena), okarakterisane su redukovanom penetrantnošću (dati genotip ne uzrokuje uvek bolest); genetski su heterogene (bolest se može razviti zahvaljujući različitim genima i/ili alelima) (5).

Tačan uzrok nastanka multiple skleroze nije poznat ali se danas smatra da je to imunski posredovana bolest sa karakteristikama autoimunog oboljenja koje se javlja kod genetski predisponiranih osoba nakon izlaganja do sada još nedefinisanim faktorima okruženja (6).

Genetska predispozicija označava da je određeni genetski marker češći kod obolelih ali nije neohodan niti dovoljan da se bolest ispolji. Genetski marker je genetski lokus čiji genotip znamo sa velikom sigurnošću. Genetički lokus predstavlja određenu lokaciju na hromozomu koju čini jedan bazni par ili niz baznih parova. Na svakom lokusu može postojati jedan ili više alternativnih oblika gena ili DNK sekvence. Jedan od tih alternativnih oblika na određenom genetičkom lokusu naziva se alel. Na svakom autozomalnom lokusu jedinka poseduje dva alela, jedan nasleđen od majke drugi od oca. Par alela na jednom genetičkom lokusu čini genotip (7).

Uprkos razvoju senzitivnih detekcionih tehnika ni za jedan pojedinačni agens (virus, bakterija, toksin) nije potvrđena uloga kauzalnog agensa u nastanku MS. Očekivanje da će pojedinačni agens imati dovoljnu specifičnost i univerzalnost da bi se na njega računalo u svim slučajevima MS je nerealističan (4). Ipak postoje jaki dokazi za podršku patogene uloge Epstein Barr virusa (9) i nivoa vitamina D (10) u MS. Imunomodulatorna svojstva vitamina D demonstrirana su u mnogobrojnim in vitro istraživanjima: njegova aktivna forma inhibira diferencijaciju monocita u dendritične ćelije i suprimira sekreciju IL12 kao i ekspresiju kostimulatornih molekula; dovodi do povećanja antiinflamatornog profila CD4+ T ćelija;

inhibira B ćelijsku proliferaciju, plazma diferencijaciju i produkciju imunoglobulina. U animalnim studijama prevenira i poboljšava pojavu eksperimentalnog alergijskog encefalomijelitis (EAE), koji je glavni animalni model MS. Postoje brojne epidemiološke studije geografske širine, prethodnog izlaganja suncu i serumskog nivoa vitamina D koje su pokazale uticaj na rizik oboljevanja od MS. Klinički većina pacijenata ima niske nivoe vitamina D i u stanju su insuficijencije ili čak deficijencije u poredjenju sa internacionalnim normama ustanovljenim na metaboličkoj osnovi uz prve obećavajuće rezultate faza I/II studija sa upotrebom suplemenata vitamina D u MS (11).

KLINIČKE, PATOLOŠKE I IMUNOLOŠKE KARAKTERISTIKE MULTIPLE SKLEROZE

MS predstavlja heterogeno oboljenje u pogledu svoje patološke, imunopatogenetske, kliničke, genetske i radiološke prezentacije. Osnovne patološke karakteristike oboljenja su lezije unutar CNS-a sastavljene od fokalne demijelinizacije, inflamacije, formiranja ožiljnog tkiva i različitog aksonalnog oštećenja. Demijelinizacije MS lezije označene su terminom MS plakovi. Plak MS je jasno demarkirana, siva ili ružičasta lezija, koja se histološki karakteriše inflamacijom, demijelinizacijom i gliozom, i relativnom očuvanošću aksona. Plakovi su multipli, generalno asimetrični, i mogu se javiti bilo gde unutar bele mase. Veličina plakova se kreće od delova mm do nakoliko cm, a prosečna je nekoliko mm. Iako su lezije obično okrugle ili ovalne, često se pružaju u vidu prsta duž krvnih sudova male ili srednje veličine uglavnom endotelijalnih venula (Dawson-ovi prsti) pa se smatra da inflamatorne ćelije (limfociti, makrofazi i plazma ćelije) infiltrišu CNS preko ovog tipa krvnih sudova. Ove lezije su razbacane po CNS-u sa predilekcijom za periventrikularnu belu masu, optičke nerve, moždano stablo, kičmenu moždinu, cerebelum, moždano stablo i corpus callosum.

Plakovi MS mogu biti aktivni ili neaktivni. Postoji više metoda za određivanje aktivnosti plaka, ali je najpouzdanija prisutvo u makrofagima specifičnih degradacionih produkata mijelina (reaktivnih za mijelin bazični protein-MBP, mijelin oligodendrocitni glikoprotein-MOG, proteolipidni protein-PLP). Aktivne lezije, u kojima se odvija demijelinizacija, su hipercelularne, i sadrže infiltrate autoreaktivnih T ćelija, antigen-nespecifične monocite i makrofage koji sadrže mijelinski debris kao odraz dezintegracije mijelinskih omotača. Makrofagi i limfociti formiraju perivaskularne manžetne i šire se u parenhim, dok su plazma ćelije i B ćelije, kojih ima u

manjem broju, uglavnom koncentrisane u perivaskularnom regionu. Unutar plaka većinu limfocita čine T ćelije, uključujući i CD4+ t helper limfociti i CD8 + citotoksični t limfociti. Infiltracija limfocitima i makrofagima je posebno izražena u perifernim delovima plaka, prema ivici, gde je proces demijelinizacije najaktivniji. U mijelinizovanoj beloju masi oko ivice plakova nalaze se limfociti, makrofagi i hipertrofisani astrociti. U perivaskularnim infiltratima ćelije se nagomilavaju između zida krvnog suda i perivaskularne gliste koju čine astrociti. Lezije se šire duž toka malih vena i venula i po periferiji aktivnih plakova.

Glavni klinički fenomeni su relapsi i progresija oboljenja. Relapsi se smatraju kliničkom ekspresijom akutne fokalne ili multifokalne demijelinizacije diseminovane u CNS-u, dok progresija odražava prisustvo hronične demijelinizacije, gubitka aksona i glioze (12). Aktivne lezije se javljaju kao posledica inflamatornog procesa i sastavljene su uglavnom od T limfocita i makrofaga. Uprkos sličnosti u inflamatornoj reakciji, patološka heterogenost MS lezija ogleda se u postojanju četiri glavna patološka uzorka:

- I. Demijelinizacija posredovana makrofagima
- II. Demijelinizacija antitelo/komplement posredovana
- III. Distalna (eng. dying –back) oligodendrogliopatija
- IV. Primarna degeneracija oligodendrocita

Prva dva tipa demijelinizacije imaju više zajedničkih karakteristika. Aktivna demijelinizacija je udružena sa inflamacijom u kojoj dominiraju T limfociti i makrofagi. Glavna razlika između I i II tipa lezija se sastoji u tome da je značajno nagomilavanje imunoglobulina (uglavnom IgG) i komplement C9neo antigena na mestima aktivne destrukcije mijelina, nađeno samo u II tipu lezija. Sa druge strane, difuzna reaktivnost na imunoglobulinima u tkivu i citoplazmi astrocita je nađena u lezijama nezavisno od tipa demijelinizacije, a što je posledica oštećenja hematoencefalne barijere. Ipak se tip II lezija razlikuje od ostalih tipova izraženom i naglašenom imunoglobulinskom reaktivnošću, koja je udružena sa degeneracijom mijelina na ivici aktivnog plaka i značajnom imunoglobulinskom reaktivnošću degradacionih produkata mijelina unutar makrofaga. Imunoreaktivnost na C9neo antigen ne pokazuje difuznost, već je specifično udružena sa degeneracijom mijelina i njegovim degradacionim produktima. U oba tipa lezija, plakovi su centralno postavljeni oko malih vena i venula, jasno demarkiranih ivica, sa perivenskim širenjem. Ekspresija svih mijelinskih proteina (MBP, PLP, MOG, MAG) je

redukovana podjednako stepena. Postoji i promenljiv gubitak oligodendrocita na ivici aktivnog plaka, dok se u inaktivnom centru plaka ponovo pojavljuje veliki broj oligodendrocita (Storch et al, 1998a), što ima za posledicu povećanu incidencu “shadow” plakova. Ovi plakovi su cirkumskriptni regioni sa uniformno tankim mijelinskim ovojnica, i mogu se javiti osim unutar akutnog plaka, i na ivici hroničnog. Prvi tip lezija je značajno podseća na destrukciju mijelina koja se viđa kod mišjeg modela autoimunog encefalomijelitisa. Lezije slične drugom tipu su nađene u modelu eksperimentalnog alergijskog encefalimijelitisa (EAE) koji je indukovano senzibilizacijom sa MOG, u kome je demijelinizacija indukovana zajedničkim delovanjem encefalitogenih T-limfocita, koji su odgovorni za inflamaciju, i demijelinizirajućih anti-MOG antitela.

U trećem tipu, lezije takođe sadrže inflamatorne infiltrate, uglavnom sastavljene od T limfocita, makrofaga i aktivirane mikroglije, ali nema depozicije imunoglobulina i komplementa. Sledeća razlika se ogleda u tome da demijelinizacija nije centralno postavljena oko vena i venula. Umesto toga često se viđa rubna očuvanost mijelina oko inflamiranih krvnih sudova unutar demijelinizovanog plaka. Ivice lezije su slabo definisane, pokazujući difuzno širenje u okolnu belu masu. Karakterističan nalaz za ovaj tip je selektivni gubitak glikoproteina udruženog sa mijelinom (MAG), dok su ostali mijelinski proteini (MBP, PLP) i dalje prisutni u delimično oštećenim mijelinskim ovojnica. Gubitak MAG je udružen sa promenama u periaksionalnoj MAG imunoreaktivnosti. Izražen gubitak oligodendrocita na ivici aktivnog plaka, karakterističan za ovaj tip lezija, se ponekad širi u susednu naizgled normalnu belu masu. U inaktivnom centru skoro da uopšte nema oligodendrocita, dok su remijelinizovani “shadow” plakovi odsutni. Ovakav tip lezija se obično nalazi u toksičnim i virusnim eksperimentalnim modelima demijelinizacije, u virusom indukovanim humanim oboljenjima bele mase, ali i u zoni penumbre kod infarkta bele mase.

Inflamatorni infiltrati u IV tipu lezija, su uglavnom sastavljeni od T limfocita i makrofaga, dok je nagomilavanje imunoglobulina i komplementa odsutno. Nema ni selektivnog gubitka MAG. Demijelinizacija je udružena sa smrću oligodendrocita u uskim zonama bele mase oko plaka, koja se naslanja na zonu aktivne destrukcije mijelina. Oligodendrociti pokazuju fragmentaciju DNA, ali nemaju morfološke karakteristike apoptoze. Plakovi demijelinizacije su jasno demarkirani sa radijalnim širenjem lezija. Skoro potpuni gubitak oligodendrocita u

aktivnim i neaktivnim područjima lezija je udružen sa odsustvom remijelinizovanih “shadow” plakova. Mehanizam odgovoran za nastanak ovog tipa lezija, koji je najređi u MS populaciji, i javlja se u podgrupi sa primarno-progresivnom bolesti, je nejasan.

Znaci i simptomi MS posledica su neuropatoloških promena koje se odigravaju u CNS-u. Primarni mehanizam oštećenja su inflamatorna demijelinizacija koja rezultira usporavanjem sprovođenja ili potpunim prekidom transmisije i aksonalno oštećenje koje uvek rezultira prekidom provodjenja impulsa. Iako se kao prezentacija MS mogu ispoljiti skoro svi neurološki simptomi i znaci, kliničke karakteristike su uglavnom refleksija oštećenja puteva bele mase i najčešće su predstavljeni: optičkim neuritisom, slabošću, gubitkom senzibiliteta, ataksijom, nistagmusom, sfinkterijalnom disfunkcijom i kognitivnim oštećenjima, mada je lista kliničkih prezentacija znatno duža (13).

Klinička heterogenost MS ogleda se i u postojanju barem tri kliničke forme bolesti – relapsno remitentne (RRMS), primarno progresivne (PPMS) i sekundarno progresivne (SPMS) mada pojedini autori izdvajaju i formu progresivno remitentne MS (PRMS). Najčešće ispoljavanje MS je RRMS forma (kod oko 80% pacijenata) koju karakteriše nagla pojava novih ili pogoršanje postojećih neuroloških ispada, trajanja duže od 24 sata, koji se označavaju kao relaps, kojem u ranim fazama bolesti sledi najčešće potpuni oporavak – remisija. Kod većine bolesnika sa inicijalno RRMS ovu formu zamenjuje SPMS koja je okarakterisana progresivnom akumulacijom neurološkog deficita. U oko 10-15% pacijenata bolest od početka pokazuje progresivnu akumulaciju neurološkog deficita (PPMS). Kako se relapsi mogu javljati i na terenu SPMS i PPMS uvedena je i kategorija PRMS.

Iako se MS smatra autoimunim oboljenjem, definisanje pojedinačnih antigena koji diktiraju autoreaktivni imuni odgovor kod MS pacijenata i danas predstavlja problem u razumevanju imunopatogeneze bolesti. Intenzivno je ispitivana T ćelijska reaktivnost na antigene mijelina kao što su mijelin bazični protein (MBP), mijelin oligodendrocitni protein (MOG) ali i oligodendroglijalno specifičnom enzimu transaldolazi i heat shock proteinu α B kristalinu (14,15,16,17,18,19,20,21). Ipak, generalni konsenzus je da ne postoji jedan već više patoloških antigena uključenih u bolest. Osim toga, iako inicijalna autoreaktivnost može biti specifična za određeni antigen, proces širenja epitopa može dovesti do stvaranja multiplih epitopa ciljnih antigena i čak dodatnih antigena (22). Kako je prisustvo autoreaktivnih T ćelija opisano i kod zdravih kontrola i kod obolelih od MS (23), i ove naivne autoreaktivne ćelije mogu ući u

inflamirani CNS gde mogu da budu aktivisane od strane lokalnih antigen prezentujućih ćelija kako bi dalje učestvovala u sekundarnoj antigen specifičnoj inflamaciji.

Okidanje imunološki posredovanog tkivnog oštećenja može se razmatrati u kontekstu pojednostavljenog modela sastavljenog od: 1. imunog sistema (uključujući timus, kosnu srž, slezinu, limfne noduse i krv); 2. ciljnog organa i 3. barijere koja ih odvaja (u slučaju MS imuni sistem je odvojen od CNS-a krvno-moždanom barijerom). U ovom modelu, ključni događaj u okidanju MS relapsa je aktivacija van ciljnog organa T ćelija koje mogu prepoznati antigene u CNS-u. U daljem toku, ove aktivisane imune ćelije podležu adheziji na endotelnoj barijeri, vrše aktivnu invaziju u ciljni organ gde mogu biti reaktivirane i zatim učestvuju u procesu bolesti. Ovaj model kojim se okidanje autoreaktivnog imunog odgovora na periferiji može prevesti u atak inflamatorne CNS bolesti koristi se kao osnova za EAE model MS u kojem periferna imunizacija sa mijelinskim komponentama (mijelin bazični protein-MBP, mijelin oligodendrocitni glikoprotein-MOG i proteolipidni protein-PLP) indukuje inflamatornu CNS demijelinizaciju. Analogno EAE, inicijacija MS (ili barem MS relapsa) verovatno je okinuta perifernom aktivacijom autoagresivnim CNS usmerenim T ćelijama.

U sklopu normalnog imunog odgovora, T ćelije se mogu diferencirati u podgrupe koje se razlikuju na bazi profila citokina koje sekretuju. U takve podgrupe spadaju Th1 T ćelije koje su deo antivirusnog imunog odgovora (i uglavnom proizvode i sekretuju IFN gama, TNF alfa i IL 2) i Th2 ćelije koje su deo odbrane organizma od parazita (sa produkcijom IL 4, IL 5, IL 9, IL 10 i IL 13). Kada je normalan balans između Th1 i Th2 odgovora narušen, može doći do ispoljavanja bolesti. U EAE modelu, transfer autoreaktivnih Th1 T ćelija tipično indukuje nastanak bolesti, dok to nije slučaj sa Th2 ćelijama. Na bazi ove observacije, pretpostavljeno je da u MS CNS usmereni Th1 odgovor može biti proinflamatoran i da uzrokuje oštećenje, dok je Th2 odgovor antiinflamatoran i protektivan. Najdirektnija potvrda u prilog pretpostavci da periferna aktivacija CNS autoreaktivnih T ćelija može imati uticaja na proces MS oboljenja je nadjena praćenjem pacijenata tretiranih izmenjenim peptidnim ligandom (altered peptide ligand – APL) mijelin bazičnog proteina. Studije EAE nalaze da administracija APL encefalitogeničnog epitopa MBP vodi u podizanje Th2 odgovora u MBP reaktivnosti i poboljšava klinički ishod.

Raniji koncept po kome je IL 12, kao deo ključne kaskade aktivacije Th1 imunog odgovora, najodgovorniji za narušavanje balansa Th1/Th2 odgovora u pravcu proinflamatornog Th1, poslednjih godina je potisnut u drugi plan otkrićem uloge IL 17 produkujuićih ćelija. IL 23

kao ključni signal u aktivaciji IL 17 produkcijskih ćelija i efekti IL 23/IL 17 smatraju se značajnijim proinflamatornim odgovorom od IL 12/ Th1 ose (24). Ove autoantigen specifične T ćelije koje proizvode IL 17 svrstane su u posebnu grupu tzv. Th17 imunog odgovora. Genetska deficijencija u IL 17 ili njihova farmakološka neutralizacija vodi u umanjenje kliničkih simptoma na animalnim modelima ali ne i kompletan prestanak.

Senzitizacija T ćelija u pacijenata koji imaju MS može se desiti u CNS-u ili u drenirajućim limfnim nodusima. Podrška prve pretpostavke je u činjenici da se limfociti kreću u CNS i u fiziološkim uslovima, i da perivaskularna i parenhimalna mikroglia ima kapacitet da se ponaša kao kompetentne antigen prezentujuće ćelije. Druga mogućnost je da CNS autoreaktivne ćelije nose fragmente CNS sopstvenih antigena koje se oslobađaju ili nose od strane antigen prezentujućih ćelija (APC) u cervikalne limfne noduse za koje se zna da su drenažni limfni nodusi iz mozga/CNS-a. T ćelije reaktivne na CNS mogu također postati aktivisane na periferiji kada nose fragmente stranih antigena koji su dovoljno slični sopstvenim da aktiviraju sopstveno reaktivne ćelije (molekularna mimikrija). U prilog ovome ide i observacija da neke humane MBP reaktivne T ćelije mogu biti aktivisane epitopima poreklom od uobičajenih virusa kao što su herpes simpleks, Epstein-Barr ili influenza, kada su prezentovani istim HLA molekulima.

Krvno moždana barijera predstavlja fizičku i metaboličku barijeru koja izoluje CNS od sistemske cirkulacije stvarajući unikatno i stabilno okruženje za optimalnu neuronalnu aktivnost. Morfološku osnovu krvno moždane barijere čine endotelne ćelije sa njihovim međusobnim tesnim spojevima uz učesće i različitih perivaskularnih ćelija kao što su glatko mišićne ćelije, periciti, mikroglialne ćelije i astrociti. Ćelijska migracija kroz krvno moždanu barijeru u CNS uključuje degradaciju subendotelne bazalne membrane. Ovaj je proces posredovan familijom matriks metalo proteaza. Kada jednom dospeju u CNS kompartman imune ćelije mogu biti reaktivirane. Ovo se može ostvariti kroz antigenu prezentaciju prisutnom mikroglijom ili invadiranim monocitno/makrofagnim ili dendritičnim ćelijama. Razlozi reaktivacije mogu biti lokalni inflamatorni milje koji aktivira APC čak i u odsustvu njihovog antigena. Lokalno oštećenje rezultira u izlaganju dodatnih mijelinskih komponenti koje mogu postati primarni ciljevi posleđičnih talasa infiltrišućih ćelija, vodeći u širenje epitopa i moguće utičući na kliničke relapse.

MS se smatra T-ćelijski posredovanom autoimunom bolešću CNS (24). Međutim patofiziologija MS je sigurno kompleksnija od pojednostavljene slike CD4+ Th1 T ćelijski

posredovane bolesti koja nastaje usled aktivacije pojedinačnog antigena kako je sugerisano studijama eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (EAE) (25). Istraživanje uloge B ćelija u patogenezi MS podstaklo je rastuće uvažavanje neuspeha da T ćelijski dominantan animalni model CNS demijelinizacije bude puni reprezent humane bolesti i njenog odgovora na tretman (26). Učešće B ćelija u imunopatogenezi MS obično se posmatra kroz aktivaciju CNS autoreaktivnih B ćelija koje stvaraju CNS usmerena autoantitela. Često prisutno povećanje nivoa likvornih imunoglobulina u MS i uobičajena manifestacija oligoklonalnih traka likvora ide u prilog tome.

Heterogenost MS ogleda se i u njenoj radiološkoj prezentaciji. Najsenzitivnija neuroradiološka metoda za dijagnostiku MS je magnetna rezonanca (MR). MR kod pacijenata sa MS otkriva prisustvo hiperintenznih zona na T2 sekvenci i proton density sekvenci sa predilekcijom u periventrikularnoj beloj masi, korpus kalozum, dubokoj beloj masi i infratentorijalnim regionima mozga. Ovakve promene se javljaju kod 90-95% pacijenata sa MS što govori o velikoj senzitivnosti metode, ali se viđaju i kod velikog broja drugih oboljenja (neurosarkoidoza, B12 deficijencija, neuroborelioza, sistemski lupus eritematodes, akutni diseminovani encefalomijelitis, antifosfolipidni sindrom i dr.) pa čak i kod 20-30% zdravih osoba starijih od 40 godina, što značajno smanjuje specifičnost metode (27).

DIJAGNOSTIKA MULTIPLE SKLEROZE

Upravo zbog opisane heterogenosti, dijagnostika MS predstavlja svojevrsni klinički izazov. Postavljanje dijagnoze multiple skleroze podrazumeva poštovanje dva osnovna kriterijuma: diseminaciju u vremenu (koja podrazumeva postojanje više od jedne epizode disfunkcije centralnog nervnog sistema) i diseminacije u prostoru (uključenost više od jednog područja centralnog nervnog sistema) uz isključivanje svih drugih bolesti koje diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir sa naglašavanjem principa da za kliničku sliku ne sme da postoji drugo bolje objašnjenje. Tokom vremena su dijagnostički kriterijumi evoluirali od postavljanja dijagnoze isključivo kliničkim parametrima (28), preko kriterijuma Poser i sar. iz 1983.g. (29) koji su obuhvatali i primenu „parakliničkih“ parametara kao što su magnetna rezonanca (MR), pregled likvora i evocirani potencijali (EP) do najnovijih „McDonald“ kriterijuma (30, 31,32) kojima su uglavnom pojednostavljena dokazivanja postojanja diseminacije u vremenu.

Primena McDonald kriterijuma rezultirala je u ranijem postavljanju dijagnoze MS sa visokim stepenom specifičnosti i senzitivnosti (33,34,35,36) omogućavajući bolje savetovanje pacijenata i ranije započinjanje tretmana. Najnovija revizija iz 2010.g. napravila je izmene u upotrebi i interpretaciji imidžing kriterijuma za diseminaciju u prostoru i diseminaciju u vremenu koje dalje povećavaju dijagnostičku senzitivnost bez uticaja na specifičnost uz pojednostavljivanje zahteva za demonstraciju i diseminacije u prostoru i vremenu sa smanjenjem potrebnih MR pregleda. Osnovni elementi dijagnostike MS prema ovim kriterijumima (32) su prikazani su na tabeli 1.

Tabela 1. McDonald kriterijumi

Klinički (ataci)	Lezije	Dodatni kriterijumi za postavljanje dijagnoze
2 ili više	Objektivna klinička evidencija 2 ili više lezija ili objektivna klinička evidencija 1 lezije sa evidencijom istorije bolesti o prethodnom ataku	Ni jedan. Sama klinička evidencija je dovoljna; dodatni podaci su poželjni ali moraju biti konzistentni sa MS
2 ili više	Objektivna klinička evidencija 1 lezije	Diseminacija u prostoru demonstrirana preko: a. ≥ 1 T2 lezije u najmanje 2 MS tipična CNS regiona (periventrikularni, jukstakortikalni, infratentorijalni, kičmena moždina) b. čekanje budućeg kliničkog ataka koji će ukazivati na različitu CNS lokaciju
1	Objektivna klinička evidencija 2 ili više lezija	Diseminacija u vremenu demonstrirana preko: a. simultana pojava asimptomatskih kontrastno pojačanih i ne pojačanih lezija u bilo koje vreme b. nova T2 i/ili kontrastno pojačana lezija (lezije) na ponovljenom MRI nezavisno od vremena snimanja c. čekanje drugog kliničkog ataka
1	Objektivna klinička evidencija 1 lezije	Diseminacija u prostoru demonstrirana preko: a. ≥ 1 T2 lezije u najmanje 2 MS tipična CNS regiona (periventrikularni, jukstakortikalni, infratentorijalni, kičmena moždina) b. čekanje budućeg kliničkog ataka koji će ukazivati na različitu CNS lokaciju i Demonstracija diseminacije u vremenu demonstrirana preko: a. simultana pojava asimptomatskih kontrastno pojačanih i ne pojačanih lezija u bilo koje vreme b. nova T2 i/ili kontrastno pojačana lezija (lezije) na ponovljenom MRI nezavisno od vremena snimanja c. čekanje drugog kliničkog ataka
0 (progresija od početka)		Jednogodišnja progresija bolesti (retrospektivno ili prospektivno) i 2 od 3 kriterijuma: a. diseminacija u prostoru u mozgu bazirana na ≥ 1 T2 lezije u periventrikularnim, jukstakortikalnim ili infratentorijalnim regionima b. diseminacija u prostoru u kičmenoj moždini bazirana na ≥ 2 T2 lezije ili c. pozitivni nalaz u likvoru*

*pozitivan nalaz u likvoru podrazumeva prisustvo oligoklonalnih IgG traka u likvoru (a ne i u

serumu) ili povišen IgG indeks.

GENETIKA MULTIPLE SKLEROZE

MS je kompleksna poligena bolest koja se ispoljava interakcijom genetskih faktora sa faktorima životne sredine. Veliki broj ispitivanja u prethodnih četrdesetak godina pokazao je da postoji familijarna agregacija, da je model nasleđivanja složen i poligen i da je rizik u familijama u kojima je neko oboleo veći i da pozitivno korelira sa stepenom srodstva (7). Genetska ispitivanja u MS vršena su preko studija: gena kandidata, analiza genetske povezanosti (eng. linkage analysis), asocijacionih analiza i u skorije vreme studijama asocijacije celokupnog genoma (genome wide association studies-GWAS). U osnovi ispitivanja genetski kompleksnih bolesti stoje dve osnovne strategije: analiza gena kandidata i pretraživanje ili skeniranje genoma.

Analiza gena kandidata testira udruženost između određene genetske varijante (na primer alela) i bolesti. Kandidat gen studije bazirane su na tekućem znanju biologije bolesti kao i postojećoj evidenciji za region od specijalnog interesa evidentiran ranijim analizama povezanosti (linkage analysis) ili asocijacionim analizama. Načini na koji neki gen ili genetska varijanta postaju "kandidati" su raznovrsni, na primer na osnovu poznavanja biologije genske ekspresije u određenom tkivu relevantnom za oboljenje, homologije sa drugim genima i slično. Ako je varijanta češća kod osoba sa oboljenjem nego kod neobolelih, to može biti posledica kauzalne veze između genetske varijante i bolesti. Druga mogućnost je da je ispitivana genetska varijanta genetski povezana (eng. linkage disequilibrium - LD) sa drugim genom na lokusu koji je blizu lokusa koji se ispituje. LD je populaciona korelacija između dve alelne varijante i dešava se kada se aleli na različitim lokacijama javljaju zajedno ili češće nego što bi se moglo očekivati slučajno na bazi njihove individualne učestalosti u populaciji (37). Zbog toga su analize gena kandidata zavisne o stepenu znanja o samom genu ili genskoj varijanti i adekvatnost analize samog gena je onoliko dobra koliko je i znanje o genu ili genskoj varijanti koji ga čini "kandidatom" (38).

U analizama genetske povezanosti jedan lokus je onaj koji se meri, odnosno prati, i njegov genotip možemo i moramo znati sa velikom sigurnošću. Taj lokus se naziva genetski marker. Drugi lokus je onaj koji je potencijalno vezan za ispoljavanje bolesti, što vidimo samo kroz fenotip od interesa, i njega treba indirektno, pomoću genetičkog markera locirati i utvrditi mu genotip. Nakon tipizacije markera čija nam je lokacija u genomu poznata, možemo testirati

svaki drugi marker i pretpostaviti na kom se delu hromozoma nalazi marker odgovoran za ispoljavanje bolesti a vezan je za poznati genetički marker (7).

Asocijacija je statistička izjava o koincidentnom dešavanju faktora. U medicinskoj genetici, faktor koji se smatra udruženim sa bolešću može biti jedna ili više baza u DNK molekulu (varijanta sekvence), strukturalna ili epigenetska varijanta. Asocijacione studije ili studije asocijacije genetskih markera sa bolešću, baziraju se na pretpostavci da će osobe pogođene bolešću imati isti genetski marker na istoj lokaciji u genomu. Studije asocijacije su usredsređene na praćenje učestalosti alela u populaciji, dok su studije povezanosti usredsređene na proučavanje nasleđivanja istog genetičkog markera. Asocijacija najčešće znači da je određeni genetski marker češći kod obolelih ali nije neophodan, niti dovoljan da se bolest ispolji. Ovu pojavu nazivamo predispozicijom za bolest. Studije asocijacije mogu biti: zasnovane na slučajnom uzorku populacije (eng. populationa based), zasnovane na poređenju pacijenata i kontrolne grupe (eng. case-control) i zasnovane na međusobnom poređenju pacijenata (eng. case-case).

Studije asocijacije celokupnog genoma (GWAS) predstavljaju delimično nasumično pretraživanje genoma u potrazi za mapiranjem markera genetske predispozicije za bolest. One ne prave pretpostavke o kandidaturi određenih gena ili genomskih regiona. GWAS obično okupljaju veliki broj povezanih pojedinaca pokušavajući da izdvoje gene koji imaju uticaja na bolest. GWAS mapiraju markere genetske predispozicije za bolest analizom niza polimorfizama jedne bazne zamene (eng. single nucleotide polymorphism - SNP) (7). Genetske varijacije na specifičnom lokusu nazvane su polimorfizmom ako se dešavaju sa frekvencijom većom od 1% u populaciji a mutacijom ako se dešavaju redje od toga (37). Najznačajnija klasa polimorfizma uključuje izmene pojedinačnog baznog para nazvane polimorfizam pojedinačnih nukleotida (SNP-single nucleotide polymorphism) koje čine oko 90% svih humanih varijacija. Ostali tipovi polimorfizma uključuju velike blokove sekventnih varijacija (mini/mikro-sateliti) ili kompleksnije alteracije sekvenci kao što su inverzije i delecije, ili duplikacije - copy-number varijacije (CNV) (40). Različite varijacije koje polimorfizam može imati na određenom lokusu nazvane su aleli. Za SNP, pojedinačne izmene baznih parova dešavaju se predominantno unutar dve klase nukleotida, između purina ($A \leftrightarrow G$) ili pirimidina ($C \leftrightarrow T$), što znači da će većina SNP imati samo dva alela u populaciji. Specifična kombinacija ovih alela kod pojedinca računata preko dva relevantna hromozoma definiše se kao genotip. Nasuprot tome je kombinacija ovakvih

alela na jednom hromozomu nazvana haplotip (41).

Inicijalne GWAS u MS najpre su potvrđivale i precizirale ranije ustanovljenu ulogu HLA gena utvrđivanu epidemiološkim studijama i konkordancijom među blizancima ili članovima porodice. Osim toga jasno su identifikovale lokuse sklonosti bolesti u H2RA, H7RA i nekolicine drugih genskih regiona što je nedavno bilo uspešno replicirano (42, 43, 44). Dva gena HLA-DRB1 i IL7R (CD127) su nedvosmisleno udružena sa podložnošću bolesti prateći njihovu identifikaciju kao kandidata po funkciji (45,46). Osim toga, tehnologije genotipiranja i hipoteza neutralne genome-wide association studije (GWAS) identifikovale su dodatne gene i lokuse od interesa za podložnost bolesti. Publikovani su rezultati četiri MS-GWAS studije: Hafler et al 2007 (47), Wellcome Trust Case Control Consortium 2007 (48), Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium 2009 (43), Baranzini i sar. 2009 (49). Od "ne" HLA lokusa, GWAS studijama je do sada identifikovano oko 50 gena koji pokazuju srednji do umereni efekat na rizik nastanka MS (odds ratio, OR < 1.3) od kojih većina kodira primarno imunološke funkcije. (8) Čak i sa ovim proširenim spiskom lokusa rizika, razumevanje MS genetike ostaje nekompletno. HLA-DRB1 objašnjava oko 7% ukupne varijanse u MS dok ostali geni objašnjavaju oko 3% preostale varijanse (4).

VITAMIN D HORMON

Vitamin D nije pravi vitamin, odnosno esencijalni dijetetski faktor, već je prohormon koji nastaje fotohemijском reakcijom u koži iz 7-dehidroholesterol (50). Vitamin D i njegovi metaboliti mogu da se kategorizuju kao holekalciferoli i ergokalciferoli. Holekalciferol (vitamin D3) je polazno jedinjenje za familiju koja se nalazi u prirodi i produkuje se u koži iz 7-dehidroholesterol pri izlaganju ultraljubičastom B delu spektra sunčeve svetlosti. Pod dejstvom sunčevih zraka na kožu, 7-dehidroholesterol apsorbuje ultraljubičaste B zrake (UV zraci talasne dužine 315-280 nm) i pretvara se u prekalciferol (previtamin D3), a veliki deo prekalciferola se konvertuje u holekalciferol (51). Vitamin D2 (ergokalciferol), polazno jedinjenje druge familije, nastaje radijacijom ergosterola koga produkuju kvasci i ima samo jednu trećinu aktivnosti vitamina D3 (50). I Vitamin D3 stvoren u koži i vitamin D2 absorbovan iz digestivnog trakta, putuju do jetre gde se hidrosilizuju na 25 poziciji ugljenika u kalcidiol (25-hidroksi vitamin D ili 25 (OH)D) koji je glavni cirkulatorni oblik vitamina D. Nakon hidrosilacije u jetri, kalcidiol

se dalje hidroksiliše u bubrezima pri čemu se stvara kalcitriol (1,25-dihidroksi vitamin D ili 1,25(OH)₂D) (51). Faze u endokrinom sistemu vitamina D su (50):

1. Fotokonverzija 7-dehidroholesterola u vitamin D₃ u koži ili unos vitamina D₂ hranom;
2. Metabolizam vitamina D₃ u jetri do 25-hidroksivitamina D₃ – 25(OH)D₃, glavnog oblika vitamina D u cirkulaciji;
3. Konverzija 25(OH)D₃ u bubregu (koji ovde funkcioniše kao endokrini žlezda) do hormona 1,25-dihidroksivitamin D₃ – 1,25(OH)₂D₃;
4. Sistemski transport dihidroksi metabolita do distalnih ciljnih organa i
5. Vezivanje 1,25(OH)₂D₃ za nuklearni receptor (VDR) u ciljnim organima što prati odgovarajući biološki odgovor.

Pored dobro poznate centralne uloge u homeostazi kalcijuma, ovaj pluripotentni hormon pokazuje dodatne biološke aktivnosti vezane za urodjeni i adaptivni imuni sistem, sekreciju insulina u pankreasu, razvoju mozga i fetalnom razvoju, multifaktorijalnoj srčanoj funkciji i regulaciji krvnog pritiska. Prisustvo aktivatornih i inaktivacionih enzima u skoro svim ćelijama sisara kao i činjenica da je gotovo 3% mišijeg i humanog genoma regulisano vitamin D putevima, govori u prilog tome da je on esencijalan za život viših životinja (50).

Vitamin D nema poznatih funkcija u svom nativnom obliku zbog čega je pre ispoljavanja dejstva neophodna njegova hidroksilacija kroz multiple hidroksilacione korake u jetri i bubrezima. Ključni enzimi u hidroksilaciji vitamina D su predstavnici grupe enzima citohrom (CYP) P450 i to hepatska vitamin D -25 hidroksilaza (u dva oblika CYP27A1 i CYP2R1), renalni 25-hidroksivitamin D-1alfa hidroksilaza (CYP27B1) i 25-hidroksivitamin D -24 hidroksilaza (CYP24A1).

1. Vitamin D hidroksilaze

Nekoliko citohromalnih enzima sposobno je da katalizuje 25 hidroksilaciju vitamina D₃ in vitro. CYP27A1 je mitohondrijalni enzim koji se ne smatra fiziološki relevantnom 25 hidroksilazom i ako katalizuje ovu reakciju in vitro. Ovaj enzim ne vrši ni 25 hidroksilaciju vitamina D₂ i ima prevashodnu ulogu u metabolizmu holesterola i bilijarnih kiselina te nema uticaja na nivo vitamin D metabolita. CYP2R1 je mikrozomalni enzim koji se smatra ključnim enzimom u 25 hidroksilaciji vitamina D₂ i D₃ nezavisno od pola. On je regionalno specifičan za

C-25 poziciju sekosteroida nasuprot drugim polifunkcionalnim citohromalnim enzimima koji ostvaruju vitamin D 25 hidroksilaznu aktivnost (kao što su CYP27A1, CYP2C11 i CYP3A4). Mutacija ovog enzima rezultira u pojavi vitamin D zavisnog rahitisa, jedinog rahitisa prouzrokovanog 25-hidroksilaznom deficijencijom. Sa druge strane, CYP2R1 ekspresija u humanim tkivima je ubikvitarna, što potvrđuje nalaz da je sposobnost formiranja 25(OH)D₃ skoro neizmenjena kod pacijenata sa poremećajima jetre (54).

25-hidroksivitamin D-1alfa hidroksilaza (CYP27B1) u mitohondrijama renalnih tubula vrši hidroksilaciju 25(OH)D u položaju 1 i pritom nastaje 1,25(OH)2D. Osim u bubrežima, ovaj enzim je prisutan i u plućima, kolonu, keratinocitima i makrofagima. Aktivnost bubrežne forme enzima u velikoj meri je zavisna od uticaja parathormona na aktivnost gena koji je kodiraju i prevashodno je uključena u regulaciju homeostaze kalcijuma i fosfora, dok ekstrarenalna forma enzima ima autokrine ili parakrine uloge u specifičnoj tkivnoj diferencijaciji (50).

25-hidroksivitamin D -24 hidroksilaza (CYP24A1) je uključen u inaktivaciju vitamina D u ciljnim ćelijama putem hidroksilacije 25(OH)D u 24,25(OH)2D i transformišući 1,25(OH)2D u kalcitroičnu kiselinu. C-24 oksidacija predstavlja predominantni katabolički put za 1,25(OH)2D u kojoj sekvencijalna C-24 hidroksilacija, C-24 ketonizacija i C-23 hidroksilacija praćena oksidativnim čišćenjem do stvaranja tetranor 1 α , 23 dihidro vitamin D i kalcitroične kiseline, oslobadja inaktivne, u vodi rastvorne produkte koji se ekskretuju putem žuči (50).

2. Kalcidiol – 25(OH)D

Karakteristike aktivne forme vitamina D 1,25(OH)2D su hormonske pa je vitamin D zapravo pre prohormon nego pravi vitamin. Struktura 1,25(OH)2D je slična drugim steroidnim homonima, a kao i drugi hormoni, 1,25(OH)2D cirkuliše u pikogramskim koncentracijama koje su 1000 puta manje od njegovog prekursora 25(OH)D. Koncentracija 25(OH)D, smatra se najboljim indikatorom vitamin D statusa (53). To je najstabilniji i dostupan metabolit vitamina D u humanom serumu, čiji je poluživot oko tri nedelje, što ga čini najprikladnijim indikatorom vitamin D statusa (18).

Poznati negenetski faktori koji utiču na nivo 25(OH)D su ultraljubičasto B (UVB) zračenje, dijetarni unos, suplementacija vitaminom D i fizička aktivnost. Pod optimalnim vrednostima 25(OH)D u organizmu smatraju se vrednosti između 75 i 200nmol/l (30-80ng/ml) (56,57,58). Definisanje ovih vrednosti međutim nije se baziralo na uobičajenim metodama klasične

kontrolne grupe “normalnih” odraslih (na primer sa 2,5og ili 5og percentila nađenog u zdravoj populaciji) zbog toga što je vitamin D deficijencija široko rasprostranjena u opštoj populaciji. Definisane vitamin D insuficijencije vezano je za određivanje nivoa 25(OH)D serumskog nivoa ispod koga se može desiti neželjeni ishod ili iznad koga su observirani pozitivni efekti vitamina D (59).

3. Vitamin D vezujući protein – VDB, GC protein

Vitamin D vezujući protein (eng. vitamin D binding protein – VDB, GC protein): zbog svoje lipofilne prirode, vitamin D zahteva postojanje proteina nosača koji bi mu obezbedio rastvorljivost u plazmi. GC protein (VDB) je serumski glikoprotein koji se vezuje za 25(OH)D i transportuje ga do ciljnih organa. Nakon aporpcije u crevu, vitamin D₂ se uglavnom transportuje hilomikronima a u manjoj meri vezan za VDB za razliku od vitamina D₃ sintetisanog u koži koji se uglavnom transportuje preko VDB. Hilomikronima transportovani vitamin D se može preuzeti od strane perifernih tkiva, pre svega masnog i mišićnog. Nakon metaboličke konverzije većine preostalog vitamina D u 25(OH)D u jetri, 25(OH)D₃ i 25(OH)D₂ se zbog svog visokog afiniteta vezuju za VDB. Plazmatski sadržaj vitamina D predstavlja predominantni telesni sadržaj vitamina D (50). VDB je odgovoran za transport holekalciferola do jetre, kalcidiola do bubrega i kalцитriola do ciljnih organa (60). Osim toga, VDB ostvaruje imunološke uloge funkcionišući kao hemotaktični faktor u privlačenju neutrofila i aktivaciji osteoklasta (61,62). Kontakt VDB sa B i T ćelijama omogućava konverziju VDB u potentan aktivacioni faktor makrofaga (63). Njegova sinteza u jetri je estrogen zavisna i značajno se povećava tokom trudnoće i estrogene terapije (64). Nasuprot drugim proteinima nosačima hormona, VDB koncentracije ne zavise od 25(OH)D nivoa i ne pokazuju sezonske varijacije. VDB je u stalnom višku u odnosu na sopstveni cirkulišući ligand 25(OH)D a ima plazmatski poluživot od 2,5 dana. Uklanja se u nekoliko različitih tkiva kao što su bubrezi, jetra, skeletni mišići, creva, pluća i kosti (65).

4. Vitamin D receptor - VDR

Nakon metaboličke aktivacije vitamina D u 1,25(OH)₂D₃ nastaje D hormon koji ostvaruje mnogobrojne efekte uključujući direktni ili indirektni uticaj na ćelijski ciklus, proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (64). Većina bioloških efekata aktivne forme D hormona -

1,25(OH)₂D₃ se ostvaruje nakon vezivanja za vitamin D receptor (VDR) prezentovan na ćelijskoj membrani. VDR pripada superfamiliji nuklearnih hormonskih receptora koji modulišu genetsku transkripciju. Vezivanje calcitriola za VDR inicira konformacione promene koje povećavaju afinitet ovog receptora za nuklearni retinoid X receptor (RXR). Kada se kompleks VDR – 1,25(OH)₂D heterodimerizuje sa RXR ovaj kompleks se vezuje za vitamin D vezujući element (VDRE) smešten u promotornim regionima različitih gena, čime se regrutuju brojni nuklearni koaktivatorni ili korepresorni proteini. VDRE je ligand-aktivirani transkripcioni faktor koji posreduje u genomskim efektima 1,25(OH)₂D₃. Vezivanje calcitriol-VDR-RXR kompleksa za VDRE na specifičnim genomskim sekvencama dovodi do uticaja na gensku transkripciju u smislu pojačavanja ili inhibicije transkripcije gena. Neki od efekata su smanjenje produkcije IL 2, IFN γ , TNF α (Th1 imuni odgovor), smanjenje IL17 (Th17 imuni odgovor), povećanje sekrecije IL4, IL5 i IL10 (Th2 imuni odgovor), povećanje aktivnosti Treg ćelija, povećanje IL4 i IFN γ (Natural Killer T ćelije) (51).

SUFICIJENTNOST VITAMINA D

Iako postoji konsenzus da je određivanje vrednosti 25(OH)D pouzdan indikator nivoa vitamina D u organizmu, postoji mnogo dilema u definisanju referentnih/ciljnih vrednosti 25(OH)D. Neke od njih su prema Hollis 2005 (68):

1. populaciono bazirane referentne vrednosti predstavljaju problem zbog varijabilnosti 25(OH)D nivoa medju različitim etničkim grupama, geografskim lokacijama i sezonski
2. postoje značajni podaci o tome da je vitamin D deficijencija uobičajena u Sjedinjenim američkim državama i mnogim drugim zemljama što čini teškim definisanje „normalne“ populacije.
3. ono što mi definišemo kao normalno ili optimalno u pogledu vitamin D statusa može biti predmet debate jer postoje naučni autoriteti koji ukazuju da mnogi ljudi, čak i bez znakova ili simptoma patologije, jesu deficijentni ili su granični u pogledu vitamin D zaliha u organizmu.

Jedan od načina definisanja referentnih 25(OH)D vrednosti je fiziološki pristup koji se bazira na povezivanju nivoa 25(OH)D i nivoa parathormona. Određivanjem nivoa 25(OH)D koji

maksimalno suprimira sekreciju parathormona nadjene su vrednosti od 30mg/ml što je uzeto kao tačka preseka za definisanje optimalnog vitamin D statusa. Ovakav pristup je značajan u proceni održavanja homeostaze kalcijuma. Drugi metod koji se koristi u određenim studijama je određivanje nivoa 25(OH)D iznad koga nema inkrementnog povećanja u vrednostima 1,25(OH)₂D nakon administracije vitamina D jer je tada nivo 1,25(OH)₂D adekvatan za ostvarivanje potrebnih zahteva. Slično kao u prethodnoj metodi vrednosti preseka nadjene su na 25-30ng/ml. Još jedna funkcionalna mera vitamin D statusa je nivo 25(OH)D koji rezultira maksimalnom intestinalnom apsorpcijom kalcijuma. Ovakvim ispitivanjem nadjeno je da se radi o vrednosti od 32ng/ml (69).

Alternativni pristup je definisanje kliničkih parametara za referentne vrednosti 25(OH)D kao što je na primer koncentracija ispod koje neželjeni efekti (posebno osteoporotično-povezane frakture kosti) značajno rastu. Ovaj pristup koristi Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organisation) da definiše vitamin D deficijenciju kao serumsku ili plazmatsku koncentracija 25(OH)D manju od 20ng/ml (50 nmol/l). Ovakvo stanje je međutim prisutno kod oko 1 biliona ljudi širom sveta. (68). Postoje neke klinički definisane vrednosti dalje određuju “ozbiljnu deficijenciju” (obično manje od 10 ng/ml) koji ima visok rizik od ozbiljnih skeletnih abnormalnosti i stoga zahteva hitan tretman.

Neke laboratorije definišu optimalne i deficijentne nivoe za 25(OH)D obično sa insuficijentnom ili graničnom vrednošću između. Prema Thacher i sar. 2011 (70) deficijencija vitamina D je stanje koje se klasično manifestuje koštanim oboljenjima (rahitis ili osteomalacija) i okarakterisana je oštećenom koštanom mineralizacijom dok se termin vitamin D insuficijencije koristi da opiše niske nivoe serumskog 25(OH)D koji mogu da budu udruženi sa drugim ishodima bolesti.

Nedostatak konsenzusa o 25(OH)D ciljnim opsezima rezultira u značajnoj varijaciji referentnih opsega ili ciljnih vrednosti koje koriste laboratorije ili proizvođači testova za 25(OH)D. Primer četiri velike referentne laboratorije u USA i tri tržišna imunoeseja. Iz ovog primera vidi se da vrednost koncentracije 25(OH)D od 25ng/ml (65nmol/L) može da se interpretira kao donja granica ili optimum prema rezultatima jedne laboratorije i insuficijencija prema rezultatima druge laboratorije (68):

Tabela 2. Definisanje suficijentnosti vitamina D

Test	Metod	Interpretacija	Koncentracija 25(OH)D (ng/ml)	Reference
ARUP Laboratories Salt Lake City, UT	Hemiluminiscentni imunoesej ili LC/MS/MS	Deficijencija Insuficijencija optimum	Manje od 20 20-29 30-80	Wagner and Greer
Mayo Medical Laboratories, Rochester, MN	LC/MS/MS	Ozbiljna deficijencija Srednja do umerena Optimalni nivo	Manje od 10 10-24 25-80	Vieth and Vieth i sar.
LabCorp, San Diego, CA	Imunohemiluminometrijski esej	normalno	32-100	Hollis
Liaison, DiaSorin, Stillwater, MN	Imunohemiluminometrijski esej	Deficijencija Insuficijencija suficijencija	Manje od 10 10-30 30-100	Singh i sar.
IDS enzimski imunoesej	Enzimski imunoesej	Deficijencija	Manje od 30	Heaney
IDS redioimunoesej	radioimunoesej	Normalne vrednosti	9,2-45,2	
Quest Diagnostics, San Juan Capistrano, CA	LC/MS/MS	Deficijencija Insuficijencija Optimalno	Manje od 20 20-30 Više od 30	

LC/MS/MS – likvidna hromatografija tandem mas-spektrometrija

Brojni faktori mogu da utiču na pojavu vitamin D deficijencije. UVB zraci sunca konvertuju 7-dehidroholesterol u koži u previtamin D3 koji se brzo konvertuje u vitamin D3. Ovaj proces zahteva UVB indeks veći od 3. U praktičnim okvirima, optimalna endogena produkcija vitamina D3 u odgovoru na sunčevu svetlost u severnim geografskim širinama zahteva izlaganje suncu u toplijim mesecima i tokom pika sunčanih sati (aproximativno od 10 sati pre podne do 3 po podne). U severnoj hemisferi oko 35 stepeni širine (na primer Atlanta USA), suštinski se ne stvara endogeni vitamin D3 od novembra do marta, čak ni prilikom direktnog izlaganja suncu. Kao posledica toga, za mnoge ljude tokom zimskih meseci jedini izvor vitamina D je onaj koji potiče iz hrane. Čak i u uslovima manjih geografskih širina sa većom dostupnošću sunca, ljudi koji ostaju uglavnom u unutrašnjim uslovima tokom pika dnevnih sunčanih sati, produkuju vrlo malo endogenog vitamina D. Kreme za zaštitu od sunca takodje značajno smanjuju vitamin D produkciju. Zaštitne kreme sa faktorom protekcije preko 15 blokiraju 99% ili više vitamin D produkcije. Sposobnost za vitamin D produkciju takodje opada kao deo procesa starenja, uglavnom u vezi smanjene dostupnosti 7 dehidroholesterolola. Oštećenja kože (na primer opekotine) takodje smanjuju produkciju vitamina D, zavisno od opsega oštećenja.

Drugi glavni faktor koji uzrokuje vitamin D deficijenciju je mali dijetarni unos. Postoji relativno malo hrane koja prirodno sadrži visoke količine vitamina D. Ovakva hrana uključuje: masnu ribu (na primer skuša), jaja, i neke vrste gljiva. Animalni izvori vitamina D obično sadrže Vitamin D3. Da bi se pojačao unos vitamina D dijetarni produkti (na primer mleko, buter) mogu biti suplementirani vitaminom D2 ili D3. U USA skoro svako mleko je obogaćeno sa 100IU vitamina D2 ili D3 po šoljici. Sa opadanjem unosa mleka od strane dece lista hrane suplementirane sa vitaminom D proširila se na sok od narandže, cerealije i drugu hranu. Značajno je reći da je dijetarni unos vitamina D obično mnogo manji od onog koji se može postići tokom 30 minuta direktnog sunčanja. Na primer, sunčani ekvivalent 1 minimalne eritematozne doze (dovoljne za postizanje crvenila kože unutar 24h) leti može rezultirati u 20 000 IU vitamin D3 produkcije. Nasuprot tome, 3,5 unci svežeg divljeg lososa sadrži 600 do 1000 IU vitamina D3 a većina obogaćenih hrana (mleko sok od narandže) sadrži samo oko 100IU po porciji. Mleko prilikom dojenja takodje sadrži niske koncentracije vitamina D posebno kod majki dojilja koje su i same vitamin D insuficijentne.

Medju ostalim faktorima ističu se malabsorpcija i primena pojedinih lekova. Stanja koja redukuju vitamin D absorpciju mogu biti upotreba holestiramina, cistična fibroza, celijačna bolest, Wippleova bolest, Chron bolest, gastrične operacije. Postoje i brojni lekovi koji dovode do vitamin D deficijencije: karbamazepin, fenobarbiton, fenitoin, refampicin, jer povećavaju ekspresiju jetrinih enzima citohrom P450 koji ubrzavaju čišćenje aktivne forme vitamina D (71).

GEOEPIDEMIOLOGIJA MULTIPLE SKLEROZE

Prevalenca MS pokazala je inverznu asocijaciju sa UV zračenjem u objavljivanim studijama (52, 53). Imajući u vidu ulogu UV zraka u produkciji vitamina D, ovim epidemiološkim otkrićima otvoren je put za istraživanje uloge vitamina D u riziku oboljevanja od MS. Od svih autoimuno uzrokovanih stanja čini se da je MS najjasnije povezana sa geografskom distribucijom (72).

Prevalenca MS varira od manje od 5 slučajeva na 100 000 stanovnika u tropskim predelima ili Aziji do preko 100-200 slučajeva na 100 000 u umerenim područjima, posebno onim sa velikom populacijom severno Evropskog porekla, uključujući Sjedinjene države, Kanadu, Novi Zeland i delove Australije. Iako učestalost MS raste progresivno sa geografskom širinom, postoje “džepovi” visoke učestalosti oboljenja kao što je Sardinija u toplom južno Mediteranskom regionu, dok je medju Inuitima koji žive u Kanadi, hladnom severu, učestalost MS mala, nasuprot očekivanjima koja proizilaze iz modela MS distribucije prema ambijentalnoj temperaturi /longitudinalnom geografskom modelu.

Širok opseg incidence i prevalence vidjen u različitim regionima ne prati neizostavno gradijent geografske širine ili druge geografske gradijente ukazujući da osim geografskih faktora i neki drugi činioci (faktori okruženja i genetski faktori) učestvuju u patogenezi oboljenja. Samo genetska sklonost ne može objasniti promene incidencije MS na primerima populacija imigranata. Ove se promene dešavaju u periodu koji je prekratak (jedna generacija) da bi bile objašnjene samo genetskim faktorima i značajno ukazuju na uticaj faktora okruženja što se vidi u dva primera. U Izraelu je frekvencija MS medju osobama rođenim u Izraelu Afričko/Azijskog porekla veće učestalosti nego medju Izraelcima Evropsko/Američkog porekla što je obrnuto u odnosu na nižu učestalost MS medju njihovim imigrantnim prethodnicima (73). Analiza imigracije u Australiji pokazuje da prevalenca MS raste sa geografskom širinom južno od

ekvatora. Prevalenca MS medju migrantima iz Velike britanije i Irske u Australiji, kao i rođenih u Australiji (ne aboridžanskih) populacija takodje pokazuje korelaciju sa geografskom širinom. Iako postoji gradijent prevalencije prema geografskoj širini, merena prevalencija MS medju ovim imigrantima je manja od one u njihovim zemljama porekla. U Australijskoj studiji, za razliku od drugih epidemioloških ispitivanja, nema značajne razlike u MS frekvenciji izmedju onih koji su imigrirali pre ili nakon starosti od 15 godina.

Jedna od najjačih korelacija geografske širine je intenzitet sunčevih zraka i UV radijacije. U Tasmaniji 136 slučajeva je poredjeno sa 272 kontrole. Veća ekspozicija suncu u periodu 6-15 godina bila je udružena sa smanjenjem rizika od MS. Postoji i studija Goldacre i sar. koja pokazuje da je učestalost kožnih kancera povezanih sa izlaganjem suncu manja kod MS pacijenata nego kod mečovanih kontrola, iz čega je izveden zaključak da je veća ekspozicija protektivna za MS (74).

GENETIKA VITAMINA D

Samo oko četvrtine individualne varijabilnosti u 25(OH)D koncentracijama je povezano sa svim poznatim faktorima koji utiču na status vitamina D (66). Skorašnje studije sugerišu uticaj genetskih faktora na nivoe cirkulišuće forme vitamina D (76,77,78) Procenjuje se da je udeo nasleđa u varijabilnosti nivoa 25(OH)D oko 53% (79).

Iako postoji nekoliko retkih Mendelijanski naslednih poremećaja koji uzrokuju vitamin D insuficijenciju, postoje podaci o uticaju uobičajenih genetskih varijanti na vitamin D status. GWAS studija Ahn i sar 2010 (79) evidentira četiri genska lokusa čiji su SNP povezane sa nivoom 25(OH)D: 1.Gen za vitamin D vezujući (binding) protein – VDB, 2.Gen za NAD sintetazu, 3. Gen za 7-dehidroholsterol reduktazu - uključenu u holesterol i vitamin D sintezu, 4. Gen za C-25 hidroksilazu koja konvertuje vitamin D₃ u aktivni D hormon receptor ligand.

U pomenutoj studiji najjača veza utvrđena je za SNP grupno specifičnog complement gena (GC) na hromozomu 4q12-13 koji kodira VDB - rs2282679 (A/C varijacija GC gena u intronu 12). U više studija utvrđeno je postojanje GC nukleotidnih polimorfizama udruženih sa koncentracijama 25(OH)D (23,24) sa najvećom statističkom značajnošću za rs2282679. Gen za VDB ima tri izoforme – Gc1S, Gc1F (češći u Afričkoj populaciji) i Gc2. Postojanje izoformi posledica je SNP u exonu 11: rs7041 sa G/A supstitucija rezultira u Glu/Asp aminokiselinskoj

izmeni (Gc1S), a rs 4588 sa C/A supstitucija u Thr/Lys supstituciji (Gc2). Osim SNP u eksonu koje rezultiraju u postojanju izoformi postoji i veći broj intronskih nukleotidnih izmena medju kojima rs2282679 (A/C SNP locirana na intronu 12) može uticati na izmenu vezivanja GC proteina sa 25(OH)D (77).

Mikrozomalni enzim CYP2R1 katalizuje C-25 hidroksilaciju vitamina D3 u aktivni vitamin D receptor ligand u jetri i drugim organima (79). Rezultati Zhang i sar. (81) nalaze statistički značajnu povezanost četiri SNP CYP2R1 gena sa nivoom 25(OH)D (rs10741657, rs10766197, rs12794714 i rs1562902), dok studija Ramos-Lopez i sar. (82) ispitujući povezanost pet SNP CYP2R1 gena (četiri navedena i rs2060793) nalazi statistički značajnu povezanost samo rs10741657 sa nivoom 25(OH)D. Studija Simon i sar. (83) sugerise mogući uticaj HLA genotipa na značaj povezanosti rs10741657 sa nivoom 25(OH)D. U pomenutoj studiji je evidentirano da je 'A' alel CYP2R1 (rs10741657) udružen sa sniženim 25(OH)D nivoom i da nesignifikantno redukuje MS rizik kod HLA-DR15 negativnih, što nije evidentirano kod HLA-DR15 pozitivnih individua.

Gen koji kodira VDR lociran je na hromozomu 12q. Sastavljen je od devet egzona i osam introna. Egzon IA kroz IF kodira 5' neutralni region; egzoni II i III kodiraju DNA vezujuće područje a egzoni IV do IX kodiraju ligand vezujući region. Ovaj gen ima nekoliko uobičajenih SNP varijanti. Najznačajnije su Fok I (rs2228570), Bsm I (rs1544410), Apa I (rs7975232) i Taq I (rs731236). Bsm I (A/G supstitucija), Apa I (G/T supstitucija) i Taq I (T/C supstitucija) ne proizvode strukturalne izmene u VDR proteinu.

Fok I predstavlja prisustvo T/C tranzicionog polimorfizma (ATG u ACG) u prvom od dva potencijalno translaciona inicijaciona mesta u eksonu II. Aleli SNP mogu biti FF, Ff, ff. Individue sa T alelom (označene kao F) iniciraju translaciju na drugom ATG mestu i izostaju tri NH₂- terminalne aminokiseline punog lanca VDR. Nasuprot tome individue sa C alelom (označene kao f) iniciraju translaciju na prvom ATG mestu i sintetišu VDR protein pune dužine (427 aminokiselina).

VITAMIN D I IMUNI SISTEM

Smatra se da je imunološki poremećaj u multiploj sklerozi prevashodno povezan sa izmenama u adaptivnom imunom odgovoru mada postoje podaci i o učešću urođenog imunog

odgovora. Postoji mnogo eksperimentalnih podataka o ulozi vitamina D u modulaciji adaptivnog imunog odgovora.

1. Indukcija tolerogenih svojstava u mijeloidnim dendritičnim ćelijama

Dendritične ćelije (DC) su profesionalne antigen prezentujuće ćelije (APC) koje imaju esencijalnu ulogu u inicijaciji i održavanju T ćelijski zavisnih imunih odgovora (84). In vitro, 1,25(OH)2D3 inhibira diferencijaciju monocita u DC, redukujući time broj ovih profesionalnih APC sposobnih da stimulišu T ćelije (85). In vivo, 1,25(OH)2D3 ima direktan immunosupresivni efekat na DC, redukujući IL 12 produkciju, IL 12 posredovani Th1 odgovor i produkciju Th1 citokina kao što su interferon gama (IFN gama) i IL 2 (86,87).

VDR agonisti prekidaju diferencijaciju i maturaciju DC i nishodno regulišu ekspresiju kostimulatornih molekula CD40, CD80 i CD86 i značajno smanjuju produkciju IL 12 dok pojačavaju produkciju IL 10 (87) što sve favorizuje indukciju DC sa tolerogenim svojstvima (88).

Aktivna sinteza 1,25(OH)2D3 ispoljava autoregulatornu funkciju inhibicijom diferencijacije monocitnih prekursora u nezrele DC i posledičnom sposobnošću nezrelih DC da podlegnu terminalnoj diferencijaciji u odgovoru na maturacioni stimulus (89). Lokalno stvaranje 1,25(OH)2D3 u DC tokom inflamatornog procesa negativno reguliše na parakrini način kroz ligand indukovano angažovanje histon deacetilaze 3, ekspresiju nuklearnog faktora kapa B komponente RelB, koja je esencijalna za DC diferencijaciju i maturaciju kao i za inflamatorni odgovor (90). Ovo objašnjava inhibitorne efekte 1,25(OH)2D3 na DC maturaciju i na njihovu produkciju proinflamatornih medijatora.

Analiza imunoregulatornih efekata 1,25(OH)2D3 na humane krvne mijeloidne DC (M-DC) i plazmacitoidne DC (P-DC) pokazuje različit kapacitet ovog hormona da modulira citokinsku i hemokinsku produkciju DC podgrupa tako što pokazuje značajan efekat na M-DC i neznatan na P-DC. Dalja inhibicija razvoja Th1 ćelija i pojačanje Treg ćelijske funkcije od strane 1,25(OH)2D3 u M-DC ali ne i P-DC. P-DC koje su okarakterisane unutrašnjom sposobnošću da primarno naivne CD4+ T ćelije diferenciraju u IL 10 produkujuće ćelije i CD4+ CD25+ T reg ćelije i suprimiraju imune odgovore, mogu predstavljati prirodno regulatorne DC (91). Nedostatak P-DC modulacije od strane 1,25(OH)2D3 će time ostaviti njihov tolerogeni potencijal nemodifikovanim.

2. Modulacija efektorne limfocitne funkcije

VDR agonisti regulišu DC funkciju time uobličavajući T ćelijsku aktivaciju i razvoj ali oni mogu također imati direktne efekte na T ćelije. Za VDR agoniste nadjeno je da selektivno inhibiraju Th1 ćelijski razvoj (92,93) i direktno inhibiraju Th1 tip citokina kao što su IL 2 i IFN gama(94,95). 1,25(OH)2D3 također pojačava razvoj Th2 ćelija putem direktnog efekta na naivne CD4+ ćelije zato i Th1 i Th2 ćelije mogu biti ciljane VDR agonistima zavisno od statusa T ćelijske diferencijacije (96). 1,25(OH)2D3 ima potentne direktne efekte na B ćelijski odgovor uključujući indukciju apoptoze, inhibiciju proliferacije, stvaranje memorijskih B ćelija, plazma ćelijsku diferencijaciju i produkciju imunoglobulina (97). B ćelije, slično makrofagima, DC i T ćelijama, eksprimiraju VDR i mogu sintetisati 1,25(OH)2D3 koji može ispoljiti autokrinu i parakrinu regulatornu aktivnost.

Tretman sa VDR agonistima inhibira T ćelijsku produkciju IL 17 (98), proinflamatornih citokina koji su produkovani od patogenih T ćelija u različitim modelima organ specifičnog autoimuniteta u mozgu, srcu, sinovijama i crevu. IL 17 produkcija je također praćena IL 23 i IL 12 članovima familije sastavljenim od P19 i P40 lanaca od kojih je zadnji jako inhibiran VDR agonistima. VDR anonisti verovatno primarno inhibiraju proinflamatorne, patogene T ćelije kao što su Th1 i Th 17 ćelije i pod adekvatnim uslovima oni favorizuju skretanje na Th2 put. Ovi su efekti delimično vezani za direktno ciljanje T ćelija agonistima ali modulacija funkcije DC VDR agonistima također može igrati značajnu ulogu u usmeravanju T ćelijskih odgovora. Zbog toga, VDR agonisti mogu ciljati T ćelije i direktno i indirektno, selektivno inhibirajući T ćelijske podgrupe koje posreduju u hroničnoj inflamaciji i tkivnom oštećenju.

3. Pojačanje regulatorne t ćelijske funkcije

Tolerogene DC indukovane kratkim tretmanom sa 1,25(OH)2D3 ili njegovim analogima mogu indukovati CD4+CD25+ T reg ćelije koje su sposobne da posreduju u toleranciji transplantacije (99). Tolerogene DC ne moraju uvek biti uključene u stvaranje T reg ćelija od strane VDR agonista, i pokazano je da kombinacija 1,25(OH)2D3 i deksametazona indukuje da se CD4+ T ćelije in vitro diferenciraju u IL 10 produkujuće T reg ćelije, čak i u odgovoru na antigen prezentujuće ćelije. VDR agonisti ne samo da favorizuju indukciju CD4+CD25+ T reg ćelija i pojačavaju njihovu supresivnu aktivnost, već mogu i da promovišu njihovo povlačenje u

inflamirana mesta (99). M-DC stvorene u krvi, konstitutivno proizvode visoke nivoe hemokina CCL17 i CCL22 koji su dalje pojačani CD4 ligacijom. CCL22 (CCR4 agonist) selektivno povlači Foxp3⁺ CCR4⁺ CD4⁺CD25⁺ Treg ćelije. Interesantno, produkcija CCL22 je značajno uvećana od strane 1,25(OH)₂D₃ u krvnim M-DC (100), indukujući da VDR agonisti mogu stimulisati regrutovanje T reg ćelija pomoću ovih DC podgrupa.

4. Vitamin D i EAE

Ekperimentalni autoimuni (alergijski) encefalomijelitis (EAE) je animalni model inflamatorno demijelinizacionog oboljenja centralnog nervnog sistema. Indukcija na ekperimentalnim životinjama obično se vrši homogenatom kičmene moždine, prečišćenim mijelinom, mijelinskim proteinima (MBP, MOG, PLP) ili peptidima ovih proteina kao i pasivnim transferom autoreaktivnih T ćelijama usmerenim na ove mijelinske antigene.

Pokazano je da 1,25(OH)₂D suplementacija prevenira razvoj ekperimentalnog alergijskog encefalomijelitisa a vitamin D deficijencija povećava sklonost miševa da dobiju EAE (101). 1,25(OH)₂D₃ inhibira EAE što je potvrđeno mnogobrojnim studijama (102), najverovatnije tako što preko Rag-1 zavisnih ćelija ograničava Th1 aktivaciju (103) ili preko senzitivacije CD4⁺ T ćelija na apoptotične stimulse. U studijama sa IL4 (104) i IL10 receptor (105) knock out miševima nadjeno je da kod miševa bez IL4 i IL10 ne može da inhibira EAE sugerišući protektivno dejstvo vit D preko ovih citokina, mada su efekti vezani za IL4 kontraverzni. Mattner i sar. 2000 (106) nalaze da in vivo tretman sa 1,25(OH)₂D₃ ili njegovim analogima inhibira EAE u asocijaciji sa inhibicijom IL12.

VITAMIN D HORMON U MULTIPLOJ SKLEROZI

Najznačajnija karakteristika MS epidemiologije godinama je bila geografska distribucija prevalencije (107) i njene su karakteristike smatrane centralnim pitanjem faktora okruženja za rizik od oboljevanja u MS. Gradijent porasta MS rizika sa porastom geografske širine u obe hemisfere je koindcidirao sa godišnjim izlaganjem suncu i učestalošću vitamin D deficijencije. Pre nekoliko decenija pretpostavljeno je da je to efekat vitamin D adekvatnosti posredovane efektom UVB zračenje-geografska širina. Neadekvatna koncentracija vitamina D je ponovo

aktuelizovana kao primarni kandidat u sklonosti obholjevanju od MS i patogenezi bolesti iako je teško ustanovljavanje pouzdane literaturne evidencije koja direktno podržava ovu hipotezu (108).

Kliničkim istraživanjima opservirane su niske serumske koncentracije 25(OH)D u MS pacijenata (109,110). Vitamin D suplementacija (111) i visoke koncentracije 25(OH)D kod odraslih (112) su umereno udružene sa redukcijom rizika od MS u dve USA kohortne studije. Izlaganje suncu kroz aktivnosti u spoljnoj sredini pokazalo je inverznu korelaciju sa MS rizikom (113,114). Postoje longitudinalne studije u kojima su i viši unos vitamin D i više vrednosti 25(OH)D pokazale inverznu povezanost sa rizikom od MS (111,112). Ova zapažanja i eksperimentalna potvrda da vitamin D može modulirati imuni odgovor podržavaju hipotezu da visoki nivoi vitamina D mogu biti protektivni u MS (115).

Vrlo kompleksna genetska osnova bolesti najverovatnije suštinski formira rizik za MS ostvarujući interakcije između rizičnih alela HLA regiona, relativizujući značaj izolovanog prisustva bilo kojeg od njih pojedinačno (7). Epistatska interakcija između dva gena dešava se kada je ispoljavanje fenotipa jednog gena uslovljeno fenotipom drugog gena. Ramagopalan i sar. (117) su nakon identifikacije vitamin D vezujućih elemenata (VDRE) u HLA-DRB1 promotor regionu pokazali da ovaj VDRE ima haplotip specifične razlike u MS u odnosu na ne MS asociirane haplotipe i da kao takav utiče na senzitivnost HLA-DRB1*15 na vitamin D kod MS ali ne i kod "ne" MS pacijenata. "Može se zaključiti da nedostatak vitamina D u ranom detinjstvu može uticati na ekspresiju HLA-DRB1 u timusu i da redukcija ekspresije bolesti zavisnih alela klase II uključujući HLA-DRB1*15 u timusu može rezultirati gubitkom centralne tolerancije".

Veza između 25(OH)D nivoa i MS rizika može se analizirati direktno u longitudinalnim studijama i alternativno kroz "Mendelijansku randomizaciju" koja uključuje korišćenje genetskih faktora: ako vitamin D ima protektivni efekat, pojedinci sa genotipom udruženim sa višim 25(OH)D bi trebalo da imaju redukovan rizik od MS osim ako isti genotipi takodje povećavaju MS rizik kroz nezavisne mehanizme (116)

CILJEVI

1. Da se utvrdi zastupljenost nukleotidnih polimorfizama rs2282679 gena za vitamin D vezujući protein, rs10741657 gena mikrozomalnog enzima CYP2R1 i rs2228570 gena za vitamin D receptor kod obolelih od MS kao i u odnosu na kontrolnu grupu.
2. Evaluacija statusa vitamina D izraženog nivoom 25(OH)D kod pacijenata obolelih od MS i njegove povezanosti sa ispitivanim nukleotidnim polimorfizmima, kliničkim karakteristikama (težina kliničke slike) i/ili demografskim karakteristikama.
3. Evaluacija povezanosti prisustva ispitivanih nukleotidnih polimorfizama sa kliničkim karakteristikama (težina kliničke slike) i/ili demografskim karakteristikama.

HIPOTEZE

H0 Postoji značajna povezanost nivoa vitamina D i polimorfizama gena povezanih sa njegovim efektima sa rizikom nastanka i kliničkim karakteristikama multiple skleroze.

H1 Nivo vitamina D značajno je povezan sa oboljevanjem od multiple skleroze među pacijentima na ispitivanom geografskom području.

H2 Postoji značajna povezanost genskog polimorfizma rs2282679 gena za vitamin D vezujući protein sa nivoom vitamina D kod pacijenata obolelih od multiple skleroze u našoj populaciji.

H3 Postoji značajna povezanost genskog polimorfizma rs10741657 gena mikrozomalnog enzima CYP2R1 sa nivoom vitamina D kod pacijenata obolelih od multiple skleroze u našoj populaciji

H4 Prisustvo Fok I (rs2228570) VDR polimorfizma povećava rizik za oboljevanje od multiple skleroze.

MATERIJAL I METODE

Pacijenti i kontrole

Ispitivanje je vršeno na 160 pacijenata kod kojih je dijagnoza multiple skleroze postavljena na osnovu McDonald kriterijuma (32) a koji su lečeni na Klinici za neurologiju Kliničkog centra u Nišu i Klinici za neurologiju Vojno-medicinske akademije u Beogradu. Kod pacijenata su evidentirani osnovni demografski podaci: pol i starost u trenutku ispitivanja. Pacijenti su davali podatke o hereditarnom opterećenju i eventualno o obolelim članovima porodice. Na osnovu uvida u medicinsku dokumentaciju za sve ispitanike evidentirano je vreme nastanka oboljenja i dužina trajanja bolesti; prvi simptomi i znaci oboljenja; klinički tok oboljenja (relapsno-remitentni, sekundarno-progresivni). Stepenn neurološke onesposobljenosti izražavan je EDSS skalom.

EDSS (eng. Expanded disability status scale) predstavlja standardizovanu neurološku proceduru ispitivanja i procene stepena onesposobljenosti neznatno modifikovanu u odnosu na izvorni oblik definisan od strane Kurtzke JF 1983 (120). Skala je sastavljena od sedam funkcionalnih skorova (vizuelni, moždano-stabaoni, piramidalni, cerebelarni, senzorni, funkcija bešike i creva i cerebralni funkcionalni skor) dopunjenih pokretljivošću pacijenta. Skala gradira stepen neurološke onesposobljenosti od 0 – normalan neurološki pregled (svi funkcionalni skorovi jednaki 0) do 10,0 – smrt zbog multiple skleroze. Vrednosti EDSS skora do 4 odnose se na potpuno pokretne pacijente (sposobne da hodaju preko 500m) pri čemu je vrednost skora definisana putem pojedinačnih funkcionalnih skorova. EDSS funkcionalni skorovi između 4,0 i 5,0 definisani su i funkcionalnim skorovima i sposobnošću kretanja pri čemu ozbiljniji parametar definiše EDSS korak. EDSS vrednosti 5,5 do 8,0 isključivo su definisani sposobnošću kretanja i neophodnoj pomoći odnosno sposobnosti za korišćenje invalidskih kolica.

Ispitivanje je obuhvatilo i 160 kontrolnih ispitanika kod kojih nisu evidentirani znaci postojanja oboljenja a kod kojih je uzorkovanje periferne krvi sprovedeno tokom dolazaka na rutinske zdravstvene kontrole.

Određivanje serumskog nivoa 25(OH)D

Kompletno određivanje vrednosti serumskog 25(OH)D vršeno je na Institutu za medicinsku biohemiju Vojno medicinske akademije u Beogradu. Nakon venepunkcije kubitalne vene ispitanika, puna krv je sakupljana vakutajnerima . Uzorci su ostavljeni da koagulišu nakon čega je sprovedeno centrifugiranje. Vrednosti serumskih koncentracija 25(OH)D određivane su iz seruma pacijenata dobijenih odlivanjem supernatanta.

Imajući u vidu postojanje sezonskih varijacija u nivou vitamina D, uzorkovanje je vršeno u istom periodu godine, krajem proleća za sve ispitanike i kontrole.

Kod svih ispitanika određivane su vrednosti serumskog 25(OH)D ADVIA Centaur vitamin D total metodom koja se koristi za određivanje totalnog 25(OH)D u humanom serumu ili plazmi (SIEMENS Immunoassay Systems). Određivanje totalnog 25(OH)D označava određivanje ukupne koncentracije prisutnog 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃.

Ovaj metod predstavlja kompetitivni imunoesej koji koristi: anti-fluorescinska monoklonalna mišija antitela kovalentno vezana za paramagnetne čestice, anti 25(OH)D vitamin D monoklonalna mišija antitela obeležena sa akridinijum estrom i vitamin D analog obeležen sa fluorescinom. Analizira se i kvantifikuje inverzna veza između količine vitamina D koji je prisutan u uzorku i količine relativnih svetlosnih jedinica detektovanih od strane sistema.

Metoda koristi hemiluminiscenciju, vrstu hemijske reakcije koja emituje energiju iz svetla. Za hemiluminiscenciju se koristi akridinijum estar čijom se oksidacijom emituje svetlost usled promene okruženja od kiselog ka baznom. Akridinijum estar se kovalentno vezuje za monoklonalna mišija antitela ne menjajući sposobnost ovih antitela da se vezuju za antigen. Paramagnetne čestice su kristali oksida gvoždja koji mogu biti privučeni od strane magnetnog polja. U ADVIA Centaur XP esejima paramagnetne čestice su presvučene antigenima. Tokom inkubacije, ove paramagnetne čestice se vezuju za ciljno antitelo i kada je sistem izložen magnetnom polju magneti privlače paramagnetne čestice vezane za antitelo.

Kompetitivni imunoesej: u sistem se ubacuju akridinijum estrom obeležena antitela i paramagnetne čestice presvučene antigenom. Antigenom presvučene paramagnetne čestice kompetiraju sa analit specifičnim antigenom u uzorku za ograničen broj vezujućih mesta na

akridinijum estrom obeleženom antitelu. Koristeći princip kompeticije, ukoliko je više analit specifičnog antigena, manje će se obeleženih paramagnetnih čestica vezati za antigen i obratno. Sistem se zatim izloži magnetnom polju koje privlači paramagnetne čestice i ubacuje kiselinu i bazu u cilju iniciranja hemiluminiscentne reakcije. Nakon toga se vrši merenje emisije svetla i proračunavanje koncentracije analita od strane sistema.

Ovom metodom se određuju vrednosti ukupnog 25(OH)D sa vrednostima između 3,7 i 150 ng/ml (9,3 do 375nmol/l). Dobijene vrednosti izražavaju se u ng/ml (što predstavlja uobičajene jedinice) ili nmol/l (SI sistem jedinica) sa konverzionom formulom $1\text{ng/ml}=2,5\text{nmol/l}$. Kao referentne vrednosti ovom procedurom predviđene su vrednosti 75-250nmol/l.

Genetska analiza

Kompletna genetska analiza koja je uključivala izolaciju DNK i genotipizaciju ispitivanih polimorfizama urađena je u Labotoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu.

1. Izolacija DNK iz ćelija pune krvi

Za izolaciju DNK, svim ispitanicima uzimano je po 3 ml krvi iz kubitalne vene i puna krv sa antikoagulansom EDTA čuvana je na -20°C , do procedure izolacije ćelijske DNK. Korišćene su dve metode izolacije DNK.

Izolacija DNK po Kunkel-u i saradnicima (1977) (121) rezultuje visokim prinosom i kvalitetom izolovane DNK a, takođe, omogućava i dugotrajno i jednostavno čuvanje uzoraka izolovanih na ovaj način. Uzorci DNK se čuvaju na $+4^{\circ}\text{C}$.

Izolacija DNK primenom kita DNA BloodPrepTM, na aparatu ABI PRISMTM 6100, je brza metoda izolacije DNK iz male zapremine pune krvi (150 μl), uzete sa antikoagulansom (EDTA). Nakon ekstrakcije i prečišćavanja, DNK se eluira sa filter-membrane. Jedan postupak izolacije omogućava istovremeno izolovanje DNK iz 94 uzorka. Uzorci DNK se takođe čuvaju na $+4^{\circ}\text{C}$.

Merenje koncentracije i provera kvaliteta izolovane DNK

Koncentracija uzoraka DNK određena je spektrofotometrijski, na aparatu BioSpec-nano. Merenjem apsorbancije DNK na 260nm i 280nm utvrđeno je da uzorci imaju zadovoljavajuću čistoću, pošto je odnos A_{260}/A_{280} bio u opsegu 1,8-2,0.

2. Genotipizacija polimorfizma DNK, Fok-I (rs2228570) u genu za receptor za vitamin D metodom PCR-RFLP

Lančana reakcije polimeraze, *engl.* Polymerase Chain Reaction (PCR), je metoda enzimske amplifikacije specifičnih fragmenata DNK *in vitro*. Reakcija zahteva vrlo male količine početnog materijala DNK a izvodi se pomoću enzima *Taq* polimeraze, termostabilne DNK polimeraze izolovane iz bakterije *Thermus Aquaticus*. Umnoženi fragmenti DNK mogu se dalje obrađivati upotrebom komercijalno dostupnih enzima restikcionih endonukleaza koje prepoznaju specifične sekvence DNK, tzv. restikciona mesta, i seku ih. Ukoliko se u okviru restikcionog mesta nalazi polimorfno mesto, to omogućava razlikovanje genotipova polimorfizma u ciljnom genu metodom RFLP (*skr.* od *engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism).

PCR je urađen po modifikovanom protokolu Bid i saradnika (Bid i sar. 2009) (122). Korišćeni su amplimeri: nizvodni 5'AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGGC TCT 3' i uzvodni 5'ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC 3'. Modifikacija protokola PCR reakcije je podrazumevala korigovanje koncentracije Mg jona (finalna koncentracija 2mM) i temperature hibridizacije (60°C).

Protokol za digestiju restikcionom endonukleazom

Inkubirano je 10 µL PCR produkta sa 5U restikcione endonukleaze BseGI (BtsCI) u odgovarajućem digestionom puferu, na 55°C preko noći. Enzim prepoznaje sekvencu GGATG(2/0)^ i ukoliko je na mestu digestije prisutan alel T PCR fragment će biti digestiran na dva fragmenta dužine 196bp i 69 bp. Ukoliko je prisutan drugi alel C neće doći do digestije PCR fragmenta i dužina fragmenta će ostati 265 bp.

Provera sinteze i veličine sintetisanih fragmenata DNK elektroforezom na agaroznom gelu

Za proveru sinteze i analizu sintetisanih fragmenata DNK, rađena je horizontalna elektroforeza na agaroznom gelu, koja omogućava razdvajanje sintetisanih fragmenata DNK. Razdvajanje se postiže na osnovu različite pokretljivosti fragmenata kroz podlogu u električnom polju, u zavisnosti od njihove dužine, primarne i sekundarne strukture.

Analiza produkata alel-specifične PCR reakcije urađena je na 1,8% (w/v) agaroznim gelovima, sa 0,5 µg/ml EtBr u 1x Tris-acetatnom puferu (TAE), u trajanju od 1h u električnom polju jačine 7,5 V/cm dužine gela.

Tabela 3. Prikaz dužina fragmenata DNK (bp) genotipova polimorfizma Fok-I (rs2228570)

Genotipovi polimorfizma Fok-I (rs2228570)	Dužina fragmenata DNK (bp) posle PCR-RFLP reakcija
TT (FF)	196, 69
TC (Ff)	265, 196,69
CC (ff)	265

3. Genotipizacija polimorfizama DNK (GC) (rs2282679) i CYP2R1 (rs10741657) metodom PCR u realnom vremenu (Real-time PCR)

Genotipizacija polimorfizma u genu za vitamin D vezujući protein (GC) (rs2282679) i polimorfizma u genu za enzim CYP2R1 (rs10741657) je urađena metodom za diskriminaciju alela, koja je tipa “end-point” analize za detekciju različitih alelnih varijanti ispitivane sekvence DNK. Genotipizacija je urađena na aparatu 7500 Real-time PCR sistem (Applied Biosystems) korišćenjem komercijalnih *TaqMan* esejja za diskriminaciju alela polimorfizma zamene pojedinačnog nukleotida (SNP). Svaki esej čini par specifičnih amplimera koji okružuju polimorfno mesto i par *TaqMan* alel-specifičnih proba koje imaju identičnu sekvencu, osim razlike na mestu ispitivanog SNP: jedna proba sadrži nukleotid komplementaran češćem alelu, a druga proba sadrži nukleotid komplementaran ređem alelu.

Reagensi i protokol

Komercijalni setovi amplimera i alel-specifičnih proba za genotipizaciju: *TaqMan*® SNP Genotyping Assay C__26407519_10 za polimorfizam u genu za vitamin D vezujući protein (GC) (rs2282679), i *TaqMan*® SNP Genotyping Assay C__2958430_10 za polimorfizam u genu za enzim CYP2R1 (rs10741657) (Applied Biosystems).

Smeša komponenata reakcije: *TaqMan*® Genotyping Master Mix (2x) (AmpliTaq Gold® DNK polimeraza, dNTPs bez dUTP, pasivna boja Rox) (Applied Biosystems).

Voda bez nukleaza: Nuclease-Free Water (Ambion).

Genotipizacija je urađena po standardnom protokolu preporučenom od strane proizvođača (Applied Biosystems).

Statistička obrada podataka

Frekvencije genotipova i alela određene su metodom prebrojavanja (*engl.* gene counting method). Za utvrđivanje Hardy-Weinberg (HW) ravnoteže, primenjen je χ^2 test. Analiza razlike u distribuciji genotipova i alela između posmatranih grupa urađena je Pearsonovim χ^2 testom. Distribucija vrednosti kontinualnih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. Relacija između vrednosti kategorijskih i kontinualnih varijabli testirana je analizom varijanse (ANOVA), ukoliko su vrednosti kontinualnih varijabli bile u normalnoj raspodeli, ili primenom Kruskal-Wallis neparametrijske ANOVA-e ukoliko vrednosti kontinualnih varijabli nisu bile u normalnoj raspodeli. Vrednosti fenotipskih varijabli predstavljene su kao brojevi i procenti, ili kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom (\pm SD). Asocijacija genotipova sa fenotipom je ispitana regresionom analizom. Mera asocijacije genotipova sa fenotipom od interesa izražena je kao odnos šansi, OR (*engl.* Odds Ratio), sa intervalom pouzdanosti 95% (\pm 95% CI, *engl.* Confidence Interval). U svim statističkim testovima, vrednost verovatnoće $p < 0,05$ smatrana je značajnom. Sve statističke analize urađene su korišćenjem programa Statistica 8.0 Software.

REZULTATI

Demografski i klinički parametri

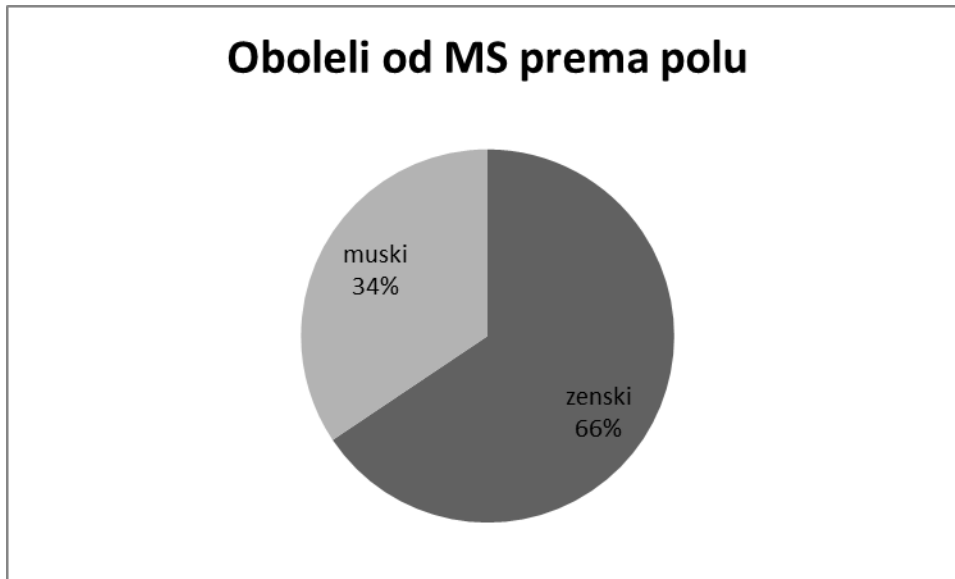
Prosečna starost ispitanika u kontrolnoj grupi iznosila je $49,32 \pm 14,14$ godina a u grupi pacijenata $42,82 \pm 11,86$.

U grupi pacijenata broj žena je oko 1,9 puta veći nego muškaraca, što potvrđuje opšti trend veće učestalosti bolesti u ženskom polu. Odnos polova u kontrolnoj grupi se ne razlikuje značajno od odnosa u grupi pacijenata, što je važno za dalje analize u kojima se ove dve grupe upoređuju (grafikoni 1 i 2):

Grafikon 1. Polna distribucija ispitanika kontrolne grupe



Grafikon 2. Distribucija po polu pacijenata obolelih od MS



U tabeli 4 su prikazani relevantni demografski parametri za kontrolnu i grupu pacijenata sa multiplom sklerozom (pol, starost ispitanika).

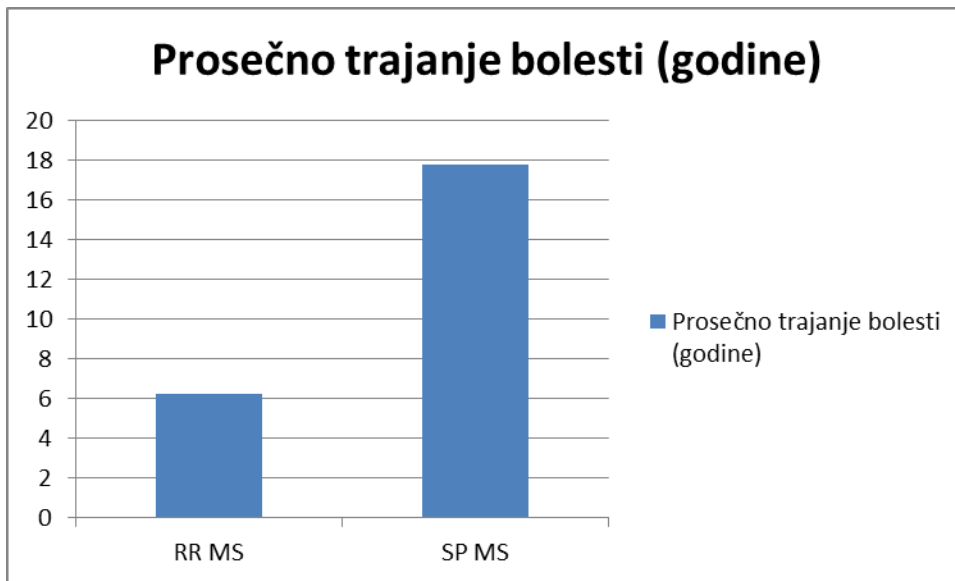
Tabela 4. Opis kontrolne i ciljne grupe (starost i pol ispitanika)

Parametar	Kontrole (n=179)	Pacijenti (n=151)
Starost (godine)	49,32 ±14,14	42,82±11,86
Pol - broj ispitanika ženski/muski (%)	112/67 (62,6/37,4)	99/52 (65,6/34,4)

Vrednosti parametara su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD); n-ukupan broj kontrola/pacijenata

Prosečno trajanje bolesti i težina kliničke slike izražena EDSS skalom prikazani su grafikonima 3 i 4 i tabelom 5.

Grafikon 3. Prosečna dužina trajanja bolesti kod ispitivanih pacijenata



Grafikon 4. Prosečne vrednosti EDSS kod ispitivanih pacijenata

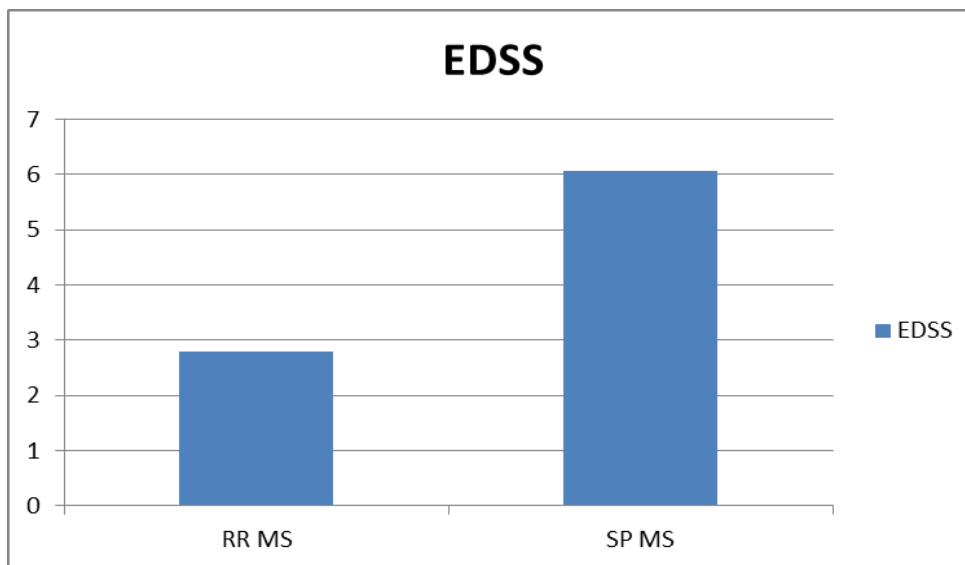


Tabela 5. Opis grupe pacijenata (trajanje bolesti i stepen neurološke onesposobljenosti)

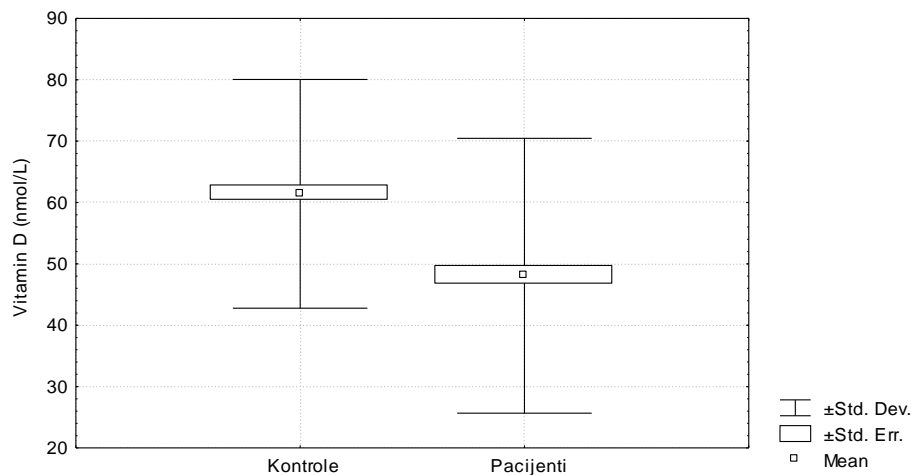
Parametar	RR MS	SP MS	RR+SP MS
Trajanje bolesti (godine)	6,22±4,17	17,79±7,56	8,07±6,59
EDSS	2,80±1,45	6,07±1,53	3,36±1,92

Vrednosti parametara su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD); RR-pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP-pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom.

Vrednosti serumskih nivoa vitamina D

Vrednosti serumskog 25(OH)D iznosile su 61,41±18,63nmol/l medju kontrolnim ispitanicima i 48,05±22,39nmol/l u grupi obolelih od MS što je prikazano grafikonom 5. Ispitivane vrednosti serumskog 25(OH)D bile su statistički značajno veće kod kontrolne grupe u odnosu na pacijente obolele od MS ($p<0,001$).

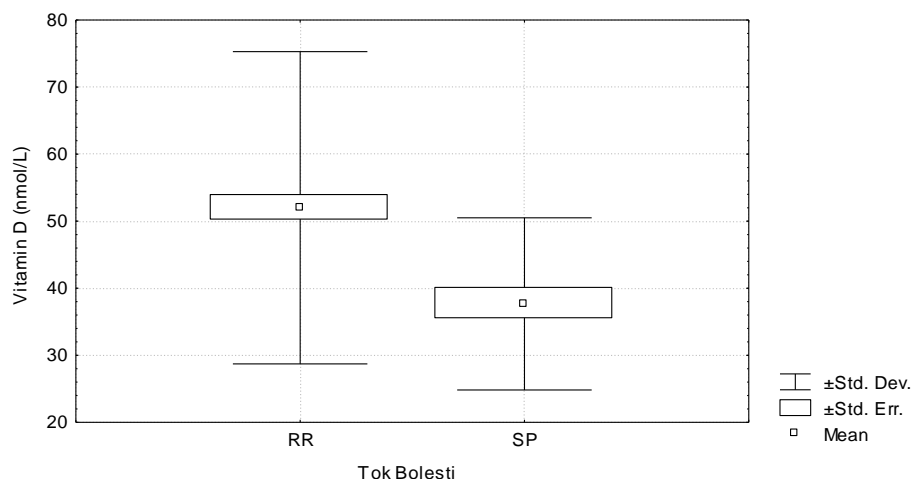
Grafikon 5. Vrednosti serumskih nivoa 25(OH)D kod kontrolne grupe i pacijenata



Ispitivanjem je evidentirano postojanje razlika u vrednostima serumskog 25(OH)D medju obolelim pacijentima u relapsno remitentnoj i sekundarno progresivnoj fazi bolesti. Kod

pacijenata sa RRMS srednje vrednosti 25(OH)D iznosile su $52,00 \pm 23,28$ nmol/l a pacijenti sa SPMS $37,67 \pm 12,84$ nmol/l uz evidentiranu statistički značajnu razliku izmedju ispitivanih grupa ($p=0028$) (Grafikon 6).

Grafikon 6. Vrednosti serumskih nivoa 25(OH)D kod pacijenata sa RRMS i SPMS



Korelacija serumskih vrednosti vitamina D sa kliničkim parametrima

Rezultati ispitivanja pokazuju da su starost na početku bolesti i nivoi 25(OH)D statistički u značajnoj korelaciji i to obrnuto proporcionalno ($p < 0,01$), dok dužina trajanja bolesti i serumske vrednosti vitamina D nisu značajno asocirani. Vrednosti EDSS i 25(OH)D pokazivale su statistički značajnu obrnutu korelaciju ($p < 0,001$), što je odgovaralo i evidentiranoj statistički značajnoj razlici u srednjim vrednostima 25(OH)D kod pacijenata sa RRMS i SPMS formom bolesti.

Učestalost genetskih polimorfizama

Učestalost zastupljenosti ispitivanih genotipova kod grupe kontrolnih i pacijenata prikazane su na tabelama 6,7 i 8. Utvrđeno je prisustvo sva tri ispitana polimorfizma, rs10741657 G/A u genu za CYP2R1, rs2282679 T/G u genu za VDB (GC) i rs2228570 C/T (Fok I) u genu za VDR i u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata sa MS.

Tabela 6. Učestalost Fok I VDR genotipova kod zdravih ispitanika i obolelih od multiple skleroze

Genotip polimorfizma	Kontrole n (%)	Pacijenti RR+SP n (%)
Fok I	171	166
CC	71 (41,52)	65 (39,16)
CT	74 (43,27)	82 (49,40)
TT	26 (15,20)	19 (11,45)

Tabela 7. Učestalost rs10741657 genotipova CYP2R1 kod zdravih ispitanika i obolelih od multiple skleroze

Genotip polimorfizma	Kontrole n (%)	Pacijenti RR+SP n (%)
CYP2R1	171	181
GG	71(41,52)	88 (48,62)
GA	75 (43,86)	76 (41,99)
AA	25 (14,62)	17 (9,39)

Tabela 8. Učestalost rs2282679 genotipova VDB (GC) kod zdravih ispitanika i obolelih od multiple skleroze

Genotip polimorfizma	Kontrole n (%)	Pacijenti RR+SP n (%)
VDB	172	184
TT	88 (51,16)	91 (49,46)
TG	70 (40,70)	80 (43,48)
GG	14 (8,14)	13 (7,07)

Nije evidentirana statistički značajna razlika u učestalosti genotipova između kontrolne grupe i pacijenata.

Ni jedan ispitivani polimorfizam nije pokazao statistički značajnu povezanost sa oboljevanjem od MS izraženu kao odnos šansi, OR (*engl.* Odds Ratio), sa intervalom pouzdanosti 95% ($\pm 95\%$ CI, *engl.* Confidence Interval), tabela 9.

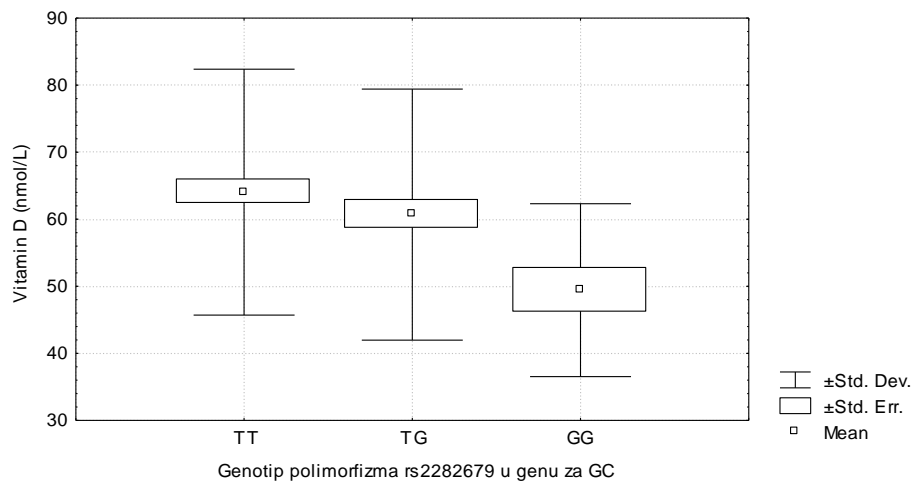
Tabela 9. Asocijacija ispitivanih polimorfizama sa oboljevanjem od MS

Genotip	OR ($\pm 95\%$ CI)	p
CYP2R1 (rs10741657)	0,77 (0,56-1,06)	2,57
VDB (rs2282679)	1,07 (0,76-1,51)	0,15
Fok I (rs2228570)	0,90 (0,65-1,25)	0,38

Asocijacije ispitivanih polimorfizama sa serumskim vrednostima vitamina D

Polimorfizam rs10741657 u genu za CYP2R1 nije u značajnoj asocijaciji sa vrednostima 25(OH)D kod ispitanika kontrolne grupe. Genotip GG polimorfizma rs2282679 u genu za GC (VDB) je značajno asociiran sa nižim vrednostima 25(OH)D ($p < 0,01$) kod zdravih ispitanika (grafikon 7) dok kod pacijenata sa MS nije evidentirana statistički značajna asocijacija ($p = 0,36$). Dobijene vrednosti rs2228570 (Fok I) nisu pokazale značajnu asocijaciju sa vrednostima 25(OH)D.

Grafikon 7. Povezanost rs2282679 sa vitamin D statusom kod zdravih ispitanika



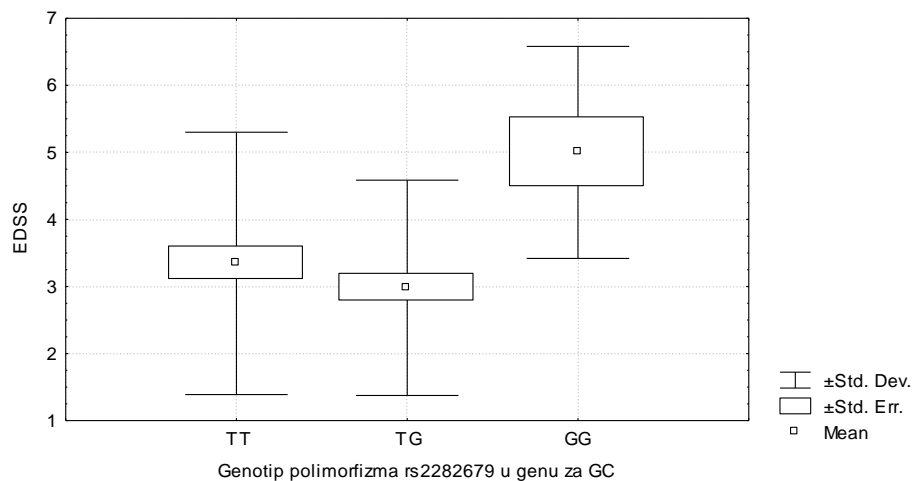
Primenom multivarijantne regresione analize evidentirano je da na vrednosti serumskog 25(OH)D statistički značajno utiču pol ($p < 0,01$), starost ispitanika ($p < 0,001$) i rs2282679 VDB polimorfizam ($p < 0,01$) u grupi zdravih ispitanika, dok je u grupi pacijenata evidentirana samo statistički značajna obrnuta proporcionalnost sa starošću pacijenata.

Asocijacije ispitivanih polimorfizama sa kliničkim karakteristikama

Rezultatima ove studije nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u učestalosti genotipova ispitivanih polimorfizama između grupa RRMS i SPMS.

Genotip GG polimorfizma rs2282679 u genu za GC (VDB) značajno je asociran sa težinom kliničke slike izraženu EDSS skalom ($p < 0,05$), dok druga dva polimorfizma nisu ukazivala na ovu povezanost (grafikon 8). Ni jedan ispitivani polimorfizam nije pokazivao asocijaciju sa starošću na početku bolesti.

Grafikon 8. Asocijacija polimorfizma rs2282679 sa stepenom neurološke onesposobljenosti



DISKUSIJA

Genetski faktori igraju značajnu ulogu u oboljevanju od MS. U poredjenju sa nesrodnim pojedincima, biološki srodnici prvog reda kod obolelih od MS pokazuju 20 do 40 puta veći rizik za nastanka bolesti Ebers i sar. (123). Sa druge strane, 70% monozigotnih blizanačkih parova su diskordantni za MS što ukazuje da nasledni geni sklonosti MS nisu dovoljni za razvoj oboljenja (124). Opšte je prihvaćeno da MS nastaje kod genetski predisponiranih osoba nakon izlaganja organizma više od jednog nepovoljnog faktora životne sredine. Iz ovoga proizilazi da se MS može prevenirati ukoliko se ovi faktori identifikuju i izbegavaju, naročito kod genetski predisponiranih osoba. Ovakvo razmišljanje postavlja zadatak istraživanjima u oblasti MS: 1. odrediti koji su geni ili njihove varijacije i u kojoj kombinaciji predisponirajući faktori u nastanku MS i 2. koji rizični faktori okruženja kod ovakvih individua doprinose nastanku oboljenja.

Vitamin D se smatra jednim od značajnih faktora okruženja povezanih sa oboljevanjem od MS. Veliki broj studija nalazi da su nivoi vitamin D kod pacijenata sa MS sniženi. Pierrot-Deseilligny i Souberbielle (125) ukazuju da su pacijenti sa MS generalno u stanju vitamin D insuficijencije bilo da se kao tačka preseka uzima vrednost od 50 ili 75nmol/l i to posmatrano od najranijih stadijuma bolesti (klinički izolovani sindrom CIS) što podkrepljuju rezultatima većeg broja studija sprovedenih na različitim geografskim lokacijama širom sveta (tabela 10):

Tabela 10. Vrednosti serumskog 25(OH)D kod pacijenata u do sada objavljenim studijama

Studija	Zemlja(region)	Starost	Broj ispitanika	Vit D (nmol/l)	MS forma
Smolders i sar. [2008]	Holandija (Maastricht)	ND	126	72 ± 31	RRMS
Hiremath i sar. [2009]	USA (Baltimore)	42 ± 13	199	71 ± 39	CIS, RRMS, SPMS
Kragt i sar. [2009]	Holandija (Amsterdam)	45 ± NA	103	59 ± 25 (Z), 97 ± 34 (L)	RRMS, SPMS
Mowry i sar. [2010]	USA (San Francisko i New York)	15 ± 3	110	55 ± 22	CIS, RRMS
Pierrot-Deseilligny i	Francuska (Pariz region)	36 ± 12	32	45 ± 16	CIS

Souberbielle [2010]					
Shaygannejad i sar. [2010]	Iran (Isfahan)	36 (15–55)	50	48 ± ND	RRMS
Simpson i sar. [2010]	Australia (Tasmania)	44 ± 10	145	42 ± ND (Z), 74 ± ND (L)	RRMS
Banwell i sar. [2011]	Kanada (više centara)	9.5 ± 4.5	302	63 ± 28	CIS
Dabbaghmanesh i Yousefipour [2011]	Iran (Shiraz)	35 ± 8	82	55 ± 54	RRMS, SPMS
Lonergan i sar. [2011]	Irska (3 centra)	46 (21–80)	329	38 (13–161)	RRMS, SPMS
Neau i sar. [2011]	Francuska (Poitiers region)	46 ± 23	170	46 ± 23	RRMS, SPMS
Steffensen i sar. [2011]	Norveška (Tromsø)	39 (21–50)	35	55 ± 29	RRMS
Yildiz i sar. [2011]	Švajcarska (St. Gallen)	38 ± 10	80	57 ± 29	RRMS
Bäärnhelm i sar. [2012]	Švedska (Stockholm)	39 ± 10	1013	63 ± ND	RRMS
Kampmann i sar. [2012]	Norveška (Tromsø)	40 (21–50)	35	48 (20–120)	RRMS
Kirbas i sar. [2012]	Turska (Rize)	ND (18–40)	30	67 ± 35	RRMS
Løken-Amsrud i sar. [2012]	Norveška (više centara)	39 (19–58)	88	67 (26–121)	RRMS
Moen i sar. [2012]	Norveška (Oslo)	ND	99	68 ± 24	CIS, RRMS
Pierrot-Deseilligny i sar. [2012]	Francuska (Pariz region)	39 ± 10	156	49 ± 22*	RRMS
Runia i sar. [2012]	Holandija (Rotterdam)	39 (19–55)	73	69 ± ND	RRMS
Šaltyte. Benth i sar. [2012]	Norveška (više centara)	39 (19–48)	92	68 ± 26	RRMS
Soilu-Hänninen i sar. [2012]	Finska (Turku)	39 (22–53)	66	54 (19–82)*	RRMS
Triantafyllou i sar. [2012]	Grčka (Atina)	39 ± 10	119	62 ± 25	RRMS

*Pre vitamin D suplementacije.

ND nije dostupno; L leti; Z zimi.

Rezultati naše studije su u saglasnosti sa objavljenim rezultatima jer su evidentirane vrednosti nivoa 25(OH)D u grupi pacijenata obolelih od MS pokazale da su oboleli u stanju vitamin D insuficijencije bilo da se kao donja granica vrednosti serumskog 25(OH)D uzima vrednost od 50nmol/l (20ng/ml) ili 75nmol/l (30ng/ml) ili čak stanju vitamin D deficijencije odnosno hipovitaminoze prema kriterijumu WHO.

Ovom studijom evidentirano je da su vrednosti 25(OH)D su u grupi obolelih bile statistički značajno niže od vrednosti u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika. Nekoliko navedenih studija imale su i kontrolnu grupu ali poredjenjem sa pacijentima obolelih od MS nije uvek evidentirana statistički značajna razlika u vitamin D serumskim nivoima izmedju grupa. Nedostatak razlike u odnosu na zdrave ispitanike Pierrot-Deseilligny i Souberbielle posmatraju kao “sekundarno uslovljenu” činjenicom da je većina kontrolnih “normalnih” subjekata takodje u stanju više ili manje izražene insuficijencije pa se zbog toga moguća uloga vitamin D statusa u bilo kojoj bolesti, uključujući MS, mora interpretirati u konjukciji sa delovanjem drugih faktora okruženja ili genetskih faktora rizika koji interaguju sa ovim statusom.

Nekoliko studija u Finskoj (126,127), Irskoj (128) i Australiji (129) takodje su raportirale nedostatak razlike u koncentracijama 25(OH)D izmedju MS i MS ne zhvaćenih osoba. Druge studije su observirale niske 25(OH)D u MS pacijenata (130,131). Ovi konfliktni nalazi mogu biti posledica regionalnih razlika, razlika u primenjenim esejima ili dizajnu studije uključujući i stadijum bolesti.

Insuficijencija vitamin D je česta u opštoj populaciji. Medjutim, karakteristike vitamin D fiziologije, efekat geografske širine, klimatskih i multiplih socijalnih faktora vezanih za vitamin D sintezu rezultiraju u insuficijenciji ovog vitamina kod većine ljudi koji žive iznad 40te paralele, kao što je to slučaj u Evropi, severnim delovima USA, Kanada i bivšem Sovjetskom savezu na severnoj hemisferi kao i Novom Zelandu i Tasmaniji na južnoj (132,133). U ovim zemljama je prema istim autorima 25(OH)D nivo kod “normalnih” adulta 40 do 70 nmol/l sa samo blagim sezonskim razlikama te je u najvećem delu godine 75% ljudi u stanju insuficijencije vitamina D za vrednost 25(OH)D od 75nmol/l a oko 50% za graničnu vrednost od 50nmol/l. U tropskim i subtropskim zemljama vitamin D nivoi su generalno viši. Vrednosti serumskog 25(OH)D medju zdravim ispitanicima u našem ispitivanju takodje nalaze prisutnost vitamin D insuficijencije ukoliko se kao granična vrednost uzima 75nmol/l što je takodje u saglasnosti sa

rezultatima ranijih studija imajući u vidu da su naši ispitanici bili sa teritorije Srbije koja se nalazi između između $41^{\circ}53'$ i $46^{\circ}11'$ stepeni severne geografske širine.

Vrednosti vitamin D statusa imaju tendenciju opadanja tokom trajanja bolesti. Neki od mogućih objašnjenja za to mogu biti da Uthoff-ov fenomen pojedine pacijente navodi da spontano izbegavaju izlaganje suncu i udruženoj toploti. Onesposobljenost takodje smanjuje aktivnosti u spoljnoj sredini a vitamin D je snižen i kod starih osoba. Veći broj studija (130,131, 133, 134) nalazi da serumski nivoi vitamina D opadaju tokom bolesti i da su serumski nivoi manji kod sekundarno progresivne faze bolesti nego kod ranijih stadijuma oboljenja sa prosečnim koncentracijama u ovom stadijumu bolesti od oko 40nmol/l. Rezultati našeg ispitivanja ne odstupaju od ovih rezultata jer je evidentirano postojanje statistički značajno nižih vrednosti serumskog 25(OH)D kod pacijenata sa SPMS u odnosu na grupu pacijenata sa RRMS.

Odgovor na pitanje da li je razlog ovakvog opadanja vrednosti vitamin D tokom bolesti vezan za "reverznu uzročnost" prema Pierrot-Deseilligny i Souberbielle, gde pogoršanje samog oboljenja dovodi do pogoršanja inicijalne insuficijencije vitamina D, ili je sniženje vrednosti vitamina D uzročno vezano sa daljim pogoršanjem samog oboljenja mogu, dati populacione studije kod kojih će vrednosti serumskih 25(OH)D biti određivane na velikom broju zdravih individua koje će u kasnijem periodu biti praćene u pravcu eventualnog razvoja bolesti. Pri tome svakako treba imati u vidu da i u najranijim fazama bolesti često postoji značajna hipovitaminoza D koja može biti uzrok "okidanja" oboljenja. U vezi sa ovim pristupom značajni su nalazi studije sprovedene među Američkim vojnim osobljem (112) čiji su serumski uzorci uzimani od tada zdravih ispitanika i skladiřani, a onda ponovo uzimani nakon kasnije identifikacije oboljevanja od MS i komparirani sa grupom nebolelog osoblja. Rezultati 257 obolelih komparirani su sa 514 kontrola. Kako je većina učesnika imala tri krvna uzorka pre početka oboljenja kao i nalaz nakon oboljevanja, postojala je mogućnost da se pokaže da 25(OH)D nivoi opadaju i nakon ustanovljavanja dijagnoze bolesti što može ukazivati na izmenu stila života kao posledica oboljenja a ne samo kauzalne veze sa MS rizikom. U istoj studiji je medjutim evidentirano da među ispitanicima bele rase postoji 60% sniženja rizika oboljevanja od MS za one koji su u najvišem kvintilu 25(OH)D od preko 99,1nmol/l u poredjenju sa onima koji su u najnižem kvintilu (15,2-63,2nmol/l) u skladu sa vrednostima 25(OH)D pre evidentiranja oboljenja. Ova asocijacija se pokazala nezavisnom od stepena geografske širine. Takodje je nadjeno da (uzimanjem a priori taćaka preseka) postoji 50% redukcije rizika oboljevanja kod

ispitanika sa serumskim vrednostima većim od 100nmol/l u odnosu na one sa manjim od 75nmol/l. Nije nadjena razlika izmedju uticaja vrednosti 25(OH)D na rizik oboljevanja medju polovima, kako je ranije sugerisano eksperimentalnim animalnim modelom što je, prema autorima, možda uslovljeno malim brojem ispitanica (74 žena u uzorku). Takodje, nije nadjena veza izmedju nivoa 25(OH)D i rizika oboljevanja kod Afro-Amerikanaca, premda je većina njih imala inicijalne vrednosti 25(OH)D preko 74nmol/l pa je ukupni zaključak studije bio da je protektivni učinak vitamin D prisutan samo medju ispitanicima bele rase i to onih sa najvišim kvintilom 25(OH)D, što dalje ukazuje na potrebnu protektivnu granicu od oko 100nmol/l. Takodje i studija Bäärnhielm i sar. (135) sprovedena medju 1013 MS i 1194 kontrole u Švedskoj nalazi da pacijenti sa 25(OH)D nivoom ispod 50nmol/l imaju povećan rizik za oboljevanje od MS (OR 1.4, 95% CI 1.2-1.7), kao i pacijenti sa nedovoljnim izlaganjem suncu pri čemu ni vrednosti 25(OH)D ni intenzitet izlaganja suncu ne pokazuju interakciju sa HLA-DRB1*15.

Rezultati našeg ispitivanja pokazuju statistički značajnu korelaciju koja je obrnuto proporcionalna izmedju starosti na početku bolesti i vrednosti 25(OH)D, dok dužina trajanja bolesti nije pokazivala povezanost sa nivoom vitamin D. Osim toga, niže vrednosti serumskog nivoa vitamina D pokazivale su korelaciju sa višim vrednostima EDSS što je bilo u skladu i sa evidentiranom statistički značajnom razlikom u prosečnim vrednostima 25(OH)D izmedju pacijenata sa SPMS i RRMS. Ovi rezultati odgovaraju nalazima Australijske studije koja je našla trend za verovatnoću 25(OH)D insuficijencije samo medju pacijentima sa EDSS preko 3 (129).

Vreme u kojem vitamin D i UVB zračenje postaje protektivni faktor u nastanku MS takodje je predmet stručnih rasprava. Prema većini autora, ovaj se efekat odnosi na prvi deo života do ranog adultnog perioda (Pierrot-Deseilligny i Souberbielle) uglavnom na osnovu migracionih epidemioloških studija ili studija baziranih na upitnicima kojima je procenjivana količina vremena provedena van kuće tokom praznika i vikenda unutar prve dve dekade života (136,137,138) uključujući i iste takve studije medju parovima monozigotnih blizanaca (139). Patogenetski je pretpostavljeno da je relativno duga protekcija vitamin D statusom u periodu prvog dela života od kritički važnog značaja za sazrevanje timusa i imunog sistema (140). Ovakvo razmišljanje povelu je istraživače i korak dalje pa je studijama meseca rođenja i vitamin D statusa majki tokom trudnoće nalažena i veza sa intrauterinim vitamin D statusom (141,142).

Iako se vitamin D i njegov adekvatan telesni sadržaj smatraju protektivnim faktorom okruženja, nivo 25(OH)D kao njegove relevantne mere u organizmu nije isključivo vezan za

spoljašnje uticaje. Studija (143) ispitujući vrednosti 25(OH)D medju 310 monozigotnih i 200 dizigotnih blizanaca muškog pola nalazi da je oko 70% varijacije 25(OH)D tokom zime objašnjivo genetskim faktorima, dok je leti 53% varijacije bilo posledica faktora okruženja te je zaključak da su serumske koncentracije 25(OH)D visoko nasledne tokom zime dok leti stanje okruženja (na primer izlaganje suncu) odnosi prevagu nad genetskim faktorima u određivanju serumskih koncentracija 25(OH)D. Do sličnih zaključaka dolazi ispitivanje (144) sprovedeno na 40 monozigotnih i 59 dizigotnih parova blizanaca konkordantnih i diskordantnih sa MS. Nadjeno je da je nivo 25(OH)D u visokoj korelaciji u MS konkordantnim parovima ali nije značajno udružen sa samim oboljevanjem. Korelacija za 25(OH)D bila je značajno veća u monozigotnim parovima i veća zimi pa je zaključeno da postoji značajan genetski uticaj na regulaciju sezonske vrednosti 25(OH)D koncentracija kod MS blizanaca.

Rukovodeći se rezultatima GWAS studija Ahn i sar. (79) analizirali smo uticaj dva genetska polimorfizma gena uključenih u metabolizam vitamin D za koje je pomenutim ispitivanjem utvrđeno da su asocirani sa vrednostima serumskog 25(OH)D. Da bi se izbegao uticaj sezonski ekstremnih varijacija vrednosti serumskog 25(OH)D svi ispitanici su uzorkovani tokom dva meseca na početku leta. Prema rezultatima našeg ispitivanja, kod zdravih ispitanika je prisustvo GG genotipa rs2282679 gena za VDB (GC) značajno koreliralo sa nižim vrednostima 25(OH)D.

Povezanost ovih polimorfizama sa nivoom 25(OH)D ispitivana je i od strane drugih autora. GWAS studija Wang i sar. (145) nalaze povezanost CYP2R1 rs10741657 i GC rs2282679 sa nivoom 25(OH)D. U radu Robien i sar. (146) opisuju da je medju ispitivanom jugoistočnom Azijskom populacijom u Singapuru srednja koncentracija 25(OH)D bila 68,8nmol/l i da su vrednosti 25(OH)D statistički značajno pozitivno korelirale sa svim ispitivanim polimorfizmima vezanim za vitamin D metabolizam (CYP2R1 rs10741657, rs12794714, rs1993116; CYP3A4 rs2242480; i GC rs4588, rs7041, rs16847015, rs2298849). Isti autori medjutim navode da je većina pacijenata (86%) imala koncentracije 25(OH)D preko 50nmol/l što je prema njima u skladu sa preporukama Medicinskog instituta SAD od 2011 a da je 32% imalo koncentracije preko 75nmol/l za koje se smatra da su potrebne za šire zdravstvene efekte. Studija Trummer i sar (147) potvrđuje da koncentracije 25(OH)D mogu biti predviđene GC genotipom rs2282679 i CYP2R1 genotipom rs10741657.

Genetski uticaji na vrednosti serumskog 25(OH)D evidentirani su i studijama pacijenata obolelih od MS. Studija Simon i sar 2011 (83), polazeći od pretpostavke da rizik od MS opada sa porastom vrednosti 25(OH)D analizira da li pojedinci koji nose genetsku varijantu koja je prediktor visokih 25(OH)D nivoa imaju manji rizik od oboljevanja od MS. Analizom 1655 pacijenata i 6349 kontrola nalazi da su SNP u GC regionu bili prediktori nivoa 25(OH)D ali ne i MS rizika, dok su SNP "A" aleli CYP2R1 (rs10741657) bili udruženi sa povećanjem 25(OH)D i nesignifikantno sa MS rizikom ali kod HLADR15 negativnih individua. U rezultatima našeg ispitivanja međutim, evidentirano je samo da pacijenti sa GG genotipom rs2282679 gena za VDB pokazuju niže vrednosti 25(OH)D ali bez statistički značajne razlike, verovatno zbog toga što su vrednosti vitamin D generalno bile manje kod grupe obolelih u odnosu na grupu zdravih ispitanika.

Uloge koje vitamin D ostvaruje dejstvom na VDR u organizmu su brojne. U studiji Ramagopalan i sar. (67) stimulacijom kalcitriolom identifikovano je 2776 genomskih pozicija na koje utiče VDR i 229 gena sa značajnim izmenama u ekspresiji kao odgovor na D hormon. Najveći broj VDR vezujućih mesta bio je u blizini autoimunih i kancer udruženih regiona identifikovanih GWAS studijama. Analizom GWAS intervala bolesti i karakterističnih osobina, u studiji je evidentirano značajno veće vezivanje za VDR u genskim lokusima udruženim sa pojavom MS, diabetes tip I, Chron-ovom bolesti, sistemskim lupus eritematodes, reumatoidnim artritismom, hroničnom limfocitnom leukemijom, kolorektalnim kancerom, bojom kose, preplanulosti i visine. U istoj studiji evidentirano je i značajno veće VDR vezivanje u genima koji su različito eksprimirani u poredjenju sa kontrolama za sve MS forme: primarno progresivna MS 1,9 puta veće, $P < 0.0001$; sekundarno progresivna MS, 2,3 puta veće $P < 0.0001$; relapsno remitentna MS, 2,4 puta veće $P < 0.0001$. Radi se o genima koji su u prethodnim studijama sa određivanjem mRNA transkriptoma kod pacijenata sa različitim formama MS bili različito eksprimirani u odnosu na kontrole: transkripcioni geni T ćelija, geni translacione regulacije, oksidativne fosforilacije, imune sinapse i antigen prezentacije.

Studija (148) nalazi povezanost i Fok I VDR genotipa sa vrednostima 25(OH)D u smislu statistički značajno nižih serumskih koncentracija 25(OH)D medju pojedincima sa ff nasuprot FF genotipu. Rezultati našeg ispitivanja ne potvrđuju ovakve nalaze jer prisustvo rs2228570 polimorfizama (Fok I) VDR gena nije pokazalo statistički značajnu asocijaciju sa vrednostima

25(OH)D. Slične nalaze pokazuju i studije blizanaca obolelih od MS gde je udruženost Fok I SNP i vrednost 25(OH)D bila neznatno ispod signifikantnosti (148).

Sa druge strane, interakcija Fok I genotipa sa vitamin D funkcijom se na završava samo na njegovom uticaju na ukupni serumski sadržaj. Fok I polimorfizam restrikcione dužine fragmenta je lociran u kodirajućem regionu VDR gena tako da f alel rezultira u produkciji VDR proteina koji je tri aminokiseline duži i funkcionalno manje efektivan. Kraći VDR protein pokazuje veću biološku aktivnost od dužeg (149). Kraći VDR protein (protein divljeg tipa - FF) interaguje efikasnije sa transkripcionim faktorom TF IIB povećavajući transaktivaciju od strane VDR u poredjenju sa ff proteinom 1,7 puta (150) zbog čega se smatra da su celularne konsekvence ff genotipa slične onima sa nižim vitamin D statusom (148).

Ispitivani genetski polimorfizmi su rezultatima nekih dosadašnjih istraživanja pokazivali uticaj na rizik nastanka MS ili klinički tok i karakteristike bolesti. Studija Cox i sar 2012 (118) ispitala je uobičajene varijante VDR receptora u 1153 trio familije (oboleli potomak i oba roditelja) i 726 slučajeva i 604 kontrola. Iako ustanovljena interakcija nije bila statistički značajna, postojao je trend povećanja rizika od MS u pacijenata koji su bili homozigoti za HLA-DRB1*1501 alel u vezi sa aktivnijom formom VDR (Fok I). Autori su pretpostavili da je asocijacija izmedju uobičajenih varijacija VDR gena i MS slaba, ali da verovatno postoji veza izmedju polimorfizma VDR i rizika od MS koja je potencijalno modifikovana sa HLA-DRB1*1501. Studija Irizar i sar 2011 (119) analizirala je modulaciju udruženosti HLA-DRB1*1501 haplotipa sa VDR genskim varijantama i polom i našla da je veza HLA-DRB1*1501 sa MS specifičnija za ženski pol ali nije bilo udruženosti VDR i različitih tipova MS.

Rezultati naše studije nisu našli udruženost Fok I polimorfizma sa rizikom nastanka MS. Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima ispitivanja Orton i sar. (151) koji su, polazeći od postavke da je MS određena interakcijom izmedju gena i okruženja a posebno u pogledu adekvatnosti vitamin D statusa, analizirali uticaj 71 SNP četiri gena povezanih sa efektima vitamin D (VDR, CYP27B1, VDB, CYP24) kod 1364 MS pacijenata i 1661 njihovih nezahvaćenih rodjaka prvog stepena. Rezultati ove studije ne nalaze direktnu vezu izmedju gena uključenih u metabolizam vitamin D i sklonosti oboljevanju od MS.

Bliska veza između VDB (GC) nivoa i kliničkog toka bolesti MS nedavno je pokazana proteomičkim studijama (152). Ove studije su pokazale redukciju VDB nivoa u likvoru pacijenata sa CIS i RRMS tokom relapsa dok su povećani nivoi nadjeni u progresivnoj formi (153). Nije potpuno jasno da li je uloga VDB vezana samo za vitamin D vezujuću (transportnu) aktivnost jer je poznato da VDB ima različite imunomodulatorne efekte nezavisne od vitamin D vezivanja (154). Rezultati našeg ispitivanja ukazuju da je prisustvo GG varijante rs2282679 genotipa ovog gena značajno povezano sa težim kliničkim ispoljavanjem što nije evidentirano u do sada publikovanim radovima.

ZAKLJUČAK

1. Pacijenti oboleli od multiple skleroze sa relapsno remitentnim i sekundarno progresivnim oblikom oboljenja nalaze se u stanju vitamin D deficijencije.
2. Serumske koncentracije vitamina D značajno su niže kod obolelih od multiple skleroze u odnosu na zdravu populaciju iako je i kod kontrolne grupe zdravih ispitanika prisutno stanje vitamin D insuficijencije.
3. Pacijenti sa sekundarno progresivnom formom bolesti pokazuju značajno niže vrednosti vitamina D u odnosu na pacijente sa relapsno remitentnom formom bolesti.
4. Pacijenti sa kasnijim početkom bolesti imali su niže vrednosti vitamina D, dok dužina trajanja bolesti nije pokazala značajnu povezanost sa serumskim vrednostima vitamina D.
5. Pacijenti sa težim stepenom neurološke onesposobljenosti imali su niže vrednosti serumskog nivoa vitamina D.
6. Od ispitivanih genetskih faktora na vrednosti serumskog nivoa vitamina D značajno utiče prisustvo ređeg genotipa , GG, polimorfizma rs2282679 u genu za VDB kod grupe zdravih ispitanika.
7. Polimorfizmi rs2282679 gena za VDB, rs10741657 gena za CYP2R1 i rs2228570 gena VDR (*Fok I*) nisu značajno asocirani sa nivoom vitamina D kod pacijenata obolelih od MS.
8. Prisustvo ređeg genotipa, GG, polimorfizma rs2282679 u genu za VDB značajno je asocirano sa stepenom neurološke onesposobljenosti pacijenata sa multiplom sklerozom.
9. Polimorfizmi rs2282679 gena za VDB, rs10741657 gena za CYP2R1 i rs2228570 gena VDR (*Fok I*) nisu značajno asocirani sa rizikom oboljevanja od multiple skleroze.

LITERATURA

1. Bomfim IL. Investigation of genetic factors in multiple sclerosis. PhD Thesis. Division of neurology. Department of clinical neuroscience. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden 2009.
2. Pekmezović T. Epidemiologija multiple skleroze. U: Drulović J (urednik). Multipla skleroza. *Acta Clinica* 2011; 11(1): 39-49.
3. Kingwell K. Informing tactics to combat MS. Editorial. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: doi: 10.1038/nrneurol.2012.218.
4. Stuve O, Oksenberg J. Multiple Sclerosis Overview. Editors in: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2006 Jan 10.
5. Bompreszi R, Kovanen PE, Martin R. New approaches to investigating heterogeneity in complex traits. *J Med Genet*. 2003; 40(8):553-9.
6. Oksenberg JR, Hauser SL. Genetics of Multiple Sclerosis. In: Wolinski JS (ed) *Multiple Sclerosis*. 2005; 23(1): 61-75.
7. Dinčić E, Živković M. Geni i multipla skleroza. Beograd Calibris 2012.
8. Paraboschi EM, Soldà G, Gemmati D, Orioli E, Zeri G, Benedetti MD et al. Genetic Association and Altered Gene Expression of Mir-155 in Multiple Sclerosis Patients. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(12): 8695–712.
9. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann. Neurol*. 2007a;61:288–299.
10. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann. Neurol*. 2007b;61:504–513.
11. Pierrot-Deseilligny C. Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2009 Apr 28. [Epub ahead of print]
12. Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W. The Pathology of Multiple Sclerosis. In: Wolinski JS (ed) *Multiple Sclerosis*. 2005; 23(1): 77-105.
13. Lublin FD. Clinical Features and Diagnosis of Multiple Sclerosis. In: Wolinski JS (ed) *Multiple Sclerosis*. 2005; 23(1): 1-15.
14. Cruz M, Olsson T, Ernerudh J, Hojberg B, Link H. Immunoblot detection of oligoclonal anti-myelin basic protein IgG antibodies in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Neurology*. 1987;37(9):1515–19.
15. Warren KG, Catz I. Autoantibodies to myelin basic protein within multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neurol Sci*. 1993;115(2):169–176. doi: 10.1016/0022-510X(93)90221-J.
16. Greer JM, Pender MP. Myelin proteolipid protein: an effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *J Autoimmun*. 2008;31(3):281–287. doi: 10.1016/j.jaut.2008.04.018.
17. McLaughlin KA, et al. Age-dependent B cell autoimmunity to a myelin surface antigen in pediatric multiple sclerosis. *J Immunol*. 2009;183(6):4067–4076. doi: 10.4049/jimmunol.0801888.
18. Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific

- antibody mediation. *Ann Neurol.* 1999;46(2):144–160. doi: 10.1002/1531-8249(199908)46:2<144::AID-ANA3>3.0.CO;2-K.
19. O'Connor KC et al. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol.* 2005;175(3):1974–82.
 20. Banki K, et al. Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis. *J Exp Med.* 1994;180(5):1649–63. doi: 10.1084/jem.180.5.1649.
 21. van Noort JM, et al. The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature.* 1995;375(6534):798–801. doi: 10.1038/375798a0.
 22. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005;11(3):335–39.
 23. Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199(7):971–79. doi: 10.1084/jem.20031579.
 24. Hofstetter HH, Gold R, Hartung H-P. Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int MS J.* 2009; 16: 12-8.
 25. Lalive PH. Auto antibodies in inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Swiss Med Wkly* 2008; 138 (47-48): 692-707.
 26. Duddy M, Bar-Or A. B-cells in Multiple Sclerosis. *Int MS J.* 2006; 13: 84-90.
 27. Mesaroš Š, Drulović J. Dijagnoza multiple skleroze. U: Drulović J (urednik). *Multipla skleroza. Acta Clinica* 2011; 11(1): 17-27.
 28. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RE, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1965; 122: 552-68.
 29. Poser CM, Paty DW, Scheinberg LC, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol.* 1983; 13: 227-31.
 30. McDonald WI, Compson A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121-7.
 31. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 2005; 58(6):840-6
 32. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011 Feb;69(2):292-302. doi: 10.1002/ana.22366.
 33. Dalton CM, Brex PA, Miszkiel KA, et al. Application of the new McDonald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2002;52:47–53.
 34. CHAMPS Study Group. MRI predictors of early conversion to clinically definite MS in the CHAMPS placebo group. *Neurology.* 2002;59:998–1005.
 35. Barkhof F, Rocca M, Francis G, et al. Validation of diagnostic magnetic resonance imaging criteria for multiple sclerosis and response to interferon beta-1a. *Ann Neurol.* 2003;53:718–724.

36. Tintoré M, Rovira A, Rio J, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis. Application in first demyelinating episode. *Neurology*. 2003;60:27–30.
37. Savage DA, Bain SC, McKnight AJ et al. Gene discovery in diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep* 2007;7:139-145.
38. Schork N. J. Genetically complex cardiovascular traits: origins, problems, and potential solutions. *Hypertension* 1997; 29: 145–149.
39. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat. Genet.* 2001;27:234–236.
40. Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat. Genet.* 2007;39:7–15.
41. Pettersson FH, Anderson CA, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Marker selection for genetic case-control association studies. *Nat Protoc.* 2009; 4(5): 743–52.
42. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007;357(9):851–62. doi: 10.1056/NEJMoa073493.
43. Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat. Genet.* 2009;41:824–8.
44. De Jager PL et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009;41(7):776–782. doi: 10.1038/ng.401.
45. Oksenberg JR, Barcellos L.F, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O et al. Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 2004;74:160–7.
46. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A et al. Multiple Sclerosis Genetics Group; Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 2007;39:1083–91.
47. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007;357:851–62.
48. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447:661–78.
49. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2009;18:767–78.
50. Jovičić S, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Biohemija i metabolizam vitamina D. *J Med Biochem* 2012; 31: 309-15.
51. Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE, Gershwin ME. The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013 Jan 29. [Epub ahead of print]
52. Kurtzke JF. Geographic distribution of multiple sclerosis: an update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand* 1980;62:65–80.
53. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:182–191.
54. Strushevich N, Usanov SA, Plotnikov AN, Jones G, Park HW. Structural analysis of CYP2R1 in complex with vitamin D3. *J Mol Biol* 2008; 380: 96-106.

55. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Claire Simon K, McCullough ML, Gallicchio L et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(13): 2739–45.
56. Dawson-Hughes B., Heaney R., Holick M., Lips P., Meunier P., Vieth R. (2005) Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 16: 713–716.
57. Binkley N., Krueger D. (2008) Evaluation and correction of low vitamin D status. *Curr Osteoporos Rep* 6: 95–99.
58. Souberbielle J., Body J., Lappe J., Plebani M., Shoenfeld Y., Wang T., et al. (2010) Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev* 9: 709–715.
59. Charles Pierrot-Deseilligny, Jean-Claude Souberbielle. Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 2013 March; 6(2): 81–116. doi: 10.1177/1756285612473513.
60. Disanto G, Ramagopalan SV, Para AE, Handunnetthi L. The emerging role of vitamin D binding protein in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2011 Mar;258(3):353-8. doi: 10.1007/s00415-010-5797-8. Epub 2010 Nov 2.
61. Kew RR, Webster RO (1988) Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg. *J Clin Invest* 82:364–369.
62. Schneider GB, Benis KA, Flay NW, Ireland RA, Popoff SN (1995) Effects of vitamin D binding protein–macrophage activating factor (DBP-MAF) infusion on bone resorption in two osteopetrotic mutations. *Bone* 16:657–662.
63. Yamamoto N, Kumashiro R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. *J Immunol* 1993;151:2794–802.
64. Dick IM, Prince RL, Kelly JJ, Ho KK (1995) Oestrogen effects on calcitriol levels in post-menopausal women: a comparison of oral versus transdermal administration. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43:219–224.
65. Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gilden DH. Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 2004; 10:245–260.
66. Lin R., White J.H. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays.* 2004;26:21–8.
67. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, Burrell A et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution. *Genome res.* 2010; 20(10): 1352-60.
68. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr.* 2005;135:317–322.
69. Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 suppl):1706S-1709S.
70. Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clin Proc.* 2011; 86(1): 50-6
71. Krasowski MD. Pathology consultation on vitamin D testing. *Am J Clin Pathol.* 2011 Oct;136(4):507-14. doi: 10.1309/AJCPB50USETUOQDZ.
72. Carmi G, Amital H. The geoeidemiology of autoimmunity: capsules from the 7th international congress on autoimmunity ljubljana, slovenia, may 2010. *IMAJ* 2011; 13: 121–127

73. Kahana E, Zilber N, Abramson JH, Biton V, Leibowitz Y, Abramsky O. Multiple sclerosis: genetic versus environmental aetiology: epidemiology in Israel updated. *J Neurol* 1994; 241: 341-6
74. Goldacre MJ, Seagroatt V, Yeates D, Acheson ED. Skin cancer in people with multiple sclerosis: a record linkage study. *J Epidemiol Community Health*.2004; 58: 142-4
75. Shea MK, Benjamin EJ, Dupuis J, Massaro JM, Jacques PF, D'AgostinoRB, Sr. et al. Genetic and non-genetic correlates of vitamins K and D. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63:458–64.
76. Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr*. 2008;88:441–7.
77. Hunter D, De Lange M, Snieder H, MacGregor AJ, Swaminathan R, Thakker RV, Spector TD. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. *J. Bone Miner. Res*. 2001;16:371–8.
78. Shea MK, Benjamin EJ, Dupuis J, Massaro JM, Jacques PF, D'Agostino RB et al. Genetic and non-genetic correlates of vitamins K and D. *Eur. J. Clin. Nutr*. 2009;63:458–64.
79. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Claire Simon K, McCullough ML, Gallicchio L et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet*. 2010; 19(13): 2739–45.
80. Arnaud J., Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP) *Hum. Genet*. 1993;92:183–8.
81. Zhanga Y, Wangb X, Liuc Y, Qua H, Qua S, Wanga W, Ren L. The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese children. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13636.
82. Ramos-Lopez E, Bruck P, Jansen T, Herwig J, Badenhoop K. CYP2R1(vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2007;23:631–6.
83. Simon KC, Munger KL, Kraft P, Hunter DJ, De Jager PL, Ascherio A. Genetic predictors of 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2011 Sep;258(9):1676-82.
84. Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA. Determinants of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D₃ levels: the role of renal synthesis and catabolism of vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;90:111–3.
85. Deluca HF, Cantorna M. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001;15:2579–85.
86. Griffin MD, Lutz WH, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:701–8.
87. Penna D, Adorini L. Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000;164:2405–11

88. Adorini L. Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. *Cell Immunol* 2005; 233: 115–24.
89. Hewison M et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170: 5382–90.
90. Dong X et al. Regulation of RelB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16007–12.
91. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 275–306.
92. Lemire JM et al. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of T_H1 functions. *J Nutr* 1995; 125 (6 Suppl): 1704S–8S
93. Mattner F et al. Inhibition of T_H1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol* 2000; 30: 498–508.
94. Alroy I et al. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D₃: direct inhibition NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5789–99.
95. Cippitelli M and Santoni A. Vitamin D₃: a transcriptional modulator of the IFN- γ gene. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3017–30.
96. Mahon BD et al. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 922–32.
97. Chen S et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007; 179: 1634–47.
98. Penna G et al. Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol* 2006; 177: 8504–11.
99. Gregori S et al. Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945–53.
100. Penna G et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007; 178: 145–53.
101. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:7861-4.
102. Raghuwanshi A, Joshi SS, Christakos S. Vitamin D and multiple sclerosis. *J Cell Biochem*. 2008 Oct 1;105(2):338-43. doi: 10.1002/jcb.21858
103. Nashold FE, Hoag KA, Goverman J, Hayes CE. Rag-1-dependent cells are necessary for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2001 Sep 3;119(1):16-29
104. Cantorna MT, Humpal-Winter J, DeLuca HF. In vivo upregulation of interleukin-4 is one mechanism underlying the immunoregulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Arch Biochem Biophys*. 2000 May 1;377(1):135-8
105. Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6030-7
106. Mattner F, Smirollo S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL et al. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic

- encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol*. 2000 Feb;30(2):498-508
107. Kurtzke JF. Geography in multiple sclerosis. *J Neurol* 1977;215:1–26
 108. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol* 2008;194:7–17
 109. Nieves J, Cosman F, Herbert J, Shen V, Lindsay R. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in multiple sclerosis. *Neurology* 1994;44:1687–92.
 110. Ozgocmen S, Bulut S, Ilhan N, Gulkesen A, Ardicoglu O, Ozkan Y. Vitamin D deficiency and reduced bone mineral density in multiple sclerosis: effect of ambulatory status and functional capacity. *J Bone Miner Metab* 2005;23:309–13.
 111. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;62:60–5.
 112. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006; 296:2832– 8.
 113. van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, et al. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ* 2003; 327:316.
 114. van der Mei IA, Blizzard L, Ponsonby AL, Dwyer T. Validity and reliability of adult recall of past sun exposure in a case-control study of multiple sclerosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1538–44.
 115. Ascherio A, Munger KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. *Ann Neurol* 61:504–513).
 116. Simon KC, Munger KL, Kraft P, Hunter DJ, De Jager PL, Ascherio A. Genetic predictors of 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2011 Sep;258(9):1676-82. doi: 10.1007/s00415-011-6001-5. Epub 2011 Mar 23)
 117. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, et al. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 2009;5:e1000369.
 118. Cox MB, Ban M, Bowden NA, Baker A, Scott RJ, Lechner-Scott J. Potential association of vitamin D receptor polymorphism Taq1 with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012; 18(1):16-22.
 119. Irizar H, Muñoz-Culla M, Zuriarran O, Goyenechea E, Castillo-Triviño T, Prada A et al. HLA-DRB1*15:01 and multiple sclerosis: a female association? *Mult Scler*. 2012; 18(5): 569-77.
 120. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurol* 1983; 33(11): 1444.
 121. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR. Analysis of human Y chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:1245-1249.

122. Bid HK, Konwar R, Aggarwal CG, Gautam S, Saxena M, Nayak VL, Banerjee M. Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. *Indian J Med Sci.* 2009; 63:187-194.
123. Ebers GC, Dymant DA. Genetics of multiple sclerosis. *Semin Neurol.* 1998; 18: 295-9.
124. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, et al. A population-based twin study in multiple sclerosis. *New England J Med.* 1986; 315: 1638-42.
125. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2013; 6(2): 81–116 DOI: 10.1177/ 1756285612473513.
126. Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, Laitinen I, Eralinna JP, Lilius EM, Mononen I. A longitudinal study of serum 25-hydroxyvitamin D and intact parathyroid hormone levels indicate the importance of vitamin D and calcium homeostasis regulation in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:152–7.
127. Soilu-Hanninen M, Airas L, Mononen I, Heikkila A, Viljanen M, Hanninen A. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11:266 –71.
128. Barnes MS, Bonham MP, Robson PJ, et al. Assessment of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ concentrations in male and female multiple sclerosis patients and control volunteers. *Mult Scler* 2007;13:670 –2.
129. van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, et al. Vitamin D levels in people with multiple sclerosis and community controls in Tasmania, Australia. *J Neurol* 2007;254:581–90.
130. Nieves J, Cosman F, Herbert J, Shen V, Lindsay R. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in multiple sclerosis. *Neurology* 1994;44:1687–92.
131. Ozgocmen S, Bulut S, Ilhan N, Gulkesen A, Ardicoglu O, Ozkan Y. Vitamin D deficiency and reduced bone mineral density in multiple sclerosis: effect of ambulatory status and functional capacity. *J Bone Miner Metab* 2005;23:309 –13.
132. Holick M, Chen T, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology. *J Bone Mineral Res.* 2007; 2(Suppl. 2): V28–V33.
133. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J. Widespread vitamin D insufficiency: a new challenge for primary prevention with particular reference to multiple sclerosis. *Presse Médicale* 2011;40: 349–356.
134. Smolders J, Menheere P, Kessels A, Damoiseaux J, Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008; 14: 1–5.
135. Bäärnhielm M, Hedström AK, Kockum I, Sundqvist E, Gustafsson SA, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen-DRB1*15. *Eur J Neurol.* 2012 Jul;19(7):955-62. doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03650.x. Epub 2012 Jan 31.

136. Kampman M, Wilsgaard T, Mellgren S. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol*. 2007; 254: 471–477.
137. Dwyer T, van der Mei I, Ponsonby A, Taylo B, Stankovich J, McKay J. et al. Melanocortin 1 receptor genotype, past environmental sun exposure, and risk of multiple sclerosis. *Neurology*. 2008; 71: 583–589
138. Sloka J, Pryse-Phillips W, Stefanelli M. The relation of ultraviolet radiation and multiple sclerosis in Newfoundland. *Can J Neurol Sci*. 2008; 35: 69–74.
139. Islam T, Gauderman W, Cozen W, Mack T. Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology*. 2007; 69: 381–388.
140. Tulic M, Andrews D, Crook M, Charles A, Tourigny M, Moqbel R. et al. Changes in thymic regulatory T-cell maturation from birth to puberty: differences in atopic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 199–206.
141. Disanto G, Magalhaes S, Handel A, Morrison K, Sadovnick A, Ebers G. et al. HLA-DRB1 confers increased risk of pediatric-onset MS in children with acquired demyelination. *Neurology*. 2011; 76: 781–6.
142. Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan S. The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; 18: 1522–8.
143. Karohl C, Su Sh, Kumari M, Tangpricha V, Veledar E, Vaccarino V, Raggi P. Heritability and seasonal variability of vitamin D concentrations in male twins. *Am J Clin Nutr* December. 2010; 92 (6): 1393-8.
144. Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88 (2): 441-7.
145. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 2010 Jul 17;376(9736):180-8. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60588-0. Epub 2010 Jun 10.
146. Robien K, Butler LM, Wang R, Beckman KB, Walek D, Koh WP, Yuan JM Genetic and environmental predictors of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations among middle-aged and elderly Chinese in Singapore. *Br J Nutr*. 2012 May 15:1-10.
147. Trummer O, Pilz S, Hoffmann MM, Winkelmann BR, Boehm BO, März W et al. Vitamin D and mortality: a Mendelian randomization study. *Clin Chem*. 2013; 59(5): 793-7. doi: 10.1373/clinchem.2012.193185. Epub 2013 Jan 14.
148. Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:441–7.
149. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Haussler CA, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;177:145–59.

150. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, et al. The polymorphic N-terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interactions with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol.* 2000;14:401–20.
151. Orton SM, Ramagopalan SV, Para AE, Lincoln MR, Handunnetthi L, Chao MJ, et al. Vitamin D metabolic pathway genes and risk of multiple sclerosis in Canadians. *J Neurol Sci.* 2011 Jun 15;305(1-2):116-20. doi: 10.1016/j.jns.2011.02.032. Epub 2011 Mar 26.
152. Bradl M, Lassmann H. Progressive multiple sclerosis. *Semin Immunopathol.* 2009; 31: 455–465.
153. Disanto G, Ramagopalan S, Para A, Handunnetthi L. The emerging role of vitamin D binding protein in multiple sclerosis. *Journal of Neurology.* 2011; 258: 353–8.
154. Roussel BD, Macrez R, Jullienne A, Agin V, Maubert E, et al. Age and albumin D site-binding protein control tissue plasminogen activator levels: neurotoxic impact. *Brain.* 2009; 132: 2219–30.

ZNAČAJ NIVOVA VITAMINA D I POLIMORFIZAMA GENA POVEZANIH SA NJEGOVIM DELOVANJEM KOD OBOLELIH OD MULTIPLE SKLEROZE

Sažetak

Multipla skleroza predstavlja oboljenja od koga prema nekim procenama boluje oko 2,5 miliona ljudi širom sveta i koje predstavlja jedan od najčešćih netraumatskih uzroka neurološke onesposobljenosti među mladim odraslima. Multipla skleroza predstavlja kompleksnu bolest za čiju pojavu je neophodno sadejstvo genetskih faktora i faktora sredine. Među faktorima sredine koji se dovode u vezu sa oboljevanjem od ove bolesti posebno se ističe vitamin D.

Ciljevi ove studije bili su određivanje nivoa vitamina D kod obolelih od multiple skleroze i komparacija sa populacijom zdravih ispitanika sa procenom njegovog značaja u nastanku oboljenja. Određivani su genetski faktori povezani sa nivoom vitamina D posebno pojedinačni nukleotidni polimorfizmi rs2282679 gena za vitamin D vezujući protein i rs10741657 gena mikrozomalnog enzima CYP2R1, kao i pojedinačni nukleotidni polimorfizam FokI (rs2228570) gena VDR.

Rezultati ispitivanja utvrdili su postojanje insuficijencije vitamina D kod obolelih ali i kod zdravih ispitanika uz značajno niže vrednosti među grupom obolelih. Polimorfizmi rs2282679 gena za vitamin D vezujući protein pokazali su značajnu povezanost sa nivoom vitamina D kod zdravih ispitanika. Vrednosti nivoa vitamina D korelirale su sa stepenom onesposobljenosti ispitivanih pacijenata i formom oboljenja (sekundarno progresivna u odnosu na relapsno remitentnu). Ni jedan ispitivani polimorfizam nije značajno povećavao rizik oboljevanja od multiple skleroze.

Evidentirana insuficijentnost vitamina D u ukupnoj populaciji može predstavljati cilj preventivnih mera u ovoj oblasti, u smislu suplementacije ovog esencijalnog dijetetskog produkta, posebno ako se ima u vidu povezanost sa stepenom neurološke onesposobljenosti. Utvrđena asocijacija ispitivanih genetskih polimorfizama sa nivoom vitamina D u organizmu može poslužiti kao sredstvo za određivanje ciljne grupe na koju bi ove preventivne mere bile usmerene. Rezultati ovog ispitivanja predstavljaju još jedan element u razumevanju ove kompleksne i nedovoljno shvaćene bolesti.

THE IMPORTANCE OF VITAMIN D LEVELS AND GENE POLYMORPHISMS RELATED WITH ITS ACTING IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Summary

Multiple sclerosis is disease which affect 2,5 million people worldwide and is one of the most frequent nontraumatic disabling neurological disorder among young adults. Multiple sclerosis is complex disease and so demands interaction between genetic and environmental factors. Among the environmental factors vitamin D has specific importance.

The aims of this study were estimating the vitamin D levels in multiple sclerosis patients and comparing with healthy individuals to estimate their importance in disease originate. We determinate single nucleotide polymorphisms rs2282679 for the vitamin D binding protein gene and rs10741657 for microsomal enzyme CYP2R1 gene and single nucleotide polymorphysm FokI (rs2228570) for vitamin D receptor gene.

Our results showed vitamin D insuffitiention in both groups with significantly lower values in multiple sclerosis group. Polymorphism rs2282679 for the vitamin D binding protein gene gene showed significant connection with vitamin D levels in healthy pepole. Vitamin D levels correlated with the degree of disability in patients group and disease type (secondary progressive versus relapsing - remitting). No one polymorphysm showed increasing the risk fom multiple sclerosis.

Vitamin D insuffitiention in whole population could be the aim for preventive acting, by supplementation of this essential dietetic product, especially according to its connection with the degree of neurological dysability. Established association between certain polymorphisms and vitamin D levels could be means in establishing the aiming group for prevetive treatment. These study results represents one more piece in understanding this complex and underestimated disease.

CURRICULUM VITAE

Лични подаци	
Презиме и име кандидата	Dejan Savić
Датум рођења:	15.06.1973
Место рођења:	Ниш
Држављанство:	Српско
Кућна адреса:	Булевар Немањића 38/16, Ниш
телефон:	018 570 709
Е-маил:	dejanvelsavic@gmail.com
Адреса на послу:	КЦ Ниш, Булевар З.Ђинђића 48
телефон:	018 4233772
Место сталног боравка	Ниш
Образовање	
<i>Назив завршеног факултета:</i>	Медицински факултет у Нишу
Одсек:	Медицина
Година и место дипломирања:	1998, Ниш
<i>Назив специјализације:</i>	Неурологија
Научно подручје:	Демијелинизациона обољења
Назив специјалистичког рада:	
Година и место одбране:	2004, Ниш
Професионална каријера	
Назив и седиште факултета и универзитета на коме је кандидат биран у прво звање:	Медицински факултет у Нишу, Универзитет у Нишу

назив звања:	Асистент
назив уже научне области:	Неурологија
година избора:	2008
ПРЕГЛЕД О ДОСАДАШЊЕМ НАУЧНОМ И СТРУЧНОМ РАДУ	
Укупан број објављених радова:	65
Број радова објављених <i>ин ехтенсо</i> у међународним или водећим домаћим часописима са рецензијама и секундарном цитираношћу – индексацијом (укупно)	7
Учешће у научним пројектима	<p>Пројекат (13М09): Примена магнетне резонанце, МР спектроскопије и других техника у истраживању неуролошких и психијатријских поремећаја, Министарство науке и технологије Републике Србије.</p> <p>Подпројекат: Клинички и неурофизиолошки профил у корелацији са налазом магнетне резонанце код Паркинсонове болести, (1999-2000.), истраживач на пројекту</p>
Награде и признања:	Сребрни знак Универзитета у Нишу 1998