

**УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ АКАДЕМИЈЕ**

Тамара Анђелић

**ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА И
ВИТАМИНА Д У КРВИ КОД ОБОЛЕЛИХ ОД РЕЛАПСНО-РЕМИТЕНТНЕ
МУЛТИПЛЕ СКЛЕРОЗЕ**

докторска дисертација

Београд, 2021. године

**UNIVERSITY OF DEFENCE IN BELGRADE
MEDICAL FACULTY OF
MILITARY MEDICAL ACADEMY**

Tamara Andjelic

**SIGNIFICANCE OF THE DETERMINATION
OF OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND VITAMIN D IN THE BLOOD OF
RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Докторска дисертација је урађена у Институту за медицинску биохемију ВМА,
Институту за медицинска истраживања ВМА и на Катедри за биохемију
Фармацеутског факултета у Београду

МЕНТОР

Проф. др Драгана Обрадовић, Медицински факултет Војномедицинске академије,
Универзитет одбране, Београд

КОМЕНТОР

Проф. др Весна Мартић, Медицински факултет Војномедицинске академије,
Универзитет одбране, Београд

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Милица Нинковић, Медицински факултет Војномедицинске академије,
Универзитет одбране, Београд-председник комисије

Доцент др. Ивана Стевановић, Медицински факултет Војномедицинске академије,
Универзитет одбране, Београд

Проф. др Јелена Котур-Стевуљевић, Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду

Захвалница

Захваљујем се ментору, *проф. др Драгани Обрадовић*, на огромном труду, енергији и љубави које је уткала у сваки сегмент нашег рада. Захваљујем јој се што ми је заиста била, како је дефинисала менторство, „друга мама“ у свему. Беспрекоран пример људскости, стручности, храбрости и упорности. Иако више није са нама, остаће звезда водила неуролошког неба.

Коментору *проф. др Весни Мартић* се захваљујем на кооперативности, подстицању креативности и пруженој слободи у раду.

Проф. др Милицы Нинковић сам неизмерно захвална на бројним консултацијама, саветима и подршци током свих ових година израде докторске дисертације.

Захваљујем се *доценту др Ивани Стевановић* на пријатељском приступу и корисним сугестијама који су увек резултирали решењем проблема.

Проф. др Јелени Котур-Стевуљевић се захваљујем на добронамерним саветима, сталној доступности и невероватним статистичким решењима током израде ове докторске дисертације.

Посебну захвалност изражавам колегиницама и колегама са Института за медицинску биохемију ВМА, који су учинили да се свакодневна сарадња квалитетно спроводи у пријатељској атмосфери. Посебно се захваљујем пуковнику, *др сц. мед. Братиславу Дејановићу*, на људскости и континуираној подршци у свим процесима израде докторске дисертације.

Колективу Клинике за неурологију ВМА, као и колективу Института за медицинска истраживања ВМА сам захвална за свесрдну помоћ у спровођењу експерименталног дела докторске дисертације.

Пацијентима Клинике за неурологију ВМА, као и здравим испитаницима који су учествовали у овом истраживању се захваљујем јер без њих није било могуће спровести ово истраживање.

Оцу, Луки Анђелићу, мојој најснажнијој потпори, дугујем највећу захвалност за финализацију докторске дисертације.

Захваљујем се *супругу Зорану* на присуству током свих мојих одсуства.

Сестри Маји сам захвална на константној трансформацији немогућег у могуће.

И на крају, захваљујем се *мојим малим анђелима, Ивани и Луки*, који свему, па и овој докторској дисертацији дају смисао.

Тезу посвећујем сећању на проф. др Драгану Обрадовић

НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Значај одређивања параметара оксидативног стреса и витамина Д у крви код оболелих од релапсно-ремитентне мултипле склерозе

САЖЕТАК

Увод: Мултипла склероза (МС) представља хронично, прогресивно, аутоимунско обољење централног нервног система са карактеристикама инфламације, демијелинизације и неуродегенерације. Болест се јавља код генетски предиспонираних индивидуа, након излагања неповољним спољашњим факторима. Фактори ризика одговорни за настанак МС су ниво витамина Д, изложеност сунцу, пушење, вирусне инфекције и гојазност. Витамин Д се примењује као додатна терапија у третману МС због неуропротективне, имуномодулаторне, антиинфламаторне и антиоксидативне функције.

Најзаступљенија форма МС је релапсно-ремитентна форма болести која се манифестује акутним неуролошким нападом- релапсом, праћеним делимичним или потпуним опоравком- ремисијом. Утврђено је да је оксидативни стрес (ОС) од значаја у патогенези МС. Оксидативни стрес је стање неравнотеже између прооксидативних и антиоксидативних фактора, као последица прекомерног стварања слободних радикала и њиховог смањеног уклањања антиоксидансима.

Циљ: Циљ истраживања дисертације био је испитати ниво витамина Д и параметара ОС код оболелих од МС, како у релапсу, тако и у ремисији, као и утврдити међусобну интеракцију витамина Д и оксидативно-стресног статуса. Такође, циљ истраживања је био и испитати повезаност параметара ОС, вредности витамина Д и клиничких карактеристика болести.

Метод: У истраживању је учествовало 178 пацијената (61 у релапсу и 117 у ремисији) са дијагнозом релапсно-ремитентне МС и 80 здравих испитаника који су чинили контролну групу. Истраживање је планирано и спроведено према етичким принципима, у складу са Хелсиншком декларацијом.

Резултати: Оболели од МС имају значајно веће вредности нитрата и нитрита ($p < 0,001$), малондиалдехида ($p < 0,01$) и прооксидативно-антиоксидативног баланса ($p < 0,001$), а ниже концентрације протеинских продуката узнапредовале оксидације ($p < 0,001$) у поређењу са контролном групом. Концентрације интрацелуларних антиоксиданаса: супероксид-дизмутазе ($p < 0,001$), каталазе ($p < 0,01$) и феритина ($p < 0,05$) су веће код МС пацијената у односу на здраве испитанике. Вредности екстрацелуларних антиоксиданаса: параоксоназе 1 ($p < 0,001$), тоталног антиоксидативног статуса ($p < 0,001$), сулфхидрилних група ($p < 0,001$), укупног билирубина ($p < 0,01$), мокраћне киселине ($p < 0,01$) и трансферина ($p < 0,05$) су значајно ниже код оболелих од МС у поређењу са контролном групом. Концентрација витамина Д, након прилагођавања (енг. Adjustment) вредности услед суплементације витамином Д код МС пацијената, су значајно ниже код оболелих од МС у односу на здраве испитанике ($p < 0,05$). Параметри оксидативно-стресног статуса и концентрација витамина Д код МС пацијената током ремисије и релапса се не разликују. Витамин Д смањује малондиалдехид ($r = -0,282$; $p < 0,05$) и повећава нитрате и нитрите ($r = 0,289$; $p < 0,05$) код МС пацијената без суплементације витамином Д и смањује протеинске продукте узнапредовале оксидације ($\rho = -0,243$; $p < 0,01$) код МС пацијената који узимају витамин Д. Установљена је негативна корелација мокраћне киселине и дужине трајања МС ($\rho = -0,158$; $p < 0,05$) и укупног билирубина и учесталости релапса ($\rho = -0,188$; $p < 0,05$), као и позитивна корелација *MDA* и учесталости релапса ($\rho = 0,192$; $p < 0,05$).

Закључак: Оболели од МС су хронично експонирани оксидативном стресу, без обзира на клиничку фазу болести. Истовремено је документован нижи витамин Д у мултиплој склерози, без разлике у витамин Д вредностима током релапса и ремисије. Повишен интрацелуларни и

снижен екстрацелуларни антиоксидативни одговор у МС и доказан антиоксидативни капацитет витамина Д би требало применити као комплементарну терапијску опцију у третману ове комплексне болести.

Кључне речи: мултипла склероза, оксидативни стрес, релапс, ремисија, витамин Д, централни нервни систем

Научна област: медицинска биохемија

Ужа научна област: оксидативни стрес

DOCTORAL DISSERTATION TITLE

Significance of the determination of oxidative stress parameters and vitamin D in the blood of relapsing-remitting multiple sclerosis patients

ABSTRACT

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is chronic, progressive, autoimmune disease of the central nervous system, characterized by inflammation, demyelination and neurodegeneration. This disease appears at genetic susceptibility individuals after exposure to environmental risk factors. Environmental risk factors that contribute to the risk of MS are vitamin D levels, sun exposure, smoking, virus infection and obesity. Vitamin D is additional strategy in treating MS because of its neuroprotective, immunomodulatory, antiinflammatory and antioxidative effects.

The most common form of MS is relapsing-remitting multiple sclerosis, characterized by acute neurologic attack-relapse and followed by complete or partial recovery, known as remission. Accumulated evidence suggests that oxidative stress plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis. Oxidative stress is defined as an imbalance between the pro-oxidative and antioxidative factors, as a result of highly produced free radicals and decreased capacity of antioxidant mechanisms.

Aim: The aim of the present study was to analyze vitamin D and oxidative stress markers in MS patients, both in relapse and in remission. Also, to determine possible relationship among oxidative stress markers, vitamin D levels and clinical features of disease.

Methods: The study included 178 relapse-remitting MS patients (61 relapse/117 remission) and 80 healthy individuals in the control group. The study was planned and conducted according to the ethical principles and in accordance with the Helsinki declaration.

Results: The results of the study showed the significantly higher concentrations of nitrate and nitrite ($p < 0.001$), malondialdehyde ($p < 0.01$), and prooxidative-antioxidative balance ($p < 0.001$), with significantly lower levels of advanced oxidation protein products ($p < 0.001$) in MS patients compared to the control group. Levels of the intracellular antioxidants: superoxide-dismutase ($p < 0.001$), catalase ($p < 0.01$) and ferritin ($p < 0.05$) were higher in MS patients compared to the healthy individuals. From the other side, levels of the extracellular antioxidants: paraoxonase 1 ($p < 0.001$), total antioxidant status ($p < 0.001$), sulfhydryl groups ($p < 0.001$), total bilirubine ($p < 0.01$), uric acid ($p < 0.01$), and transferrine ($p < 0.05$) were significantly lower in multiple sclerosis patients compared to the control group. Because of the vitamin D supplementation in multiple sclerosis patients, vitamin D levels were adjusted and after comparing values between MS patients and healthy controls, significantly lower vitamin D concentrations were demonstrated in MS patients ($p < 0.05$). There were no differences between OS markers, or vitamin D concentrations in relapse and remission. Vitamin D decreased malondialdehyde ($r = -0.243$; $p < 0.05$) and increased nitrate and nitrite ($r = 0.289$; $p < 0.05$) in MS patients without vitamin D supplementations. Also, vitamin D decreased advanced oxidation protein products ($\rho = -0.243$; $p < 0.01$) in MS patients who used vitamin D supplementation. Uric acid negatively correlated with MS duration ($\rho = -0.158$; $p < 0.05$) and total bilirubine negatively correlated with annual relapse rate ($\rho = -0.188$; $p < 0.05$), while positive correlation was found between MDA and annual relapse rate ($\rho = 0.192$; $p < 0.05$).

Conclusion: MS patients are chronically exposed to high oxidative stress, no matter of clinical presentation of the disease. Also, lower vitamin D levels characterized multiple sclerosis, without differences in vitamin D levels during relapse and remission phases. Higher intracellular and lower

extracellular antioxidative effects with demonstrated vitamin D antioxidative capacity could be used as a complementary therapeutic strategy in treating this complex disease.

Key words: *multiple sclerosis, oxidative stress, relapse, remission, vitamin D, central nervous system*

Scientific field: *medical biochemistry*

Specific scientific field: *oxidative stress*

СКРАЋЕНИЦЕ

AGE- крајњи производи гликације протеина (енг. *Advanced Glycation End Product*)
AhR- арил хидрокарбон рецептор (енг. *Aryl Hydrocarbon Receptor*)
AOPP- протеински производи унапредовале оксидације (енг. *Advanced Oxidation Protein Products*)
АПЋ- антиген презентујуће ћелије
ARE- антиоксидативни зависни фактор (енг. *Antioxidant Response Element*)
ARR- број релапса по години (енг. *Annual Relapse Rate*)
AUC- површина испод криве (енг. *Area Under The ROC Curve*)
CAT- каталаза (енг. *Catalase*)
Ca- калцијум
CI- интервал поузданости (енг. *Confidence Interval*)
CMIA- хемилуминисцентно имуноодређивање на микрочестицама (енг. *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*)
COX₂- циклооксигеназа 2 (енг. *Cyclooxygenase 2*)
DMT- терапија која модификује природни ток болести (енг. *Disease Modifying Treatment*)
ЕАЕ- експериментални аутоимунски енцефалитис
EBV- Епштајн-Баров вирус (енг. *Epstein-Barr virus*)
EDSS- Проширена скала статуса онеспособљености (енг. *Expanded Disability Status Score*)
ELISA- ензимски имуноесеј (енг. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
FGF-23- фибробластни фактор раста 23 (енг. *Fibroblast Growth Factor*)
FoxO- транскрипциони фактор (енг. *Forkhead Transcription Factors*)
GPx- глутатион-пероксидаза (енг. *Glutathione Peroxidase*)
H₂O₂- водоник-пероксид
HKU- водоник-пероксид комплементарне јединице
HLA- хумани леукоцитни антиген (енг. *Human Leucocyte Antigen*)
HSCT- терапијска измена плазме (енг. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*)
IFN- интерферон (енг. *Interferon*)
IGF 1- инсулину сличан фактор раста 1 (енг. *Insulin Like Growth Factor 1*)
IgG- имуноглобулин Г класе
IgM- имуноглобулин М класе
IKKβ- бета субјединица *NF-κB* инхибитора (енг. *Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta*)
IL-17- интерлеукин 17
Keap1- енг. *Kelch-Like ECH-Associated Protein*
КМБ- крвно-мождана баријера
KJ- калијум јодид
LOOH- липидни хидропероксиди (енг. *Lipid Hydroperoxide*)
m- метар
MAPK- митоген активирајуће протеин киназе (енг. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
MBP- мијелин базни протеин (енг. *Myelin Basic Protein*)
MDA- малондиалдехид (енг. *Malondialdehyde*)
МКР- *MAPK* фосфатаза
MSSS- скор тежине мултипле склерозе (енг. *Multiple Sclerosis Severity Score*)
NADPH- никотинамид аденин динуклеотид фосфат (енг. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)
NF-κB- нуклеарни фактор капа бета (енг. *Nuclear Factor Kappa Beta*)
НК- урођеноубилачке (енг. *Natural Killer*) ћелије
NO₃- нитрат (енг. *Nitrate*)
NO₂- нитрит (енг. *Nitrite*)
NOS- азот-моноксид синтаза (енг. *Nitric Oxide Synthase*)
NO- азот-моноксид (енг. *Nitric Oxide*)
Nrf2- нуклеарни фактор (енг. *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*)

ONOO⁻ - пероксинитрит (енг. *Peroxonitrite*)
•OH- хидроксил радикал
PAB- прооксидативно-антиоксидативни баланс
PG- простагландин
PONI- параоксоназа 1 (енг. *Paraoxonase 1*)
PTH- паратиреоидни хормон (енг. *Parathyroid Hormone*)
P- фосфор
RAGE- рецептор за крајњи производ гликације протеина (енг. *Receptor For Advanced Glycation End Product*)
RCS- реактивна угљеникова једињења (енг. *Reactive Carbonyl Species*)
RNS- реактивна азотова једињења (енг. *Reactive Nitrogen Species*)
ROC- енг. *Receiver Operating Characteristic Curve*
ROS- реактивна кисеонична једињења (енг. *Reactive Oxygen Species*)
RSS- реактивна сумпорна једињења (енг. *Reactive Sulfur Species*)
RXR- ретиноидни рецептор X (енг. *Retinoid X Receptor*)
SH- сулфхидрилне (енг. *Sulphydryl*)
SOD- супероксид-дизмутаза (енг. *Superoxide Dismutase*)
TAS- тотални антиоксидативни статус (енг. *Total Antioxidative Status*)
TBARS- тиобарбитурна киселина реагујућа супстанца (енг. *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*)
TBA- тиобарбитурна киселина (енг. *Thiobarbituric Acid*)
Th- помоћнички Т лимфоцити (енг. *T Helper*)
TRIS-HCl- трис (хидроксиметил) аминетан пуфер
UDP- уридин дифосфат (енг. *Uridine Diphosphate*)
UGT 1A1- UDP глукуронил трансфераза 1 A1 (енг. *UDP glucuronosyltransferase Family 1 Member A1*)
VDBP- витамин Д везујући протеин (енг. *Vitamin D Binding Protein*)
VDRE- витамин Д зависни фактор (енг. *Vitamin D Responsive Element*)
VDR- витамин Д рецептор (енг. *Vitamin D Receptor*)
АО- антиоксиданси
АПѠ- антиген презентујуће ћелије
ЕАЕ- експериментални аутоимунски енцефаломијелитис
КМБ- крвно-мождана баријера
МС- мултипла склероза
O₂⁻-супероксидни анјон (енг. *Superoxide Anion*)
ОС- оксидативни стрес
ППМ- примарно-прогресивна мултипла склероза
РРМС- релапсно-ремитентна мултипла склероза
СПМС- секундарно-прогресивна мултипла склероза
СР- слободни радикали
ТМБ- 3,3',5,5 тетраметилбензидин
УВ- ултравиолетно
ЦНС- централни нервни систем
1,24,25 (ОН)₃Д- 1,24,25-трихидрокси витамин Д
1,25(ОН)₂Д- 1,25-дихидрокси витамин Д
15-PGOH- 15-хидрокси простагландин дехидрогеназа (енг. *15-Hydroxy Prostaglandin Dehydrogenase*)
25(ОН)Д- 25-хидрокси витамин Д
4-ХНЕ- 4-хидроксиноненал

САДРЖАЈ

I УВОД	1
I 1. Мултипла склероза	1
1.1. Дефиниција, клиничке форме и епидемиологија	1
1.2. Етиологија МС	2
1.3. Патогенеза мултипле склерозе	4
1.4. Терапија мултипле склерозе	5
I 2. Витамин Д	6
2.1. Метаболизам витамина Д	6
2.2. Улога витамина Д у организму	9
I 3. Оксидативни стрес	11
3.1. Слободни радикали	11
3.2. Механизми антиоксидативне заштите	12
II РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ	15
III ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	16
IV МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	17
IV 1. Испитаници	17
IV 2. Узорци	19
IV 3. Одређивање концентрације основних биохемијских параметара	19
IV 4. Одређивање концентрације витамина Д	19
IV 5. Одређивање параметара оксидативног стреса	20
5.1. Одређивање концентрације протеинских продуката узнапредовале оксидације	20
5.2. Одређивање концентрације прооксидативно-антиоксидативног баланса	20
5.3. Одређивање концентрације малондиалдехида	21
5.4. Одређивање концентрације нитрата и нитрита	21
5.5. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе	22
5.6. Одређивање активности каталазе	22
5.7. Одређивање активности параоксоназе 1	22
5.8. Одређивање концентрације тоталног антиоксидативног статуса	22
5.9. Одређивање садржаја сулфхидрилних група	23
5.10. Одређивање концентрације укупног билирубина	23
5.11. Одређивање концентрације мокраћне киселине	24
5.12. Одређивање концентрације феритина	24
5.13. Одређивање концентрације трансферина	24
IV 6. Врста истраживања, величина узорка и статистичка обрада података	25
V РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	26
V 1. Поређење пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника	26

1.1. Демографске и клиничке карактеристике пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника	26
1.2. Биохемијски параметри пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника	27
1.3. Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника	28
1.4. Витамин Д у серуму пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника.....	28
V 2. Поређење клиничких и биохемијских параметара пацијената оболелих од мултипле склерозе у зависности од фазе болести (у ремисији и релапсу)	29
2.1. Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код пацијената са мултиплом склерозом у зависности од фазе болести (ремисије и релапса)	29
2.2. Концентрација витамина Д у серуму код пацијената оболелих од мултипле склерозе током ремисије и релапса	30
V 3. Утицај витамина Д на оксидативни стрес код оболелих од мултипле склерозе	31
3.1. Испитивање независног утицаја витамина Д на параметре ОС код оболелих од мултипле склерозе	33
3.2. Утицај витамина Д на оксидативни стрес код оболелих од мултипле склерозе у зависности од фазе болести.....	34
V 4. Повезаност параметара оксидативног стреса, витамина Д и клиничких карактеристика болести.....	35
4.1. Корелација параметара оксидативног стреса и витамина Д са клиничким подацима код пацијената са мултиплом склерозом.....	35
4.2. Корелација параметара оксидативног стреса и витамина Д са клиничким подацима током ремисије и релапса	36
V 5. Основне карактеристике, параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите и витамина Д код оболелих од мултипле склерозе у зависности од пола.....	39
V 6. Основне карактеристике, параметри оксидативно-стресног статуса и витамина Д код оболелих од мултипле склерозе у зависности од година (старости)	41
V 7. Основне карактеристике, параметри оксидативно-стресног статуса и витамина Д код оболелих од мултипле склерозе у зависности од пушачког статуса	43
V 8. Анализа <i>Receiver Operating Characteristic</i> кривих за параметре оксидативно-стресног статуса и витамина Д	45
VI ДИСКУСИЈА.....	48
VI 1. Оксидативни стрес код оболелих од мултипле склерозе.....	48
VI 2. Витамин Д у мултиплој склерози	53
VI 3. Оксидативно-стресни статус и витамин Д током ремисије и релапса	55
VI 4. Повезаност параметара оксидативно-стресног статуса и витамина Д у мултиплој склерози.....	56
VI 5. Оксидативни стрес и витамин Д у мултиплој склерози у зависности од пола	60
VI 6. Оксидативни стрес и витамин Д у мултиплој склерози у зависности од старости	61
VI 7. Оксидативни стрес и витамин Д у мултиплој склерози у зависности од пушачког статуса.....	62
VII ЗАКЉУЧЦИ	64
VIII ЛИТЕРАТУРА	65

I УВОД

I 1. Мултипла склероза

1.1. Дефиниција, клиничке форме и епидемиологија

Мултипла склероза (МС) је хронична, прогресивна, имунолошки посредована болест централног нервног система (ЦНС) коју карактеришу инфламација, демиелинизација и неуродегенерација (*Filippi* и сар., 2018). *Jean-Martin Charcot* је први пут описао МС још 1868. године (*Kumar* и сар., 2011).

Према клиничким карактеристикама разликују се три типа мултипле склерозе: релапно-ремитентни (РРМС), примарно-прогресивни (ППМС) и секундарно-прогресивни (СПМС) тип. Код већине пацијената (80-85%) је присутна РРМС која се манифестује акутним неуролошким нападом- релапсом, праћеним потпуним или делимичним опоравком- ремисијом. Према подацима око петнаест година од почетка РРМС може доћи до развоја СПМС коју дефинише споро, али непрекидно прогресивно напредовање клиничког дефицита. Најмање заступљена форма је ППМС коју карактерише прогресиван ток болести од самог почетка, без јасних фаза релапса (*Lublin* и сар., 2014).

Мултипла склероза је најчешћи узрок нетрауматске онеспособљености млађих одраслих особа. Инциденција болести се повећава после 18. године живота, са пиком оболевања између 20. и 40. године (*Kamm* и сар., 2014). Преваленција МС је хетерогена. Највећи број оболелих региструје се у Северној Америци (140/100.000 становника) и Европи (преко 108/100.000), а најмањи број је забележен у источној Азији (2,2/100.000) и јужној Африци (2,1/100.000). У Европи, највећа преваленција је документована на Скандинавском полуострву (преко 150/100.000), а најнижа на Малти (0-34/100.000) (*Kingwell* и сар., 2013). Србија припада поднебљу с високим ризиком од МС, са преваленцијом од 64,9 /100.000 становника (*Toncev* и сар., 2011).

Основна патолошка карактеристика МС су инфламаторне лезије, тзв. демиелинизациони плакови, који се детектују магнетном резонанцом. У демиелинизационом плаку долази до оштећења мијелинских омотача, олигодендроцита и аксонских наставака. Они се могу наћи у било ком делу мозга и кичмене мождине, али постоје места која су захваћена чешће од других (предилекциона места). То су оптички нерви, субпијални делови кичмене мождине, мождано стабло, мали мозак и перивентрикуларна бела маса (*de Stefano* и сар., 2016). У зависности од локација лезија у ЦНС, код оболелих од МС су присутни различити симптоми болести (*Giovanonni* и сар., 2016). Карактеристични знаци и симптоми су: дупле слике, губитак вида, вртоглавице, слабост у рукама и ногама, трњење у деловима тела, тремор руку, нестабилност и тешкоће при ходу, уринарне сметње, импотенција, сметње при говору, грчење мишића, епилептички напади и вртоглавица (*Stepanovic-Petrovic* и *Micov*, 2015). Болест најчешће почиње неуритисом оптичког нерва (код приближно 25 % пацијената) (*Galetta* и сар., 2015), али сваки неуролошки симптом може бити и симптом мултипле склерозе. Управо толика хетерогеност МС представља велики изазов клиничару при постављању дијагнозе.

Болест се дијагностикује према ревидираним МекДоналдовим клиничким критеријумима којима се евидентира постојање дисеминације лезија у простору и времену (*Polman* и сар., 2011). Дисеминација лезија у времену подразумева постојање више од једне епизоде дисфункције, док дисеминацију у простору карактерише просторна раздвојеност лезија у ЦНС. Доказ дисеминације могу бити и детектоване нове лезије, без испољавања неуролошког

дефицита (Thomson и сар., 2018). С обзиром на хетерогеност симптома МС, као и на чињеницу да готово сваки неуролошки симптом може бити и симптом ове болести, анализа ликвора пружа потпору клиничкој дијагнози. Присуство олигоклоналних трака имуноглобулина Г класе (IgG) или повишен IgG индекс (квантитативни параметар интратекалне синтезе IgG) доказују присуство болести (Arrambide и Tintore, 2020).

Као мера неуролошке онеспособљености у МС, користи се Проширена скала статуса онеспособљености (енг. *Expanded Disability Status Score; EDSS*). Ова скала се користи за процену функционалних карактеристика ЦНС и рангира се бројчано у распону од 0 (нормалан неуролошки статус) до 10 (смрт као последица МС) (Meyer-Moock и сар., 2014). За процену прогресије МС, може се применити и Скор тежине мултипле склерозе (енг. *Multiple Sclerosis Severity Score; MSSS*), који користи ЕДСС и дужину трајања болести у процени развоја болести (Roxburgh и сар., 2005).

1.2. Етиологија МС

Етиологија МС није у потпуности разјашњена. У настанку болести значајну улогу имају генетски фактори и фактори спољашње средине (Mandia и сар., 2014), односно МС настаје код генетски предиспонираних особа након излагања неповољним спољашњим факторима (Nischwitz и сар., 2011). Као фактори ризика одговорни за настанак МС сматрају се ниво витамина Д, изложеност сунцу, пушење, вирусне инфекције и гојазност (Olsson и сар., 2017).

Преваленција МС унутар породице процењује се на око 13 %, односно један од осам оболелих пацијената наводи појаву МС у породици (Harirchian и сар., 2017). Показано је да највећи ризик за оболевање имају монозиготни близанци (35 %). Ризик код дизиготних близанаца је 6 %, док код браће и сестара (истих родитеља) износи 3 % (Compston и Coles, 2002). Мултипла склероза у генетском смислу представља комплексну, полигенску болест у чијем настанку учествује више од 200 гена (Baranzini и Oksenberg, 2017). Хумани леукоцитни антиген (енг. *Human Leukocyte Antigen; HLA*), првенствено *HLA-DRB1*15.01* је генетски фактор с највећим ризиком за оболевање од МС (Gourrand и сар., 2012). Ипак, *HLA-DRB1*15.01* генотип је присутан и код 15,6 % популације код које није документована МС (McKay и сар., 2017). То указује на значај фактора средине, који могу довести и до епигенетских промена генетског материјала. Гени изван *HLA* локуса одговорни за развој МС су гени чији производи учествују у имунском одговору (*International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*, 2019). Истовремено, *HLA-A*02* и *HLA-B*44* су идентификовани као протективни алели који супримирају настанак промена у МС (Moutsianas и сар., 2015).

Значај фактора средине за појаву МС најбоље објашњавају подаци из студија миграција становништва. Документовано је да пресељење с подручја ниског МС ризика у подручје високог ризика, посебно у периоду пре навршене петнаесте године живота, ствара предиспозицију за развој ове болести. Ако се пак миграција догоди касније у животу, задржава се (смањен) ризик осетљивости из земље свог порекла (Berg-Hansen и Celius, 2015).

Повезаност МС и витамина Д доказује присуство витамин Д зависног фактора (енг. *Vitamin D Responsive Element; VDRE*) на *HLA-DRB1*15.01* гену (Ramagopalan и сар., 2009). Показано је да хиповитаминоза Д, настала усред недовољног излагања сунчевој светлости, малог уноса храном, смањене синтезе и/или повећане разградње повећава ризик за развој МС (Rhead и сар., 2016; Gianfrancesco и сар., 2017). Витамин Д интерреагује с другим факторима ризика за МС, па тако суплементација витамином Д редукује ниво антитела на *Epstein-Barr* вирус (*EBV*) (Rosjo и

сар., 2017). Витамин Д модулише имунски одговор и делује протективно на ток и прогресију болести (*Del Giudice* и сар., 2018). Такође, третман витамином Д у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису (ЕАЕ), анималном моделу МС, значајно редукује активност болести (*Mimura* и сар., 2021).

Показано је да изложеност сунчевим зрацима смањује ризик од МС на два начина: витамин Д зависним механизмом (стимулацијом ендогене синтезе витамина Д) и витамин Д независним механизмом (индукцијом антиинфламаторног одговора) (*Hedstrom* и сар., 2020-а). Континуирани третман ултравиолентним (УВ) зрацима супримира ЕАЕ, независно од стварања витамина Д (*Irving* и сар., 2019). То доказује да су УВ зрачење и витамин Д два међусобно повезана, али истовремено независна фактора ризика (*Langer-Gould* и сар., 2018-а). Ултравиолентно зрачење, електромагнетно зрачење с таласним дужинама 10-400 nm, индукује стварање регулаторних Т и Б лимфоцита (*Baarnhielma* и сар., 2012), као и продукцију простагландина Е₂ (*Hart* и сар., 2017) који активира олигодендроците и повећава стварање мијелинског омотача (*Famitafreshi* и *Karimian*, 2020).

Након опсежне анализе и процене повезаности МС и вирусних инфекција, као најзначајнији фактор ризика за МС идентификована је инфекција *EBV*, поготово у детињству и адолесценцији (*Bar-Or* и сар., 2020). Показано је да особе са позитивним *EBV* антителима имају 5,5 пута већи ризик за развој мултипле склерозе. Инфекција представља „окидач“ аутоимунског процеса, односно појачава већ постојећи субклинички процес. У бројним клиничким студијама на пацијентима са МС показана је чак потпуна серопозитивност на *EBV* (*Haahr* и сар., 2004). Механизам којим *EBV* утиче на МС није разјашњен. Претпоставља се да молекулска мимикрија између *EBV* и антигена мијелина доводи до развоја болести (*Mandia* и сар., 2014). Студије су такође показале да, за разлику од *EBV*, инфекција цитомегаловирусом делује протективно, односно смањује ризик за оболевање (*Olsson* и сар., 2017).

Пушење цигарета (активно и пасивно) је фактор ризика за настанак мултипле склерозе (*Wingerchuk Dean*, 2012). У бројним студијама показано је да пушење интереагује с генетским фактором ризика, инсуфицијенцијом витамина Д и вирусним инфекцијама (првенствено *EBV*) (*Hedstrom* и сар., 2016-а). Такође, код пушача се региструју различити степени дисрегулације Т и Б лимфоцита, што компромитује имунски одговор, стварајући услове за инфламацију и погоршање мултипле склерозе.

Фактор ризика који у развијеним земљама посебно испољава значај за развој МС је гојазност, посебно током пубертета (*Rasul* и сар., 2018). Код гојазних особа адипозно ткиво индукује хроничну инфламацију ниског степена (*Ellulu* и сар., 2017). Додатно, код гојазних особа региструју се ниже концентрације витамина Д (*Pourshahidi Kirsty*, 2015), вероватно услед његовог депоновања у адипоцитима (*Wortsman* и сар., 2000).

Поред наведених фактора ризика, новија истраживања истичу и значај нарушеног циркадијалног ритма услед рада у ноћној смени, посебно код особа млађих од 20 година, који значајно повећава ризик за оболевање (*Alfredsson* и сар., 2019). Истиче се и утицај промена цревне микробиоте на имунски систем оболелих од МС (*Tankou* и сар., 2018), као и значај интеракције витамина Д и цревних микроорганизама (*Malaguarnera Lucia*, 2020).

Из свега наведеног може се закључити да је МС мултифакторска болест са полигенском предиспозицијом и бројним интеракцијама које се испољавају између гена и фактора спољашње средине (*Hauser* и сар., 2006).

1.3. Патогенеза мултипле склерозе

Основу патогенетског процеса у МС чине поља неуроинфламације која се настављају на процес неуродегенерације. Као последица ових деструктивних процеса настаје оштећење мијелинског омотача у одређеној зони ЦНС- демиелинизација, која доводи до смањене проводљивости импулса (*Gold и Wolinsky, 2011*). Примарно се сматрало да неуроинфламација карактерише почетну, а неуродегенерација (оштећење неурона) каснију фазу МС (*Leray и сар., 2010*). Новија истраживања показују да је неуродегенерација присутна од самог почетка болести (*Dobson и Giovannoni, 2019*). Настанак неуродегенерације посебно је подстакнут деловањем оксидативног стреса (ОС), нитрозативног стреса и отпочињањем процеса ексцитотоксичности (*Gilgun-Sherki и сар., 2004; Armada-Moreira и сар., 2020*).

Мијелински омотач, специфични аксонски изолатор, који обезбеђује салтаторну кондукцију акционих потенцијала је производ олигодендроцита у ЦНС, односно Шванових ћелија у периферном нервном систему. Појединачни олигодендроцит својим продужецима обезбеђује мијелинизацију већем броју аксона, па тако оштећење ових ћелија које настаје током демиелинизације, доводи до вишеструких дефицита у процесима преноса импулса. У почетним стадијумима МС, након оштећења мијелина долази до регенерације олигодендроцита, тзв. ремиелинизације. Интензитет ремиелинизације, међутим, зависи од много фактора међу којима се истичу старост пацијента, трајање болести, места оштећења, величина оштећења, али и присуство прогенитора олигодендроцита (*Lassmann Hans, 2018*). Активна ремиелинизација је уочена код млађих болесника у раној фази МС, док с напредовањем болести, регенерација заостаје за водећом демиелинизацијом, повећавајући неуролошку онеспособљеност (*Goldschmidt и сар., 2009*). Додатно, новонастали мијелински омотач је тањи, услед чега је у ремиелинизованим областима мања брзина провођења нервних импулса. Такође, репарирани мијелински омотач се поред дебљине и по саставу разликује од адултног зрелог омотача, јер садржи функционално инсуфицијентне и изоформе мијелина које су знатно осетљивије (*Sospedra и Martin., 2005*).

Мултипла склероза се сматра аутоимунском болешћу у којој је имунски одговор посредован периферним Т лимфоцитима који су усмерени ка мијелин базном протеину (енг. *Myelin Basic Protein; MBP*), најзаступљенијем протеину мијелинског омотача неурона (*Goverman Joan, 2011*). Молекулска мимикрија је могући механизам који објашњава напад Т-лимфоцита на сопствено ткиво. Болест почиње препознавањем антигена и активацијом помоћничких Т лимфоцита (енг. *T Helper; Th*) (*Steinman Lawrence, 2008*). Активирани Th лимфоцити пролазе крвно-моздану баријеру (КМБ), акумулирају се у ЦНС-у и при поновном сусрету са антигеном, реактивирају. Реактивирани Th лимфоцити оштећују мијелин директно- секрецијом проинфламаторних цитокина и индиректно- регрутовањем Б лимфоцита, моноцита, мастоцита и урођеноубилачких (енг. *Natural Killer; NK*) ћелија на место оштећења (*Fletcher и сар., 2010*). Ћелије микроглије, резидентне имунске ћелије ЦНС-а, активирају и интензивирају стечени имунски одговор јер експримирају антиген мијелина и конвертују се у антиген презентујуће ћелије (АПЋ) (*Sosa и сар., 2013*). Као АПЋ, микроглија активира Т лимфоците чиме испољава кључну улогу у регрутовању ћелија у централном нервном систему. Активирана микроглија истовремено продукује цитотоксичне цитокине и слободне радикале. То доводи до развоја ОС, подстицања инфламације и нарушавања интегритета неурона. У даљем току болести, ради превенције даљег оштећења ЦНС активира се својеврстан компензаторни механизам- активирање програмиране ћелијске смрти, односно апоптозе (*Herold и Reichardt, 2013*).

Иако Т-лимфоцити имају централну улогу у патогенези МС, новија сазнања истичу улогу Б лимфоцита у настанку и одржавању патолошког процеса (*Li и сар., 2018*). Овој тези доприноси повећање Б-лимфоцита у ликвору МС пацијената (*Arneith Borros, 2019*), као и одлични терапијски резултати постигнути селективним третманом Б лимфоцита (*Hauser и сар., 2017*).

Поред стеченог имунитета и урођена имуност има улогу у патогенези МС. Код оболелих од МС је присутан већи број функционално измењених дендритских ћелија (*Longhini и сар., 2011*), снижен број *NK*-ћелија (*Kaur и сар., 2013*), као и хиперактивација микроглије и макрофага (*Dheen и сар., 2007*).

Из свега наведеног, могу се издвојити патохистолошке карактеристике које током МС имају кључну улогу у индуковању клиничких симптома и знака: активација микроглије, повећана пропустљивост КМБ, инфламација околног нервног ткива са инфилтрацијом лимфоцита и моноцита, деструкција мијелинских омотача, дегенерација аксона, хипертрофија астроцита и апоптоза олигодендроцита (*Ruggieri и сар., 2014*).

1.4. Терапија мултипле склерозе

Основни терапијски циљ у МС је смањити активност болести редукцијом броја и интензитета релапса и одложити прогресивну онеспособљеност болесника. То се постиже раном дијагнозом болести, правовременом терапијом и кориговањем животних навика (*Hobart и сар., 2019*).

Још увек не постоји лек који би излечио МС, иако је у последњих 20 година постигнут огроман напредак у ефикасности расположиве терапије. Како се испољавање МС манифестује разноврсно, тако се и терапија МС усмерава ка: терапији акутног напада, терапији која модификује природан ток болести (енг. *Disease Modifying Treatment; DMT*) и симптоматској терапији.

Терапија акутног напада представља третман релапса болести с циљем што бржег и потпунијег опоравка од новонасталог неуролошког дефицита. Обухвата примену пулсних доза кортикостероида (интравенски *i.v.* у дози од 1 грама (*g*) током 3 до 5 дана), који делују снажно антиинфламаторно. Уколико кортикостероиди не уведу болест у ремисију, приступа се терапијској измени плазме (енг. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation; HSCT*) (*Yamout и сар., 2020*).

Савремене препоруке су да терапију која модификује природан ток болести треба започети одмах по успостављању дијагнозе МС, односно у оквиру три месеца од појаве првих симптома (*Hobart и сар., 2019*). Показано је да успешност *DMT* корелира са годинама оболелих, односно, установљено је да се ефикасност континуирано смањује са старашћу (*Weideman и сар., 2017*). Први регистровани ДМТ су имуномодулаторни лекови који конвертују проинфламаторни у антиинфламаторни имунски одговор и на тај начин мењају патолошки образац болести. То су интерферони и глатирамер ацетат. Интерфероне чине интерферон (енг. *Interferon; IFN*) бета (*IFNβ*) 1б и *IFNβ* 1а. То су лекови умерене ефикасности који смањују број и тежину релапса и спречавају појаву нових лезија (*Palace и сар., 2019*). Због велике хетерогености МС, ови лекови нису делотворни код свих пацијената. Стога се развијају нови, средње ефикасни лекови за оралну употребу, који обухватају имуносупресиве (кладрибин и терифлуномид) и имуномодулаторе (финголимод и диметилфумарат) (*Pegoretti и сар., 2020*).

Рани третман високоефикасним лековима смањује ризик за конверзију РРМС у прогресивну форму болести (*Brown и сар., 2019; Stankiewicz и Weiner, 2019; Buron и сар., 2020*).

Високоэффективни лекови су моноклонска антитела (окрелизумаб- моноклонско антитело на *CD20*, натализумаб- моноклонско антитело против ћелијског адхезивног молекула $\alpha 4$ -интегрин и алемтузумаб- моноклонско антитело за гликопротеин *CD52*). До марта 2018. године у употреби је било и моноклонско антитело на *IL-2* рецептор- даклизумаб, које је због озбиљних нежељених ефеката повучено из употребе.

У случају да горе наведени лекови не уведу болест у ремисију, ординира се цитостатик-митоксантрон. Проблем који се јавља током спровођења терапије овим високоэффективним лековима је ризик за испољавање озбиљних нежељених ефеката.

Симптоматска терапија је усмерена на ублажавање симптома и знакова који утичу на квалитет живота оболелих, као што је терапија спазма или тремора. Пацијентима се препоручује да воде активан и здрав начин живота који обухвата квалитетан дијететски режим и умерену физичку активност (*Stepanovic-Petrovic* и *Micov*, 2015).

Према се терапијски принцип лечења МС спроводи према препорукама Интернационалне федерације за мултиплу склерозу (енг. *Multiple Sclerosis International Federation*), не постоји универзална терапијска шема у лечењу мултипле склерозе. Важно је терапију започети што пре и индивидуално је прилагодити пацијенту према активности и карактеристикама болести (*Kalincik* и сар., 2017).

I 2. Витамин Д

Витамин Д је генерички назив за два липосолубилна молекула: витамин Д3 и Д2 витамин (*Jovicic* и сар., 2012). Витамин Д2- ергокалциферол је присутан у биљкама. Он има само 30 % активности витамина Д3. Витамин Д2 се у организам уноси храном. Витамин Д3-холекалциферол се за разлику од витамина Д2 може ендогено синтетисати у организму. Ендогена синтеза је доминантан извор витамина Д3 (80 %) иако се и он може унети храном (20 %) (*Sassi* и сар., 2018). Исхрана богата витамином Д3 обухвата унос масне рибе, јетре животиња, жуманца јајета и путера.

2.1. Метаболизам витамина Д

Витамин Д се синтетише из 7-дехидрохолестерола, у епидермису и дермису коже дејством УВ-Б зрака сунчеве светлости. На ендогену синтезу витамина Д утичу индивидуални фактори и фактори средине.

Индивидуални фактори су обојеност коже, старост и употреба крема за сунчање.

Боравком на сунцу у истом временском интервалу, бела раса ствара већу количину витамина Д у поређењу са Афроамериканцима (*Webb* и сар., 2018). Због тога је за смањење ризика настанка МС код Афроамериканаца значајнија терапија УВ зрацима од суплементације витамина Д. Код беле популације је управо супротно, односно суплементација витамина Д доминира над третманом УВ зрацима (*Langer-Gould* и сар., 2018-б). Са годинама се смањује концентрација 7-дехидрохолестерола и самим тим и ендогено стварање витамина Д, што потенцира значај суплементације витамина Д у старијој популацији (*MacLaughlin* и *Holick*, 1985). Употреба заштитних крема за сунчање услед блокирања УВ-Б зрака смањује и стварање витамина Д3. Додатно, бројни су фактори средине који утичу на изложеност УВ-Б зрачењу: годишње доба, доба дана, загађеност средине, степен облачности, надморска висина, географска ширина и квалитет озонског омотача. Најјача емисија УВ-Б зрака је током летњег периода између 11 и 15 часова (*Ascherio* и сар., 2010). Значај улоге витамина Д подржава и хипотеза по којој је

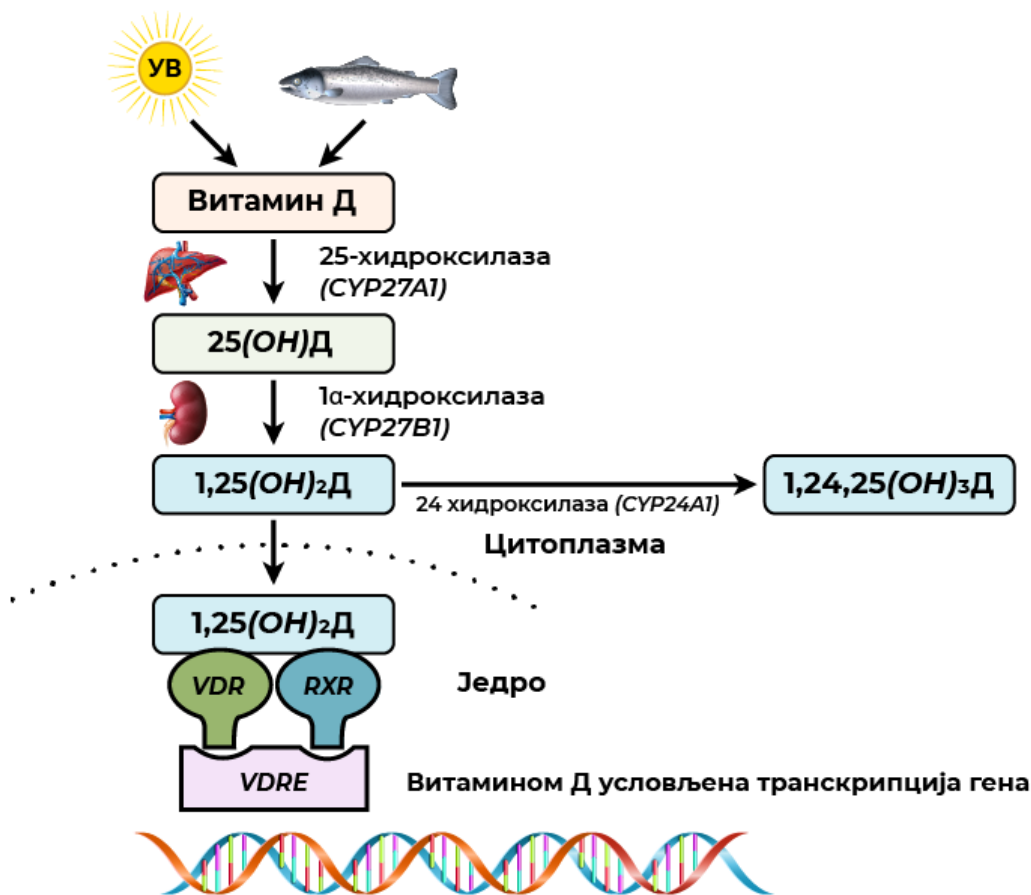
флуктуација грипа у зимском периоду последица сезонских варијација у концентрацији витамина Д (*Cannell* и сар., 2008).

Под дејством УВ-Б зрака сунчеве светлости 7-дехидрохолестерол се конвертује у Д3 витамин. И витамин Д3 (створен у кожи) и витамин Д2 (апсорбован из дигестивног тракта) имају исти метаболизам и биолошки су активни тек након хемијске трансформације. Зато витамин Д, иако носи назив витамина, није прави витамин (витамини се не синтетишу у организму), већ је прохормон, односно активан је након хемијске трансформације. Дејством ензима витамин Д-25 хидроксилазе (кодиране геном *CYP27A1*), у јетри се витамин Д хидроксилише и настаје 25-хидрокси витамин Д (25(ОН)Д), који се назива калцидиол. Калцидиол је циркулишући молекул који презентује статус витамина Д у организму, због дугог времена елиминације и високих серумских концентрација (*Sempos* и сар., 2018). Даљу хидроксилацију 25(ОН)Д у 1,25 дихидрокси витамин Д (1,25(ОН)₂Д) катализује ензим 25(ОН)Д-1 α -хидроксилаза (кодиран геном *CYP27B1*). Активан облик витамина Д је управо 1,25(ОН)₂Д, односно два пута хидроксилисан Д витамин. Полувреме елиминације активног облика, 1,25(ОН)₂Д, износи око 15 сати, за разлику од 25(ОН)Д, чије је полувреме елиминације око 15 дана (*Zhang* и сар., 2012).

Место стварања 1,25(ОН)₂Д су примарно бубрези (бубрежни болесници су 1,25(ОН)₂Д дефицијентни), али и имунске, епителне ћелије, ентероцити дебелог црева и простате (*Bikle Daniel*, 2010).

Стварање активног облика витамина Д у бубрезима је строго контролисано. Паратиреоидни хормон (енг. *parathyroid hormone*; PTH) стимулише, док фибробластни фактор раста 23 (енг. *Fibroblast Growth Factor*; *FGF-23*), калцијум и фосфор инхибирају синтезу витамина Д (*Li* и сар., 2019). Такође, високе концентрације 1,25(ОН)₂Д индукују синтезу *FGF-23* и повећавају експресију *CYP24A1* и механизмом негативне повратне спреге смањују концентрацију витамина Д (*Anderson Paul*, 2017).

Катаболизам витамина Д је под контролом ензима 24 хидроксилазе (кодиране геном *CYP24A1*). 24 хидроксилаза преводи активан облик, 1,25(ОН)₂Д у биолошки неактиван 1,24,25 (ОН)₃Д, који се назива и калцитроинска киселина (*Wasnik* и сар., 2020). Анаболизам, активација, затим катаболизам витамина Д је приказан на Слици I 1.



Слика I 1. Метаболизам витамина Д (адаптирано према Liu и сар., 2018)

УВ-ултравиолентно; 25(OH)Д-25-хидрокси витамин Д; 1,25 (OH)₂Д-1,25-дихидрокси витамин Д; 1,24,25(OH)₃-1,24,25-трихидрокси витамин Д; VDR-витамин Д рецептор; RXR-ретиноидни рецептор X; VDRE-витамин Д зависни фактор.

Витамин Д и његови метаболити се у крви транспортују везани за протеине: 85 % у комплексу са витамин Д везујућим протеином (енг. *Vitamin D Binding Protein; VDBP*), док је 15 % везано за албумин (Bikle Daniel, 2000). Када витамин Д-протеин комплекс стигне до циљне ћелије, витамин Д се ослобађа из VDBP (или албумина), улази у ћелију и везивањем за витамин Д рецептор (енг. *Vitamin D Receptor; VDR*) остварује своју улогу. Разликују се нуклеарни, цитозолни и мембрански витамин Д рецептор. Нуклеарни VDR је одговоран за геномске, док се негеномски ефекти остварују посредством цитозолног и мембранског рецептора. Нуклеарни VDR интерагује с ретиноидним рецептором X (енг. *Retinoid X Receptor; RXR*) и ствара хетеродимер који се везује за витамин Д зависни фактор (енг. *Vitamine D Response Element; VDRE*), који затим утиче на транскрипцију гена (Berridge Michael, 2016) (Приказано на Слици I 1).

2.2. Улога витамина Д у организму

Витамин Д одржава хомеостазу и константну концентрацију калцијума (Ca) и фосфора (P) у крви повећавајући интестиналну апсорпцију Ca и P, повећавајући реналну реасорпцију калцијума и регулишући степен ресорпције и одлагања ових електролита у костима (*Fleet и сар.*, 2017). Ово је класична или традиционална функција витамина Д, одговорна за метаболизам костију. Истовремено су документоване и тзв. неklasичне улоге витамина Д (*Trochoutsou и сар.*, 2015), од којих су најзначајније неуропротективна, имуномодулаторна и антиинфламаторна.

Неуропротективна улога витамина Д је од великог значаја код оболелих од мултипле склерозе. С обзиром на то да је MS болест ЦНС, фокус је на дејству витамина Д у нервном систему. У ћелијама микроглије је доказано присуство 25(OH)Д-1 α -хидроксилазе и нуклеарног витамина Д рецептора. Бројни аутори су документовали неуропротективно дејство витамина Д у ЦНС-у (*Brown и сар.*, 2003; *Brewer и сар.*, 2001; *Wrzosek и сар.*, 2013).

Један од механизма неуропротективног дејства витамина Д је стимулација синтезе и ослобађања неуротрофина, есенцијалних за диференцијацију неурона (*Brown и сар.*, 2003). Претпоставља се да је витамином Д-индукована продукција неуротрофина одговорна за већи број зрелих неурона и олигодендроцита, што је показано на животињском моделу ЕАЕ, у култури нервних стем ћелија третираних витамином Д (*Shirazi и сар.*, 2015). У овој култури, показано је да витамин Д позитивно утиче на ендегену неурорегенерацију и ремиелинизацију. Истовремено, уочено је да витамин Д супримира експресију калцијумових канала у мембранама неурона, смањујући тако потенцијал за повећање интрацелуларног калцијума (*Brewer и сар.*, 2001). Високе концентрације калцијума у ћелији сигналом трансдукцијом узрокују ослобађање глутамата и последичну ексцитотоксичност, али повећавају и продукцију реактивних једињења кисеоника, активирају протеазе и липазе (које оштећују ћелијске мембране) и активацијом метаболизма арахидонске киселине утичу на продукцију њених инфламаторних деривата (*Wrzosek и сар.*, 2013). Спречавајући све ове процесе, витамин Д испољава неуропротективна дејства. Неуропротективно дејство витамин Д остварује и антиоксидативним дејством, првенствено редукујући липидну пероксидацију (*Tamadon и сар.*, 2018).

Имуномодулаторна улога витамина Д је постала очигледна проналаском VDR (*Mocanu и сар.*, 2013) и ензима CYP27B1 (*Lin Rui*, 2016) у имунским ћелијама. Инфламацијом створени цитокини индукују стварање CYP27B1 у моноцитима и макрофагама (*Krutzik и сар.*, 2008). Имуномодулаторна функција витамина Д је од великог значаја код имунски-посредованих обољења међу којима је и мултипла склероза. Показано је да витамин Д регулише и урођени и стечени имунски одговор (*Sassi и сар.*, 2018). С друге стране, имунске ћелије (Б и Т лимфоцити, моноцити, макрофаги и дендритске ћелије) посредују у катализацији хидроксилације неактивног 25(OH)Д у активан, 1,25(OH)₂Д облик. Тако настали 1,25(OH)₂Д испољава аутокринна и/или паракринна дејства, односно делује локално, док активни облик настао у бубрезима делује ендокрино (на удаљене ћелије и ткива).

Активни облик витамина Д стимулише макрофаге на продукцију антимицробних пептида: дефенсина β 2 и кателицидина (*Dai и сар.*, 2010). Он повећава хемотаксу, аутофагију и фагоцитно дејство моноцита и NK ћелија (*White и John*, 2010). Установљено је да 1,25(OH)₂Д смањује способност дендритских ћелија да преузимају и презентују антигене ефекторским ћелијама лимфоцита који уклањају инфективне агенсе (*Hu и Yonghong*, 2011).

Поспешујући урођену имуност, витамин Д посредује у раној заштити организма од инфекције.

Активан облик витамина Д редукује проинфламаторно дејство стеченог имунитета делујући на цитотоксичне Т лимфоците и на Б лимфоците (*Bivona* и сар., 2019).

Витамин Д стимулише диференцијацију и пролиферацију *Th2* лимфоцита, док истовремено инхибира *Th1* ћелије. Последица је смањење проинфламаторних цитокина од стране *Th1* ћелије. Истовремено, стимулација *Th2* лимфоцита повећава концентрацију антиинфламаторних цитокина (*IL-10* и *IL-4*) (*Yang* и сар., 2013).

Витамин Д редукује активност *Th17* лимфоцита, смањујући истовремено и концентрацију цитокина интерлеукина 17 (*IL-17*) (*Dankers* и сар., 2016). *IL-17* чини фамилија проинфламаторних цитокина који истовремено поспешују и стварање других проинфламаторних молекула: *TNF- α* и хемокина (*Wang* и сар., 2018). Доказан је утицај *IL-17* на активност МС (*van Langelaar* и сар., 2018), а публикације показују и веће концентрације *IL-17* у серуму оболелих од МС у односу на здраве контроле (*Kurtuncu* и сар., 2012; *Schofield* и сар., 2016). Третман моноклоналним антителима која инхибирају *IL-17-A* (*Secukinumab*) смањује број лезија код оболелих од МС (*Havrdova* и сар., 2016).

Витамин Д активира Т регулаторне лимфоците, чија је основна функција смањење инфламаторног одговора на сопствене антигене (*Fisher* и сар., 2019).

Истовремено, витамин Д смањује имунореактивност Б лимфоцита (*Haas* и сар., 2016) инхибира пролиферацију и стимулише апоптозу активираних Б лимфоцита. Активан витамин Д инхибира стварање меморијских Б лимфоцита и диференцијацију Б лимфоцита у плазмоците. *In vitro* студије доказују инхибиторни ефекат 1,25 (ОН)₂Д на активираних Б лимфоците и смањено стварање *IgG* и *IgM* антитела (*Chen* и сар., 2007).

Антиинфламаторна улога витамина Д заснива се на редукцији активности нуклеарног фактора капа бета (енг. *Nuclear Factor Kappa Beta*; *NF- κ B*), инхибицији митоген активирајуће протеин киназе (енг. *Mitogen-Activated Protein Kinase*; *MAPK*) и на инхибицији синтезе проинфламаторних простагландина (*Liu* и сар. 2018).

Нуклеарни фактор капа бета је фамилија транскрипционих фактора која контролише продукцију цитокина и слободних радикала и последично, индукује инфламацију. Витамин Д рецептор интерагује са бета субјединицом *NF- κ B* инхибитора (енг. *Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta*; *IKK β*) и блокадом *NF- κ B* спречава продукцију различитих проинфламаторних медијатора (*Chen* и сар., 2013).

Митогеном активираних протеин киназе на нивоу транскрипције и транслације регулишу синтезу проинфламаторних цитокина и последичан инфламаторни одговор. Повећана активност *MAPK*, првенствено фосфопротеина, *p38 MAPK* изазива снажну инфламацију, а његова блокада се може применити у антиинфламаторној терапији. Инактивација активираних *MAPK* се врши дефосфорилацијом треонин и тирозин *MAPK*- резидуа од стране *MAPK* фосфатаза (*MKP*). Активни облик витамина Д дозно зависно инхибира активацију *p38 MAPK*, односно повећава експресију *MKP* што има антиинфламаторно дејство (*Zhang* и сар., 2012). Активни облик витамина Д смањује концентрацију проинфламаторних цитокина, првенствено простагландина (PG) E2, различитим механизмима: смањујући број рецептора преко којих

простагландини делују, смањујући експресију ензима одговорних за њихову синтезу (циклоксигеназа 2, енг. *Cyclooxygenase 2; COX 2*) и повећавајући експресију ензима који антагонизује дејство *COX 2* (15-хидроксипростагландин дехидрогеназа) (енг. *15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase; 15-PGOH*) (Liu и сар., 2018).

Антиинфламаторно дејство витамина Д је доказано у *in vitro* студијама (Jirapongsananuruk и сар., 2000; Sadeghi и сар. 2006; Dickie и сар., 2010).

Упркос повољних ефеката витамина Д на анималним моделима ЕАЕ и културама ћелија, резултати рандомизованих контролисаних студија у хуманој популацији оболелих од МС су контрадикторни. С једне стране су истраживања у којима витамин Д редукује инфламацију (Jablonski и сар., 2011; Amer и Qayyum, 2012; Laird и сар., 2014), а с друге стране су студије у којима витамин Д не утиче на инфламацију (Shea и сар., 2008; Azizieh и сар., 2016; Mousa и сар., 2018). Узрок противречних резултата су разлике у дужини трајања истраживања, испитивање различитих облика витамина Д (Д2 или Д3), разлика у дозирању витамина Д, различитих метода одређивања 25(ОН)Д, као и примене другачијих биомаркера за праћење инфламације.

13. Оксидативни стрес

Оксидативни стрес (ОС) је стање неравнотеже између стварања слободних радикала (СР) и њиховог уклањања антиоксидансима. Да би дошло до ОС, неопходно је да утицај прооксиданаса надвлада механизме антиоксидативне заштите организма. Овај дисбаланс између прооксиданаса и антиоксиданаса, у корист прооксиданаса, доводи до оштећења протеина, липида и нуклеинских киселина и инхибиције њихове функције (Pinchuk и сар., 2012). Узрочници ОС су бројни и могу се класификовати као ендогени (наследне или стечене генске мутације и метаболичке дисфункције) и егзогени фактори (јонизујуће и УВ зрачење, дим цигарете и различити лекови).

3.1. Слободни радикали

Слободни радикал (СР) је сваки атом, група атома, јон или молекул са једним или више неспарених електрона у спољашњој орбитали (Lobo и сар., 2010). Хемијски представљају веома реактивне партикуле, јер неспарени електрон тежи да се стабилизује спаривањем са електроном другог молекула или предавањем свог неспареног електрона (Zuo и сар., 2015). Слободни радикали настају у бројним физиолошким стањима у организму: током респирације у митохондријама, у фагоцитози, у реакцијама оксидоредукције било да су катализоване јонима гвожђа или бакра или оксидазама (Van Horsen и сар., 2008). Створени СР у ниским, физиолошким концентрацијама, имају корисна дејства: регулишу сигналне путеве унутар ћелије, имају улогу хемоатрактаната и активатора леукоцита, учествују у фагоцитози, оксидативној експлозији у неутрофилима, ћелијској пролиферацији, деоби и апоптози (Schreibelt и сар., 2007).

У зависности од атома на коме се налази неспарени електрон, слободни радикали могу бити реактивна кисеонична/азотова/угљеникова/сумпорна једињења (енг. *Reactive Oxygen/Nitrogen/Carbonyl/Sulfur Species; ROS/RNS/RCS/RSS*) (Lushchak Volodymyr, 2014). Оксидативни стрес стварају реактивна једињења кисеоника, док нитрозативни стрес формирају реактивна једињења азота (Sadowska-Bartosz и сар., 2018).

Најзаступљенији ROS су супероксидни анјон (енг. *Superoxide Anion*; O_2^-), хидроксил радикал ($\cdot OH$) и водоник-пероксид (H_2O_2). Највеће количине ROS настају у митохондријама услед „цурења“ електрона из електронског транспортног ланца. Следећи важан извор ROS су ендотелне ћелије. Сам супероксидни анјон је слабо реактиван и његово токсично дејство се заснива на продукцији секундарних реактивних једињења. Под каталитичким деловањем ензима супероксид-дизмутаза, аутооксидацијом O_2^- настаје H_2O_2 , стабилан, умерено реактиван молекул, који је због лаког дифундовања кроз ћелијске мембране, присутан у бројним ткивима и органима. Управо због просторне заступљености, H_2O_2 лако реагује са јонима метала с прелазном валенцом (гвожђе или бакар) и ствара високореактивни хидроксил радикал (представљено на Слици 1 2). Ова реакција се назива Фентонова реакција и представља пример синтезе нових CP амплификацијом старих CP, односно пример како радикали „рађају“ радикале.

Најзначајнији RNS су азот-моноксид (енг. *Nitric Oxide*; NO) и пероксинитритни анјон (енг. *Peroxynitrite*; $ONOO^-$) (Patel и сар., 1999). За разлику од азот-моноксида, који поред токсичног има и корисна дејства, $ONOO^-$ који се ствара у реакцији O_2^- са NO, има само изразито токсичан ефекат. Пероксинитрит изазива липидну пероксидацију и оштећење протеинских структура (Szabo и сар., 2007).

Основна карактеристика CP је да су високореактивна једињења и као таква, имају изузетно кратак полуживот (свега неколико секунди). С друге стране, полуживот липида и протеина је знатно дужи и мери се у сатима или чак недељама, што их чини стабилнијим маркерима оксидативног стреса (Vincent и Taylor, 2006). У спроведеном истраживању индиректно је мерен ОС одређивањем стабилнијих молекула насталих реакцијом оксидације између CP и биолошких макромолекула (липида и протеина).

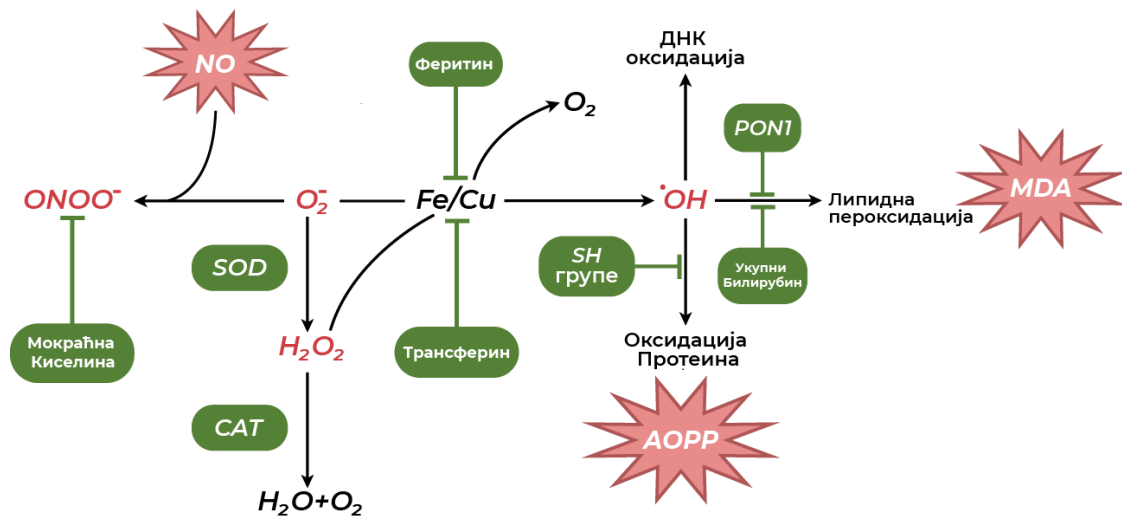
Липидна пероксидација је низ ланчаних реакција у којима CP нападају липиде и стварају токсичне алдехиде и нове CP (Ayala и сар., 2014). Липидном пероксидацијом се прво стварају липидни хидропероксиди (енг. *Lipid Hydroperoxide*; LOOH), а у крајњем стадијуму њиховом разградњом настају реактивни алдехиди: малондиалдехид (енг. *Malondialdehyde*; MDA), акролеин и 4-хидроксинонал (4-ХНЕ) (McCracken и сар., 2000). Крајњи резултат липидне пероксидације је нарушена пермеабилност ћелијских мембрана, што доводи до поремећаја хомеостазе и метаболизма ћелије, односно њене смрти.

Оксидативна модификација протеина изазива цепање полипептидних ланаца и стварање протеинских агрегата подложних деградацији (Marocco и сар., 2017). За процену оксидативне модификације протеина користе се протеински производи унапредовале оксидације (енг. *Advance Oxidation Protein Products*; AOPP) и крајњи производи унапредовале гликације (енг. *Advanced Glycation end Product*; AGE) (Lorenzo и сар., 2013).

3.2. Механизми антиоксидативне заштите

Негативном утицају слободних радикала се супротстављају антиоксиданси (АО). Антиоксиданси су хемијски хетерогена једињења која спречавају стварање CP, уклањају већ створене CP или санирају оштећења настала њиховом акумулацијом. С обзиром на корисне ефекте CP, улога антиоксидативне заштите није да их у потпуности елиминише, већ да их одржава у ниским, физиолошким концентрацијама. Главни критеријум по коме неко једињење припада систему антиоксидативне заштите је способност да у малим концентрацијама у поређењу са CP значајно одложи или спречи његову трансформацију (Poljsak и сар., 2013).

Класификација антиоксиданаса је вршена на основу различитих критеријума. Најзначајнија је подела АО према природи и начину деловања на ензимске (примарне) и неензимске (секундарне). Према растворљивости у води, АО се класификују на хидрофилне и хидрофобне, по величини молекула на нискомолекулске и високомолекулске, према пореклу на ендogene и екзогене и на основу локализације на интрацелуларне и екстрацелуларне антиоксидансе (Nimse и Pal, 2015).



Слика I 2. Механизам стварања и елиминације оксидативног стреса (адаптирано према Munzel и сар., 2017).

AOPP-протеински производи узнапредовале оксидације; MDA-малондиалдехид; NO_3 и NO_2 -нитрат и нитрит; SOD-супероксид-дизмутаза; CAT-каталаза; PON1-параоксоназа 1; TAS-тотални антиоксидативни статус; SH-сулфхидрилне; $ONOO^-$ -пероксинитрит анјон; $O_2^{\cdot-}$ -супероксидни анјон; $\cdot OH$ -хидроксил радикал

Примарни ниво заштите од ОС чине **ензимски антиоксиданси**: супероксид-дизмутаза (енг. *Superoxide Dismutase*; SOD), каталаза (енг. *Catalase*; CAT) и глутатион-пероксидаза (енг. *Glutathione Peroxidase*; GPx) (Ighodaro и Akinloye, 2018).

Супероксид-дизмутаза је прва линија одбране од ROS и оксидативног стреса. Протективно дејство остварује катализом аутооксидације (енг. *Dismutation*) $O_2^{\cdot-}$ до водоник-пероксида. (Механизам елиминације супероксидног анјона је приказан на слици I 2).

У зависности од ћелијске локализације и метала у активном центру, разликују се три изоформе супероксид-дизмутаза: SOD која садржи бакар (Cu) и цинк (Zn), SOD која садржи манган (Mn) и најмање заступљена, екстрацелуларна форма SOD (Sarsour и сар., 2014). Супероксид-дизмутаза која садржи Cu и Zn (Cu, Zn SOD) је хомодимер, просторно лоцирана у цитосолу сисара. Супероксид-дизмутаза која садржи Mn у активном центру (Mn SOD) је хомотетрамер који се налази у митохондријама, а екстрацелуларна SOD (EC SOD) је хомотетрамер који садржи Cu и Zn у активном центру. Идентификована је једино код сисара и лоцирана у интестицијалном простору ткива, а у мањој концентрацији и у екстрацелуларним течностима (плазма, лимфа, синовијална и цереброспинална течност) (Kim и сар., 2015).

Настали H_2O_2 се у цитозолу уклања активношћу каталазе, док га у митохондријама елиминише глутатион-пероксидаза (GPx). Већи афинитет за H_2O_2 има GPx у односу на CAT, тако да је GPx важан ензим у примарној одбрани- при ниским концентрацијама, док је CAT од значаја при високим концентрацијама водоник-пероксида (*Kruidenier* и *Verspaget*, 2002).

Неензимски антиоксиданси су по хемијској структури хетерогена група хидросолубилних и липосолубилних једињења. Антиоксидативно дејство неензимски АО остварују прихватањем слободног електрона, донирањем свог електрона или хелирањем јона метала који катализује Фентонову реакцију. Прихватањем или донирањем електрона, неензимски антиоксиданси сами постају слободни радикали. Ипак, створени CP су много мање реактивни од неутралисаних.

Неензимски антиоксиданси су мокраћна киселина, укупни билирубин, протеини који везују металне јоне (трансферин, феритин, церулоплазмин, албумин, миоглобин), протеини, односно њихове сулфхидрилне (SH) групе, мелатонин, коензим Q10, витамин Ц, витамин Е, селен, омега-3 и омега-6 масне киселине и каротени (*Lu* и сар., 2010).

Мерењем више различитих параметара оксидативног стреса добијају се прецизнији подаци о оксидативно-стресном статусу организма. Тако је развијена метода која мери тотални антиоксидативни статус (TAS), односно више различитих антиоксиданаса. Такође, новији параметар је прооксидативно-антиоксидативни баланс (PAB), који служи као мера оксиданаса у антиоксидативном окружењу.

С обзиром на значај метаболизма липида у патогенези MC, као и на прогностичку улогу липида у активности и току MC, у оквиру спроведеног истраживања је анализиран и ензим параоксоназа 1 (енг. Paraoxonase; PON1) (*Pineda-Torra* и сар., 2021). Фамилија параоксоназа обухвата PON1, PON2 и PON3 изоензиме, од којих PON1 испољава антиоксидативни ефекат (*Salari* и сар., 2021).

II РАДНЕ ХИПОТЕЗЕ

На основу наведених података, радне хипотезе истраживања су следеће:

1. Вредности параметара оксидативног стреса у крви оболелих од релапсно-ремитентне мултиплсе склерозе су:

- а) веће у поређењу са здравом контролном групом
- б) веће у фази релапса у поређењу са фазом ремисије
- в) корелирају са клиничким карактеристикама болести

2. Концентрације витамина Д и вредности параметара оксидативног стреса у крви оболелих од мултипле склерозе су у обрнутој корелацији.

III ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Подаци о повезаности оксидативно-стресног статуса и нивоа витамина Д код пацијената оболелих од мултипле склерозе су поред бројних истраживања и даље оскудни. С циљем да се разреши ова парадигма формулисани су следећи циљеви истраживања:

1. Испитати и упоредити вредности параметара оксидативног стреса: *PAB*, *MDA*, *AOPP*, концентрације нитрата и нитрита (NO_3 и NO_2) и параметара антиоксидативне заштите: *TAS*, *SH* група, мокраћне киселине, укупног билирубина, трансферина, феритина и активности *SOD*, *CAT* и *PON1*, у узорцима крви пацијената оболелих од релапсно-ремитентне мултипле склерозе и у групи здравих испитаника.
2. Испитати и упоредити вредности параметара оксидативног стреса код пацијената у фази релапса болести и фази ремисије мултипле склерозе.
3. Испитати и упоредити вредности витамина Д у серуму оболелих од мултипле склерозе и здравих испитаника.
4. Испитати и упоредити вредности витамина Д у серуму пацијената у зависности од фазе мултипле склерозе (ремисија или релапс).
5. Испитати повезаност параметара оксидативног стреса и вредности витамина Д оболелих од мултипле склерозе у различитим фазама болести.
6. Испитати повезаност вредности параметара оксидативног стреса, вредности витамина Д и клиничких карактеристика болести.

IV МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

IV 1. Испитаници

Истраживање је спроведено на Клиници за неурологију Војномедицинске академије током 2017. године, према етичким принципима Хелсиншке декларације. Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Војномедицинске академије. Сви учесници у истраживању-пацијенти оболели од МС и здрави испитаници су упознати с циљем истраживања и добровољно су пристали да учествују у њему, што су и потврдили потписивањем информационог пристанка.

У истраживању је учествовало 178 пацијената са дијагнозом МС просечне старости $40,9 \pm 9,8$ година. Код ових пацијената су извршена детаљна клиничка, лабораторијска и радиолошка испитивања. Дијагноза МС је постављена на основу ревидираних МекДоналдових критеријума из 2011. године (*Polman* и сар., 2011). У испитивање су укључени пацијенти оба пола, старији од 18 година, са дијагнозом релапно-ремитентне мултипле склерозе. Из истраживања су искључени пацијенти с прогресивном и секундарно прогресивном формом МС, као и пацијенти са акутним и хроничним болестима (интерне, хируршке или инфективне болести) и знацима инфекције. Пошто је анализиран редокс статус (у оквиру кога и *PON1* и феритин), из истраживања су искључени пацијенти који су користили суплементацију гвожђем и препарате са антиоксидансима, као и пацијенти на антихиперлипидемијској терапији. Клиничка процена пацијената је вршена на основу проширене скале статуса онеспособљености (приказано у Табели 1). Време трајања МС је изражено у годинама и дефинисано као период од појаве првих симптома и знакова болести до извођења истраживања. Број релапса по години (енг. *Annual Relapse Rate;ARR*) је добијен дељењем укупног броја релапса са дужином трајања мултипле склерозе. Подаци о пацијентима су добијени из медицинске документације (*EDSS*, број релапса по години, дужина трајања МС, терапија) и из упитника (пушачки статус, суплементација витамином Д). Клиничку анализу и закључак за сваког пацијента доносио је лекар специјалиста неурологије с вишегодишњим специјалистичким искуством.

Од 178 пацијената укључених у студију, 46 пацијената је било без терапије, 54 пацијената је примало интерферонску терапију (37 пацијената *Betaferon*[®], 5 *Avonex*[®] и 12 *Rebif*[®]), 31 пацијент је био на терапији диметил-фумаратом (*Tecfidera*[®]), 28 пацијената је примало даклизумаб (*Zinbryta*[®]), 9 глатирамер-ацетат (*Copaxon*[®]), 4 пацијента је примало финголимод (*Gilenya*[®]), 5 пацијената *HSCT* и 1 пацијент је био на терапији митоксантроном (*Novantrone*[®]). У спроведеном истраживању учествовало је и 28 пацијената оболелих од МС, који су инфузијом примали даклизумаб, који је накнадно, у марту 2018. године, Европска агенција за лекове обуставила због озбиљних нежељених ефеката који су резултирали леталним исходима (*Perez-Martinez FC*, 2018).

У односу на ток болести, од 178 МС пацијената 61 пацијент је био у релапсу, за разлику од 117 пацијената који су били у фази клиничке ремисије. Релапс је дефинисан као појава нових или погоршање претходних симптома уз пораст *EDSS* од бар једне јединице. Пацијентима у фази релапса, узорковање крви је вршено по пријему, пре примене кортикостероидне терапије. Ремисија је дефинисана као одсуство релапса болести у периоду од бар шест месеци.

За потребе истраживања формирана је и контролна група од 80 здравих испитаника просечне старости $39,3 \pm 9,0$ година. Селекција ових испитаника је вршена током систематског прегледа запослених на ВМА, на основу физичког прегледа, анамнестичких података и лабораторијских резултата. Критеријум за избор здравих испитаника представљало је одсуство инфекције, акутних и хроничних болести. Критеријум за искључење из студије била је суплементација витамином Д и употреба антиоксиданаса. Анамнестички подаци о здравим испитаницима (старост, пушачки статус, суплементација) прикупљене су усменим интервјуом.

Табела 1. Стандардизована EDSS у МС према Kurtzke-у (адаптирано према Kurtzke John, 1983)

EDSS	Степен онеспособљености
0	Нормалан неуролошки статус
1	Одсуство неуролошког испада, присутни минимални знаци поремећаја једног функционалног система
1,5	Одсуство неуролошког испада, присутни минимални знаци поремећаја више од једног функционалног система
2,0	Минимални поремећај једног функционалног система
2,5	Минимални поремећај два функционална система
3,0	Потпуна покретљивост, али умерени поремећај једног, или благи поремећај три или четири функционална система
3,5	Потпуна покретљивост, али умерени поремећај једног и више минималних поремећаја једног до пет функционалних система
4,0	Потпуна покретљивост без помоћи, самосталност око 12 часова дневно. Поред релативно тешког поремећаја, способност за ход без одмора или помоћи у дужини од 500 m
4,5	Потпуна покретљивост без помоћи већи део дана, али без потпуне самосталности (потребна мања помоћ), способност за ход без одмора или помоћи у дужини од 300 m
5,0	Озбиљан поремећај који ремети свакодневну активност, покретљивост уз помоћ или одмор у дужини од 200 m
5,5	Озбиљан поремећај који у потпуности утиче на све дневне активности, покретљивост уз помоћ или одмор у дужини од 100 m
6,0	Повремена или једнострана, стална помоћ (штап, штака или протеза) за кретање до 100 m са или без одмора
6,5	Неопходна обострана, стална помоћ (штап, штака или протеза) за кретање до 20 m без одмора
7,0	Неспособност за кретање више од 5 m, чак и уз туђу помоћ, неопходна примена инвалидских колица 12 часова дневно, у којима се пацијент самостално креће и обавља редовне активности
7,5	Неспособност за кретање дуже од пар корака, неопходност примена инвалидских колица, може бити потребна помоћ при обављању редовних свакодневних активности
8,0	Пацијент је ограничен на кревет (већи део дана се проводи ван кревета), столицу, или боравак у инвалидским колицима, уз ефикасно коришћење руку и очуване функције личне неге
8,5	Пацијент је већи део дана ограничен на кревет уз минималну ефикасност коришћења руке или руку и изостанак појединих функција личне неге
9,0	Пацијент је беспомоћан у кревету, али може да једе и да контактира са околином
9,5	Неспособност за јело, гутање, као и за нормалну комуникацију, потпуна беспомоћност у кревету
10,0	Смрт изазвана МС

EDSS-проширена скала статуса онеспособљености; m-метар.

IV 2. Узорци

Узорци периферне венске крви су прикупљани у јутарњим часовима, након 12-часовног гладовања. Венепункција је вршена вакуум системом (*Becton Dickinson, Plymouth, England*) у вакутајнере са активатором коагулације (за добијање серума) и у хепаринске вакутајнере (за изоловање плазме). Узорци су центрифугирани на 2500 обр/мин током 15 минута, а затим су плазма и серум одвајани у аликвоте и чувани на -80 °C до спровођења планираних лабораторијских анализа. Непосредно пре извођења анализа, аликвоти серума и плазме су одмрзавани на собној температури.

Концентрације витамина Д, као и основних биохемијских параметара (глукозе, урее, креатинина, укупних протеина, албумина, калцијума, фосфора, триглицерида, укупног холестерола, *HDL*-холестерола, *LDL*-холестерола, аспартат-аминотрансферазе и аланин-аминотрансферазе) су анализирани из серума. *AOPP*, *PAB*, *MDA*, *NO₃* и *NO₂*, *SOD*, *CAT*, *PONI*, *TAS* и *SH*-групе су анализирани из узорка плазме, док су мокраћна киселина, укупни билирубин, феритин и трансферин анализирани из серума.

У Институту за медицинску биохемију ВМА су анализирани: витамин Д, мокраћна киселина, укупни билирубин, феритин, трансферин и основни биохемијски параметри. У Институту за медицинска истраживања ВМА одређени су *MDA*, *NO₃* и *NO₂*, *SOD* и каталаза. Вредности *AOPP*, *PAB*, *PONI*, *TAS* и *SH*-група су одређене на Катедри за медицинску биохемију Фармацеутског факултета у Београду.

IV 3. Одређивање концентрације основних биохемијских параметара

Концентрације глукозе, урее, креатинина, укупних протеина, албумина, калцијума, фосфора, укупног холестерола, *HDL*-холестерола, триглицерида, аспартат-аминотрансферазе (*AST*) и аланин-аминотрансферазе (*ALT*) одређене су спектрофотометријском методом применом комерцијалних тестова на апарату *Advia 1800, Clinical Chemistry Analyzer System (Siemens Healthcare GmbH, Germany)*.

Испитаницима са вредностима триглицерида мањим од 4,5 *mmol/L* је израчуната концентрација *LDL*-холестерола помоћу *Friedwald*-ове формуле:

$LDL\text{-холестерол (mmol/L)} = \text{укупни холестерол (mmol/L)} - HDL\text{-холестерол (mmol/L)} - \text{триглицериди (mmol/L)}/2,22$ (*Friedwald* и сар., 1972).

Ако је концентрација триглицерида била већа од 4,5 *mmol/L*, концентрација *LDL*-холестерола је одређивана директном хомогеном методом.

IV 4. Одређивање концентрације витамина Д

Витамин Д је анализиран у облику 25(*OH*)Д (збир витамина Д2 и Д3), на анализатору *Unicel DxI 800 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)*. У циркулацији, 95 % 25(*OH*)Д је у 25(*OH*)Д3 облику (*Jovicic* и сар., 2012). Коришћена метода одређивања је хемилуминисцентно имуноодређивање на микрочестицама (енг. *Chemiluminescent microparticle immunoassay; CMIA*). Анализа обухвата две фазе које користе принцип компетитивног везивања честица. У првој фази се узорак испитиваног серума меша са супстанцом за ослобађање *VDBP* и парамагнетним честицама које су обложене овчијим моноклонским анти 25(*OH*)Д антителима. Током инкубације 25(*OH*)Д се ослобађа из комплекса са *VDBP* и везује се за моноклонско анти 25(*OH*)Д антитело на чврстој

фази. У следећој фази се додаје коњугат: аналог 25(OH)Д-алкална фосфатаза, који конкурише за везивање са имобилисаним моноклонским анти 25(OH)Д. Након инкубације, материјал који није везан за чврсту фазу се отклања испирањем. Луминисценција је мерење емитоване светлости при враћању супстанце из побуђеног у основно стање (*Cinquanta* и сар., 2017). Након додавања хемилуминисцентног супстрата *Lumi-Phos* 530*, мери се створена светлост. Интензитет створене светлости је обрнуто пропорционалан концентрацији 25(OH)Д у узорку. На основу калибрационе криве одређује се 25(OH)Д концентрација. Резултати су изражени у *nmol/L*.

На одређивање концентрације витамина Д, на апарату *Unicel Dxl 800*, према наводу произвођача, утичу ендогени фактори: хемолиза, иктеричност и липемија. Хемолиза је последица руптуре еритроцита и интензитет хемолизе је пропорционалан концентрацији хемоглобина. Иктеричност одражава концентрација укупног билирубина у узорку. Степен липемије се процењује на основу млечног изгледа узорка и концентрације триглицерида. Концентрација хемоглобина мања од 6 *g/L*, концентрација укупног билирубина нижа од 684 $\mu\text{mol/L}$ и концентрација триглицерида мања од 11,3 *mmol/L* не интерферирају са одређивањем Д витамина.

IV 5. Одређивање параметара оксидативног стреса

Прооксиданси анализирани у истраживању су: *AOPP*, *PAB*, *MDA* и NO_3 и NO_2 . Антиоксидансе чине *SOD*, *CAT*, *PONI*, *TAS*, *SH* групе, укупни билирубин, мокраћна киселина, феритин и трансферин.

Укупна концентрација прооксиданаса и антиоксиданаса репрезентује оксидативно-стресни статус индивидуе.

5.1. Одређивање концентрације протеинских продуката узнапредовале оксидације

Протеински продукти узнапредовале оксидације су мера протеинске оксидације, првенствено албумина (*Żurawska-Plaksej* и сар., 2014). Метода одређивања је спектрофотометрија, са глацијалном сирћетном киселином и калијум-јодидом (*KJ*) (*Witko-Sarsat* и сар., 1996). Пошто на одређивање *AOPP* утиче липемија, ова интерференција се уклања разблажењем узорка фосфатним пуфером (*pH* 7,4) у односу 1:5 и кратком инкубацијом (1 минут). Истовремено се за минимизовање потенцијалне интерференције користи слепа проба узорка. Реакционој смеси се додају глацијална сирћетна киселина и 1,5 М раствор *KJ* и мери се апсорбанција на температури од 37°C и таласној дужина од 340 *nm*. За израду стандардне криве се користи раствор хлорамина Т у фосфатном пуферу (распон концентрација од 10-100 $\mu\text{mol/L}$). Концентрација *AOPP* се чита из стандардне криве и изражава преко хлорамин Т еквивалента ($\mu\text{mol/L}$ хлорамина *T Equiv./L*). Мерење је вршено на *ILAB 300+* биохемијском анализатору (*Instrumentation Laboratory, Lexington, Massachusetts*).

5.2. Одређивање концентрације прооксидативно-антиоксидативног баланса

Прооксидативно-антиоксидативни баланс (*PAB*) истовремено мери прооксиданс (водоник-пероксид) и антиоксидансе (редуценсе типа мокраћне киселине) у узорку, односно мери постојећу равнотежу између њих. Прооксидативно-антиоксидативни баланс је одређен спектрофотометријски са 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМБ) као хромогеном, који реагује и са водоник-пероксидом и са мокраћном киселином, пошто су у истој средини (*Alamdari* и сар., 2007). Ензим пероксидаза катализује реакцију водоник-пероксида са хромогеном, при чему се ствара плаво обојени ТМБ катјон. У следећој фази мокраћна киселина реагује са хромогеном

(реакција није ензимски катализована) и долази до редукције, у претходној реакцији створеног, ТМБ катјона до безбојног једињења. Интензитет боје је пропорционалан концентрацији прооксиданса, док је смањење интензитета боје пропорционално концентрацији антиоксиданса из узорка. Узорак и радни реагенс се инкубирају 12 минута на 37°C , на тамном месту. Реакција се прекида додавањем раствора хлороводоничне киселине (2 mmol/L). Однос узорка, радног реагенса и раствора хлороводоничне киселине је 1:18:4.). Концентрација *PAB* се израчунава из стандардне криве на основу апсорбације узорка на таласној дужини од 450 nm . Стандардни раствор за стандардну криву је смеша различитих односа водоник-пероксида (1 mmol/L) и раствора мокраћне киселине (3 mmol/L). Вредности *PAB* се изражавају у арбитарним јединицама-водоник-пероксид комплементарним јединицама (*HKU*).

5.3. Одређивање концентрације малондиалдехида

Малондиалдехид је терминални производ и маркер липидне пероксидације (*McCracken* и сар., 2000). Пошто је *MDA* тиобарбитурна киселина реагујућа супстанца (енг. *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*; *TBARS*) одређује се са тиобарбитурном киселином (енг. *Thiobarbituric Acid*; *TBA*). Малондиалдехид из узорка реагује са *TBA* реагенсом (у односу 1:2) и ствара комплексно једињење жуте боје, чија се апсорбација мери спектрофотометријски (*Girotti* и сар., 1991). Реагенс *TBA* је реакциона смеша три киселине: 15 % трихлорсирћетне, 0,375 % тиобарбитурне и $0,25\text{ mol/L}$ хлороводоничне киселине. Неопходна је температурна катализа реакције на 95°C , у временском интервалу од 5 минута. Након хлађења и центрифугирања узорка (1 минут на 3.000 обртаја), интензитет апсорбације супернатанта се чита на *ELISA* спектрофотометру (*SynergyHT*, *BioTek*, *SAD*). Концентрација *MDA* се одређује из стандардне криве и изражава се у $\mu\text{mol/L}$. Стандардна крива је направљена из радног стандардног раствора *MDA* концентрације 1 mmol/L додавањем дестиловане воде, односно из серија мерних раствора концентрација 10, 50, 100, 150 и $200\text{ }\mu\text{mol/L}$.

5.4. Одређивање концентрације нитрата и нитрита

Нитрати и нитрити (NO_3 и NO_2) су мера ендогеног стварања прооксиданса, азот-моноксида. Метода одређивања је спектрофотометријска анализа нитрита, по *Peter Griess*-у (*Navarro-Gonzalvez* и сар., 1998).

Прво се врши депротеинизација узорка са 75 mmol/L ZnSO_4 и 55 mmol/L NaOH . Однос између узорка, ZnSO_4 и NaOH износи 15:13:18. Када се заврши процес преципитације протеина (након 10 минута), узорци се центрифугирају. Супернатант се меша са глицин натријум-хидроксид пуфером у односу 60:21.

С обзиром на то да су нитрати у крви присутни у већим концентрацијама од нитрита, као и на немогућност нитрата да реагују са *Griess*-овим реагенсом, помоћу елементарног кадмијума се нитрати из супернатанта редукују до нитрита. Гранулирани елементарни кадмијум се раствара у $0,1\text{M}$ раствору сумпорне киселине. Грануле кадмијума се активирају потапањем (минимум 5 минута) у 5 mmol/L раствору бакар-сулфата у глицин натријум-хидроксид пуферу. У сваки узорак се додају по 2 активирание грануле кадмијума, које на собној температури, за 15-ак минута редукују нитрат. Затим се одвија реакција по *Griess*-у.

У првој реакцији, нитрити из узорка са *Griess I* реагенсом ($0,346\text{ mol/L}$ сулфанилна киселина) у јако киселој средини стварају diaзонијум једињење. У следећој реакцији, настало diaзонијум једињење са *Griess II* реагенсом ($2,1\text{ mmol/L}$ α -нафтиламин) ствара азо-једињење црвенкасто љубичасте боје, чији се интензитет апсорбације мери. Однос припремљеног узорка, *Griess I* и

Griess II реагенса износи 1:1:1. Након инкубације од 30 минута, при мерној таласној дужини од 492 nm и референтној таласној дужини од 650 nm на *ELISA* спектрофотометру (*SynergyHT*, *BioTek*, *SAD*) се чита апсорбанција. Концентрација NO_3 и NO_2 се изражава у $\mu mol/L$.

5.5. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе

Супероксид дизмутаза катализује реакцију аутооксидације супероксидног анјона у водоник-пероксид. Активност укупне супероксид дизмутазе (*SOD*) из плазме је анализирана на спектрофотометру *Ultrospec 2000* (*Pharmacia Biotech, UK*). Метода се заснива на способности *SOD* да у базној средини инхибира спонтану аутооксидацију адреналина (*Sun* и *Zigman*, 1978). Активност укупне *SOD* је одређена кинетички, као промена апсорбанције у времену (10 минута) на таласној дужини од 480 nm. Реакциона смеша обухвата узорак, натријум бикарбонатни пуфер и адреналин ($pH=10,2$) у односу 1:57:2. Реакција се кинетички прати од момента додавања адреналина, а промена апсорбанције се мери у временском распону од 5-8 минута, односно када реакција постане линеарна. Активност *SOD* се изражава степеном инхибиције аутооксидације адреналина. Једна јединица *SOD* за 50 % инхибира аутооксидацију адреналина. Активност укупне *SOD* се изражава у јединицама по литру (*U/L*).

5.6. Одређивање активности каталазе

Каталаза разлаже токсични водоник-пероксид на молекул кисеоника и на воду. Активност *CAT* је одређена спектрофотометријском методом (*Goth* и сар., 1991). Супстрат за каталазу, водоник-пероксид, са амонијум молибдатом ствара жути комплекс чија се апсорбанција мери (405 nm) на спектрофотометру *Ultrospec 2000*. Прво се узорак 1 минут инкубира са H_2O_2 у натријум-калијум-фосфатном пуферу ($pH=7,2$) у односу 1:5 (100 μL плазме и 400 μL пуфера). Дејство *CAT* из узорка на H_2O_2 из реагенса се зауставља додавањем амонијум молибдата (у односу 1:5). Јединица активности *CAT* је број μmol -ова H_2O_2 редукованих у минути ($\mu mol H_2O_2/мин$). Активност ензима каталазе се изражава у јединицама по литру (*U/L*).

5.7. Одређивање активности параоксоназе 1

Параоксоназа 1 је ензим који смањује липидну пероксидацију разлагањем производа липидне пероксидације у *HDL* и *LDL* честицама (*Corsetti* и сар., 2019). Активност параоксоназе 1 је одређена према супстрату параоксон, односно анализирана је параоксоназна активност. Параоксоназа 1 (*PONI*) у базној средини конвертује параоксон до *p*-нитрофенола, чија се апсорбанција мери на 405 nm (*Richter* и *Furlong*, 1999). Брзина стварања *p*-нитрофенола се прати кинетички у току 3 минута и рачуна се промена апсорбанције у минути. Базну средину омогућава 1 mol/L *TRIS-HCl* пуфер ($pH=8,5$). Мерење је вршено на *ILAB 300+* биохемијском анализатору. Активност *PONI* се изражава као μmol створеног *p*-нитрофенола/*min/L*, односно као *U/L*.

5.8. Одређивање концентрације тоталног антиоксидативног статуса

Тотални антиоксидативни статус (*TAS*) представља групу антиоксиданаса, у којој највећи део чине *SH*-групе и мокраћна киселина, а у мањој мери и витамин Ц, укупни билирубин и Е витамин. Концентрација *TAS* је одређена методом по *Erel*-у (*Erel Ozcan*, 2004). Као хромоген се користи 2,2-азинобис-(3-етилбензоатиазолидин)-6-сулфонат (*ABTS*) катјон који се у присуству антиоксиданаса (из узорка) редукује до безбојног облика што се манифестује смањењем интензитета боје *ABTS* раствора. Интензитет боје је обрнуто сразмеран концентрацији присутних антиоксиданаса у узорку и мери се на 660 nm. Реагенси за одређивање *TAS* су *TAS 1*

(ацетатни пуфер, $pH=5,8$) и *TAS 2* (раствор *ABTS*) који се у анализи користе у односу 1:3:16 (узорак: *TAS 2*: *TAS 1*). Као стандард се употребљава хидросолубилни еквивалент витамина Е, *Trolox* (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина), који се услед тешког растварања у води припрема растварањем у фосфатном пуферу. На основу измерених апсорбација стандарда и њихових познатих концентрација, конструира се калибрациона крива. Из калибрационе криве се добијају концентрације *TAS* у узорцима. Мерење је вршено на *ILAB 300+* биохемијском анализатору на 620 nm . Добијени резултати су изражени у $mmol/L$ *Trolox* еквивалента.

5.9. Одређивање садржаја сулфхидрилних група

Сулфхидрилне групе (*SH*) потичу из протеина плазме и представљају моћан неензимски антиоксиданс јер се лако оксидују до дисулфида и отпуштају електрон који стабилизује слободни радикал (*Balcerzyk* и сар., 2003). Концентрација *SH* група је одређена методом по *Ellman*-у (*Ellman GL*, 1959). Метода се заснива на реакцији алифатичних тиола присутних у узорку са 2,2'-динитро-5,5'-дитио-бензојевом киселином (*DTNB*) из реагенса. Средина је базна, услед чега се поред *DTNB* реагенса, користи и фосфатни пуфер ($0,2\text{ mol/L K}_2\text{HPO}_4$, 2 mmol/L EDTA , $pH=9$). Однос *DTNB* реагенса, узорка и фосфатног пуфера износи 1:2,5:45. Ствара се жуто обојени *p*-нитро фенол (један мол тиола даје 1 мол *p*-нитро фенола). Интензитет жуте боје одређује интензитет апсорбације, односно садржај сулфхидрилних група. Апсорбација је мерена на 412 nm , на *ILAB 300 +* биохемијском анализатору. Као стандард се користи водени раствор редукованог глутатиона. Прво се прави раствор 1 mmol/L глутатиона, од кога се са дестилованом водом праве стандарди нижих концентрација, тако да стандардна крива покрива опсег концентрација од $0,1$ до 1 mmol/L . Из стандардне криве се на основу добијене апсорбације израчунава концентрација *SH* група и изражава у $mmol/L$.

5.10. Одређивање концентрације укупног билирубина

Укупни билирубин је ендогени антиоксиданс који спречава липидну пероксидацију и протективно делује на оксидацију мембранских протеина. Укупни билирубин је одређен спектрофотометријском методом крајње тачке (енг. *End Point*), на биохемијском анализатору *ADVIA 1800, Clinical Chemistry Analyzer System (Siemens Healthcare GmbH, Germany)*. Као оксидационо средство за оксидацију укупног билирубина је коришћен ванадат. У киселој средини ($pH = 2,9$) у присуству детерџента и ванадата из реагенса, укупни билирубин се оксидује у биливердин. Ова оксидација узрокује смањење апсорбације иницијално жуте боје, карактеристичне за билирубин. Даљом оксидацијом биливердина настаје безбојни производ чији се интензитет апсорбације чита на мерној таласној дужини од 451 nm и на референтној таласној дужини од 545 nm . На основу измерене апсорбације укупног билирубина, из конструисане калибрационе криве се добија концентрација укупног билирубина и изражава се у $\mu mol/L$.

Укупан билирубин, мерен у нашем истраживању је збир директног билирубина (билирубина коњугованог са глукуронском киселином) и индиректног билирубина (слободног, некоњугованог, токсичног, хидрофобног молекула који се у плазми транспортује везан за албумин). На одређивање укупног билирубина на апарату *ADVIA 1800* утичу хемолиза, липемија и концентрација аскорбинске киселине. На одређивање укупног билирубина не утичу концентрације хемоглобина до 10 g/L , триглицерида мање од $8,5\text{ mmol/L}$ и концентрације аскорбинске киселине до $2,8\text{ mmol/L}$.

5.11. Одређивање концентрације мокраћне киселине

Мокраћна киселина је ендогени антиоксиданс који редукује концентрацију изразито токсичног пероксинитрита. Концентрација мокраћне киселине у серуму је одређена ензимски, методом крајње тачке (енг. *End Point*) на биохемијском анализатору *ADVIA 1800, Clinical Chemistry Analyzer System (Siemens Healthcare GmbH, Germany)*.

Каталитичким дејством ензима уриказе мокраћна киселина из узорка се оксидује до алантоина, при чему се ствара водоник-пероксид. Створени водоник-пероксид са 4-аминофеназоном и *TOOS [N-етил-N-(2-хидрокси-3-сулфопропил)-3-метиланилин]* под каталитичким дејством пероксидазе ствара обојени хинонимим. Боја насталог хинонимина је пропорционална концентрацији мокраћне киселине у узорку. Реагенс 1 садржи *TOOS*, а у реагенсу 2 су присутни 4-аминофеназон, пероксидаза и уриказе. Апсорбанција се чита на мерној таласној дужини од 545 nm и референтној таласној дужини од 694 nm. Из калибрационе криве се на основу добијене апсорбанције израчунава концентрација мокраћне киселине у узорку и изражава у $\mu\text{mol/L}$.

На одређивање мокраћне киселине на апарату *ADVIA 1800* утиче и природа узорка, односно хемолиза, липемија и иктеричност (концентрација укупног билирубина). Концентрације хемоглобина мање од 5,25 g/L, триглицерида мање од 7,35 mmol/L и укупног билирубина до 513 $\mu\text{mol/L}$ не интерферирају са одређивањем мокраћне киселине.

5.12. Одређивање концентрације феритина

Феритин је депо гвожђа у организму који везујући гвожђе спречава Фентонову реакцију и стварање слободних радикала. Одређивање феритина у серуму је вршено имунонефелометријском методом на апарату *Siemens Dade Behring BN II Nephelometer (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. Erlangen, Germany)*. Реагенс за анализу феритина представља суспензију полистиренских честица импрегнираних антиферитин антителима. Иницијални реагенс је макромолекул који не расипа светлосне зраке. У реакцији феритина из узорка са антиферитин антителима из реагенса долази до стварања агрегата који расипају светлост. Интензитет расуте светлости је пропорционалан концентрацији феритина у узорку. Концентрација феритина се читава из калибрационе криве и изражава у $\mu\text{g/L}$. На одређивање феритина на апарату *Siemens Dade Behring BN II Nephelometer* утиче концентрација реуматоидног фактора већа од 2800 IU/mL.

5.13. Одређивање концентрације трансферина

Трансферин је антиоксиданс који транспортује (везује) гвожђе и смањујући концентрацију слободног гвожђа, редукује и његове токсичне ефекте. Трансферин је анализиран имунонефелометријски, на апарату *Siemens Dade Behring BN II Nephelometer (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. Erlangen, Germany)*. Антитела на трансферин, присутна у реагенсу, са трансферином из узорка стварају имунски комплекс који расипа светлосне зраке. Интензитет расуте светлости је пропорционалан концентрацији трансферина. На основу измерене апсорбанције, из калибрационе криве је прочитана концентрација трансферина. Резултати су изражени у g/L. На одређивање трансферина на апарату *Siemens Dade Behring BN II Nephelometer*, по наводу произвођача, утичу хемолиза, липемија и иктеричност. Концентрације хемоглобина мање од 10 g/L, триглицерида мање од 8,2 mmol/L и укупног билирубина до 1026 $\mu\text{mol/L}$ не интерферирају са одређивањем трансферина.

IV 6. Врста истраживања, величина узорка и статистичка обрада података

Истраживање, по типу студије пресека, спроведено је у периоду од јануара 2017. до децембра 2017. године. Величина узорка је израчуната у складу с прорачуном потребне снаге студије. Прорачун је извршен на основу резултата публикованих студија имајући у виду добијене разлике у параметрима оксидативног стреса (активност ензима параоксоназе-1 и концентрације укупних сулфхидрилних група) и витамина Д. Снага студије за узорак од минимално 56 испитаника у свакој од испитиваних група (контрола, пацијенти) за ниво значајности 0,05 и Кохранов ефекат величине ($f=0,3$) је 80 %.

Све статистичке анализе су рађене у *GraphPad 5 Prisma* статистичком програму. Испитивање нормалности дистрибуције података је вршено Шапиро-Вилк тестом. Континуирани подаци су представљени као аритметичке средње вредности и стандардне девијације, уколико је расподела следила нормалан ток. Код параметара код којих је расподела података нормално дистрибуирана након логаритмовања вредности, резултати су приказани као геометријске средње вредности и 95 % интервали поузданости. Варијабле чија расподела није нормално дистрибуирана ни након логаритамске трансформације су представљене као медијане и 25-75. перцентил. Поређење података је вршено Студентовим т-тестом за податке који следе нормалну расподелу, као и за податке који следе нормалну расподелу након логаритмовања вредности. Ман Витни тест је коришћен за утврђивање статистичке значајности разлике параметара који немају нормалну дистрибуцију. Категорички подаци су приказани као апсолутне фреквенце, а разлика између њих је тестирана Хи квадрат тестом.

За утврђивање корелације између испитиваних варијабли коришћене су Спирманова непараметарска и Пирсонова параметарска корелација, у зависности од нормалности дистрибуције. Униваријантна и мултиваријантна мултипла регресиона анализа је употребљена за идентификовање независних предиктора појединих параметара.

У циљу процене дијагностичне тачности параметара коришћене су *Receiver Operating Characteristics (ROC)* анализе.

Разлике су сматране статистички значајним ако је p (снага поређења) мања или једнака 0,05 (*), високо значајним ако је p мање или једнако 0,01 (**), и веома високостатистички значајним ако је p мање или једнако 0,001 (***)

V РЕЗУЛТАТИ

V 1. Поређење пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника

1.1. Демографске и клиничке карактеристике пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника

У истраживању је учествовало 178 пацијената са мултиплом склерозом и 80 здравих испитаника. У Табели 2 су приказани демографски и клинички подаци пацијената оболелих од мултипле склерозе и здравих испитаника.

Табела 2: Демографске и клиничке карактеристике пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника

Параметар	Контролна група	Мултипла склероза	<i>p</i>
Број испитаника	80	178	
Старост (године)	39,3 ± 9,0	40,9 ± 9,8	0,187
Пол, м/ж	36/44	85/93	0,682
Трајање болести (у годинама) [#]	/	8,0 (5,0-13,0)	/
<i>EDSS</i> [#]	/	2,5 (1,5-4,1)	/
Број релапса по години [#]	/	0,3 (0,2-0,6)	/
Суплементација витамином Д (да/не)	0/80	112/66	<0,001
<i>DMT</i> (да/не)	/	132/46	
Пушење (да/не)	31/49	59/119	0,382

Резултати су представљени као средње вредности ± стандардне девијације за континуиране податке који прате нормалну расподелу, односно као апсолутне фреквенце за категоричке податке. [#]Подаци који нису нормално дистрибуирани су представљени као медијана и интерквartilни распон. Континуиране променљиве које следе нормалну расподелу су поређене Студентовим т-тестом, док су варијабле које нису нормално дистрибуиране поређене Ман Витни тестом. Поређење категоричких података је вршено Хи квадрат тестом. *EDSS*-проширена скала статуса онеспособљености; *DMT*-терапија која модификује природан ток болести.

На основу статистичке анализе, утврђено је да су оболели од МС и контролна група упарени према годинама, полу и пушачком статусу, а да се разликују по примени витамина Д ($p < 0,001$).

1.2. Биохемијски параметри пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника

Резултати биохемијских параметара пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника су приказани у Табели 3.

Табела 3: Основни биохемијски параметри пацијената са мултиплом склерозом и контролне групе

Параметар	Контролна група	Мултипла склероза	<i>p</i>
Глукоза (<i>mmol/L</i>)*	5,2 (4,9-5,5)	5,0 (4,7-5,6)	0,061
Уреа (<i>mmol/L</i>)*	4,6 (3,8-5,6)	4,7 (3,9-5,9)	0,302
Креатинин ($\mu\text{mol/L}$)*	74,0 (71,3-77,8)	64,0 (55,0-73,5)	<0,01
Укупни протеини (<i>g/L</i>)*	74,0 (71,3-77,8)	72,0 (69,0-75,0)	<0,01
Албумин (<i>g/L</i>)*	48,0 (44,0-49,0)	45,0 (43,0-47,0)	<0,001
Калцијум (<i>mmol/L</i>)	2,43 ± 0,11	2,36 ± 0,09	<0,001
Фосфор (<i>mmol/L</i>)*	1,10 (1,00-1,20)	1,10 (1,00-1,20)	0,220
Триглицериди (<i>mmol/L</i>) [#]	1,0 (0,9-1,2)	1,2 (1,1-1,3)	<0,05
Укупни холестерол (<i>mmol/L</i>)	4,9 ± 0,8	5,3 ± 1,0	<0,05
<i>HDL</i> -холестерол (<i>mmol/L</i>)	1,59 ± 0,44	1,45 ± 0,31	<0,01
<i>LDL</i> -холестерол (<i>mmol/L</i>)	2,8 ± 0,4	3,1 ± 0,9	<0,05
<i>AST</i> (<i>U/L</i>)*	21 (18-25)	20 (18-24)	0,170
<i>ALT</i> (<i>U/L</i>)*	19 (14-27)	19 (15-26)	0,770

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација за податке који су нормално дистрибуирани. [#]Подаци који након логаритмовања следе нормалну расподелу су представљени као геометријска средња вредност и 95 % интервал поузданости. *Подаци који не прате нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Студентов *t*-тест је коришћен за поређење променљивих са нормалном расподелом, односно Ман Витни тест је коришћен за утврђивање разлике између параметара који нису нормално дистрибуирани. *AST*-аспартат аминотрансфераза; *ALT*-аланин аминотрансфераза

Концентрације креатинина ($p < 0,01$), укупних протеина ($p < 0,01$), албумина ($p < 0,001$), калцијума ($p < 0,001$) и *HDL*-холестерола ($p < 0,01$), су биле значајно ниже, док су концентрације триглицерида ($p < 0,05$), холестерола ($p < 0,05$) и *LDL*-холестерола ($p < 0,05$) биле значајно више код пацијената са мултиплом склерозом у поређењу са контролном групом. Концентрације глукозе, урее, фосфора, *AST* и *ALT* се нису статистички разликовале између пацијената са мултиплом склерозом и контролне групе.

1.3. Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника

Резултати испитивања параметара оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника су приказани у Табели 4.

Табела 4: Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника

Параметар	Контролна група	МС пацијенти	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)*	26,1 (21,3-33,6)	22,5 (18,5-26,8)	<0,001
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)*	52,5 (39,1-72,0)	145,5 (104,2-190,0)	<0,001
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)*	8,3 (7,1-9,1)	8,9 (7,3-11,0)	<0,01
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)*	2,6 (2,0-3,4)	4,5 (3,4-5,7)	<0,001
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)*	374 (311-444)	743 (615-939)	<0,001
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	14,8 ± 0,81	15,4 ± 1,7	<0,01
<i>PONI</i> (<i>U/L</i>)*	489 (312-847)	268 (159-543)	<0,001
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)*	1319 (1189-1411)	960 (727-1096)	<0,001
<i>SH</i> групе (<i>mmol/L</i>)*	0,51 (0,45-0,56)	0,30 (0,20-0,39)	<0,001
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)*	12 (8-16)	10 (7-12)	<0,01
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)*	295 (229-349)	261 (215-307)	<0,01
Феритин ($\mu\text{g/L}$) [#]	32,3 (25,5-40,9)	46,2 (40,1-53,2)	<0,05
Трансферин (<i>g/L</i>) [#]	2,7 (2,4-3,0)	2,6 (2,2-2,9)	<0,05

Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација за податке који следе нормалну расподелу. [#]Подаци који су након логаритмовања нормално дистрибуирани су приказани као геометријска средња вредност и 95 % интервал поузданости. *Подаци који не прате нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Студентов т-тест је коришћен за поређење променљивих које следе нормалну расподелу, односно Ман Витни тест је коришћен за утврђивање разлике између параметара који нису нормално дистрибуирани. *AOPP*-протеински производи узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PONI*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Вредности *AOPP* ($p < 0,001$), *PONI* ($p < 0,001$), *TAS* ($p < 0,001$), *SH*-група, ($p < 0,001$), укупног билирубина ($p < 0,01$), мокраћне киселине ($p < 0,01$) и трансферина ($p < 0,05$) су биле значајно ниже, док су концентрације *PAB* ($p < 0,001$), *MDA* ($p < 0,01$), *NO₃* и *NO₂* ($p < 0,001$), *SOD* ($p < 0,001$), *CAT* ($p < 0,01$) и феритина ($p < 0,05$) биле значајно више код пацијената са МС у односу на контролну групу.

1.4. Витамин Д у серуму пацијената са мултиплом склерозом и здравих испитаника

Концентрације витамина Д у серуму пацијената оболелих од мултипле склерозе и здравих испитаника (контролне групе) су приказане у Табели 5.

Табела 5: Концентрација витамина Д у серуму пацијената са мултиплом склерозом и испитаника из контролне групе пре прилагођавања вредности због суплементације витамином Д

Параметар	Контролна група	МС пацијенти	<i>p</i> ^a
Витамин Д (<i>nmol/L</i>)	57,3 ± 8,1	88,9 ± 5,4	0,001

Подаци су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

^a Студентов т-тест

Неочекивано, вредност витамина Д је била значајно већа код МС пацијената у поређењу са контролном групом. Међутим, већина пацијената са мултиплом склерозом (112 пацијената од укупно 178) је на суплементацији витамином Д. С друге стране, у контролној групи, нико од испитаника није на витамин Д суплементацији. Хи квадрат тест показује статистички значајну разлику између оболелих од мултипле склерозе и контролне групе у погледу суплементације витамином Д ($p < 0,001$) (Табела 2). Услед тога, рађено је прилагођавање (енг. *Adjustment*) вредности витамина Д како за контролну групу, тако и за групу пацијената са МС.

Резултати добијени након прилагођавања концентрације витамина Д услед суплементације витамином Д су приказани у Табели 6.

Табела 6. Вредности витамина Д код МС пацијената и контролне групе након прилагођавања вредности услед суплементације витамином Д

Параметар	Контролна група	МС пацијенти	p^a
Витамин Д (nmol/L)	93,5 ± 8,3	72,7 ± 5,1	< 0,05

Подаци су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

^a*pairwise comparisons*

Након прилагођавања, концентрација витамина Д код здравих испитаника је значајно већа у односу на оболеле од мултипле склерозе ($p < 0,05$).

V 2. Поређење клиничких и биохемијских параметара пацијената оболелих од мултипле склерозе у зависности од фазе болести (у ремисији и релапсу)

2.1. Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код пацијената са мултиплом склерозом у зависности од фазе болести (ремисије и релапса)

У истраживању су учествовали МС пацијенти у клиничкој фази ремисије и у клиничкој фази релапса. Основни демографски и клинички подаци МС пацијената током релапса и током ремисије су приказани у Табели 7.

Табела 7: Основни демографски и клинички подаци пацијената са МС у ремисији и у релапсу

Параметар	МС ремисија	МС релапс	p
Број испитаника	117	61	
Старост (године)	41,9 ± 9,1	39,2 ± 10,9	0,190
Пол, м/ж	61/56	24/37	0,116
Трајање болести (године)#	6,0 (3,0-10,5)	9,0 (5,0-14,0)	<0,001
EDSS [#]	2,0 (1,0-3,5)	3,5 (2,5-5,0)	<0,001
Број релапса по години [#]	0,3 (0,2-0,4)	0,5 (0,3-1,3)	<0,001
Суплементација витамином Д (да/не)	69/48	43/18	0,131
DMT (да/не)	110/7	22/39	<0,001
Пушење (да/не)	42/75	17/44	0,280

Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација за континуиране податке који следе нормалну расподелу, односно као апсолутне фреквенце за категоричке податке. [#]Подаци који не следе нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Континуиране променљиве које су нормално дистрибуиране су поређене Студентовим т-тестом, док променљиве које не прате нормалну расподелу су поређене Ман Витни тестом. Поређење категоричких података је вршено Хи квадрат тестом. EDSS-проширена скала статуса онеспособљености; DMT-терапија која модификује природан ток болести

Код МС пацијената у фази релапса болест је дуже присутна ($p < 0,001$), *EDSS* је већи ($p < 0,001$), као и учесталост релапса ($p < 0,001$), у односу на пацијенте у фази ремисије. Такође, утврђена је статистички значајна разлика у односу на терапију за МС: док је 94 % (110 од укупно 117) пацијената у ремисији на *DMT*, само 36,1 % (22 од укупно 61) пацијената у релапсу је на *DMT* ($p < 0,001$). МС пацијенти у релапсу се не разликују по годинама, полу и по суплементацији витамином Д од пацијената у ремисији.

Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите оболелих од МС у односу на клиничку фазу болести су приказани у Табели 8.

Табела 8. Параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите код МС испитаника у фази ремисије и у фази релапса

Параметар	МС Ремисија	МС Релапс	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	23,2 (18,6-28,9)	21,8 (16,6-26,6)	0,295
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>) [#]	146 (103-187)	145 (113-192)	0,293
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	8,9 (7,3-10,5)	9,3 (7,3-11,1)	0,157
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)	4,5 (3,4-5,7)	4,8 (3,4-5,6)	0,625
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>) [#]	740 (615-917)	747 (593-1044)	0,412
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>) [#]	15,4 ± 1,6	15,5 ± 1,3	0,391
<i>PONI</i> (<i>U/L</i>) [#]	256 (157-544)	278 (161-544)	0,831
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	960 (781-1098)	962 (677-1097)	0,561
<i>SH</i> групе (<i>mmol/L</i>)	0,31 (0,20-0,40)	0,29 (0,21-0,36)	0,326
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)	10 (7-13)	9 (7-12)	0,260
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	270 (257-283)	257 (241-274)	0,904
Феритин ($\mu\text{g/L}$) [*]	55,3 (29,5-96,4)	39,2 (26,9-93,1)	0,359
Трансферин (<i>g/L</i>)	2,6 (2,3-2,9)	2,5 (2,2-2,9)	0,222

Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација за податке који следе нормалну расподелу. [#]Подаци који су након логаритмовања нормално дистрибуирани су приказани као геометријска средња вредност и 95 % интервал поузданости. ^{*}Подаци који не прате нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Студентов *t*-тест је коришћен за поређење променљивих које следе нормалну расподелу, односно Ман Витни тест је коришћен за утврђивање разлике између параметара који нису нормално дистрибуирани. *AOPP*-протеински производи узапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PONI*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Није утврђена статистички значајна разлика у параметрима оксидативно-стресног статуса између пацијената оболелих од мултипле склерозе током ремисије и током релапса.

2.2. Концентрација витамина Д у серуму код пацијената оболелих од мултипле склерозе током ремисије и релапса

Концентрације витамина Д у серуму код оболелих од МС у фази ремисије и у фази релапса су приказане у Табели 9.

Табела 9. Вредности витамина Д код оболелих од МС током ремисије и током релапса

Параметар	МС Ремисија	МС Релапс	<i>p</i> ^a
Витамин Д (<i>nmol/L</i>)	88,0 ± 6,6	102,2 ± 9,2	0,103

Подаци су приказани као средња вредност ± стандардна девијација

^a*pairwise comparisons*

Након статистичке анализе података, утврђено је да не постоји значајна разлика у концентрацији витамина Д током ремисије и релапса ($p=0,103$).

Од 61 МС пацијента у фази релапса, 43 је на суплементацији витамином Д, док 18 пацијената не узима витамин Д. Такође, од 117 пацијената у фази ремисије, 69 јесте, док 48 није на суплементацији витамином Д. Резултати Хи квадрат теста у Табели 7 показују да не постоји статистички значајна разлика између пацијената у релапсу и ремисији у погледу суплементације витамином Д ($p=0,131$). Ипак, пошто релапс и ремисија представљају окосницу истраживања, урађено је прилагођавање (енг. *Adjustment*) вредности витамина Д за МС пацијенте у фази ремисије и у фази релапса. Добијени резултати су приказани у Табели 10.

Табела 10. Концентрација витамина Д код МС пацијената током ремисије и релапса, након прилагођавања (енг. *Adjustment*) вредности витамина Д због суплементације витамином Д

Параметар	МС Ремисија	МС Релапс	p^a
Витамин Д ($nmol/L$)	$67,3 \pm 6,1$	$83,4 \pm 8,4$	0,111

Подаци су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација

^a*pairwise comparisons*

Након прилагођавања (енг. *Adjustment*) вредности витамина Д, установљено је да нема статистички значајне разлике у концентрацији витамина Д код МС пацијената током релапса и током ремисије ($p=0,111$).

V 3. Утицај витамина Д на оксидативни стрес код оболелих од мултипле склерозе

На основу суплементације витамином Д, МС пацијенти су подељени у 2 групе: групу без суплементације и на групу која је на суплементацији витамином Д. Основни демографски и клинички подаци МС пацијената у односу на суплементацију витамином Д су приказани у Табели 11.

Табела 11. Основни демографски и клинички подаци у групи оболелих од МС са и без суплементације витамином Д

Параметар	МС пацијенти без суплементације витамином Д	МС пацијенти са суплементацијом витамином Д	p
Број испитаника	66	112	
Старост (године)	$43,2 \pm 9,2$	$39,7 \pm 9,3$	<0,05
Пол, м/ж	28/38	57 /55	0,682
Релапс/ремисија	18/48	43/69	0,144
Трајање болести (у годинама) [#]	10,0 (7,0-15,0)	6,0 (4,0-11,0)	<0,001
EDSS [#]	2,0 (1,5-4,5)	2,5 (1,5-4,1)	0,361
Број релапса по години (ARR) [#]	0,3 (0,2-0,6)	0,4 (0,2-0,7)	0,460
DMT (да/не)	54/12	78/34	0,073
Пушење (да/не)	26/40	33/79	0,174

Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација за континуиране податке који следе нормалну расподелу, односно као апсолутне фреквенце за категоријске податке. [#]Подаци који не прате нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Поређење је вршено Студентовим т-тестом и Ман Витни тестом. Категоријски подаци су поређени Хи квадрат тестом. EDSS-проширена скала статуса онеспособљености; DMT-терапија која модификује природан ток болести.

Статистички значајна разлика између испитаника са и без суплементације витамина Д је утврђена у годинама старости ($p < 0,05$) и у дужини трајања МС ($p < 0,001$), са старијом популацијом и дужим трајањем болести код МС пацијената без суплементације. Није утврђена статистички значајна разлика у односу на пол, фазу болести, дужину трајања болести, вредност *EDSS*, учесталост релапса, употребу *DMT* или пушачки статус.

Утицај витамина Д на оксидативни стрес је анализиран посебно код МС пацијената са и без суплементације витамином Д. За утврђивање повезаности концентрације витамина Д у серуму и параметара оксидативног стреса коришћена је корелациона анализа. Резултати ових анализа су приказани у табелама 12 и 13.

У МС групи која није на суплементацији витамином Д, концентрације *PAB*, NO_3 и NO_2 , *SH*-група, мокраћне киселине и трансферина су нормално дистрибуиране, док вредности *AOPP*, *MDA*, укупног билирубина, феритина, као и *SOD* прате нормалну расподелу након логаритамске трансформације. Услед тога је код ових параметара примењена Пирсонова корелациона анализа. С друге стране, активности каталазе и параоксоназе 1, као и концентрација *TAS* нису нормално дистрибуиране ни након логаритмовања, услед чега је примењена Спирманова корелациона анализа.

Табела 12. Корелациона анализа концентрације витамина Д и параметара оксидативно-стресног статуса у МС групи без суплементације витамином Д.

Параметар	Витамин Д (<i>nmol/L</i>)	
	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,800	0,525
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	0,222	0,073
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,282	<0,05
NO_3 и NO_2 ($\mu\text{mol/L}$)	0,289	<0,05
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)	-0,206	0,097
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	0,046 [#]	0,713
<i>PON1</i> (<i>U/L</i>)	-0,061 [#]	0,624
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,088 [#]	0,484
<i>SH</i> -групе (<i>mmol/L</i>)	-0,103	0,412
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)	-0,174	0,163
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	0,138	0,269
Феритин ($\mu\text{g/L}$)	-0,050	0,688
Трансферин (<i>g/L</i>)	0,060	0,633

r-Пирсонов коефицијент корелације (ако није другачије назначено)

[#]-Спирманов коефицијент корелације

AOPP-протеински производи узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; NO_3 и NO_2 -нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PON1*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Статистичком обрадом података, у групи МС пацијената без суплементације витамином Д, утврђена је позитивна корелација витамина Д са NO_3 и NO_2 ($r=0,289$; $p < 0,05$), као и негативна корелација витамина Д и *MDA* ($r = -0,282$; $p < 0,05$).

Код МС пацијената на суплементацији витамином Д, за ниво витамина Д коришћена је логаритмована вредност витамина Д јер је расподела далеко од нормалне. Пошто

концентрација витамина Д не показује нормалну дистрибуцију ни након логаритамске трансформације, за испитивање односа витамина Д и параметара ОС коришћена је Спирманова корелациона анализа. Резултати Спирманове корелационе анализе су приказани у Табели 13.

Табела 13. Корелациона анализа логаритмоване вредности витамина Д и параметара ОС код МС пацијената на суплементацији витамином Д

Параметар	<i>log</i> вит. Д (<i>nmol/L</i>)	
	<i>ρ</i>	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,243	<0,01
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	-0,140	0,141
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,121	0,205
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,061	0,525
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)	-0,098	0,301
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	-0,055	0,564
<i>PON1</i> (<i>U/L</i>)	-0,029	0,755
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,104	0,277
<i>SH</i> -групе (<i>mmol/L</i>)	-0,013	0,895
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)	0,018	0,849
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	0,117	0,221
Феритин ($\mu\text{g/L}$)	-0,009	0,317
Трансферин (<i>g/L</i>)	-0,163	0,085

ρ -Спирманов коефицијент корелације

AOPP-протеински производи узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PON1*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Код МС пацијената на витамин Д суплементацији утврђена је значајна негативна корелација између логаритмоване вредности витамина Д и *AOPP* ($\rho = -0,243$; $p < 0,01$).

3.1. Испитивање независног утицаја витамина Д на параметре ОС код оболелих од мултипле склерозе

У групи МС пацијената без суплементације витамином Д установљена је предиктивна способност витамина Д на *MDA*, као и на *NO₃* и *NO₂*.

Утврђено је да параметри ОС зависе од година, пола, пушења и од *DMT*. Управо због тога, анализиран је утицај пола, старости, пушења, примене *DMT*, али и клиничких карактеристика болести на предикцију витамина Д на *NO₃* и *NO₂*, као и на *MDA*. Од клиничких карактеристика болести проучаван је ефекат дужине трајања МС, вредности *EDSS* и учесталости релапса.

Линеарна регресиона анализа је спроведена појединачно за сваку независну варијаблу. Пронађено је да однос витамина Д са *NO₃* и *NO₂* не зависи од пола ($p=0,279$; $\beta = -0,131$), старости ($p=0,417$; $\beta = -0,099$), пушења ($p=0,606$; $\beta = -0,063$), дужине трајања МС ($p=0,160$; $\beta = -0,170$), *EDSS* ($p=0,511$; $\beta = -0,087$), *DMT* ($p=0,715$; $\beta = -0,044$), као ни од броја релапса по години ($p=0,361$; $\beta = 0,114$). Такође, резултати показују да пол ($p=0,438$; $\beta = -0,094$), старост ($p=0,435$; $\beta = 0,095$), пушење ($p=0,366$; $\beta = -0,110$), дужина трајања МС ($p=0,579$; $\beta = -0,068$), *EDSS* ($p=0,175$; $\beta = 0,178$), *DMT* ($p=0,446$; $\beta = -0,093$), као ни учесталост релапса ($p=0,989$; $\beta = 0,002$) не избацују витамин Д као *MDA* предиктор.

Код МС пацијената који користе суплементацију витамином Д, утврђена је предиктивна вредност *log* витамина Д на *AOPP*. Појединачном линеарном регресијом показано је да однос логаритмоване вредности витамина Д и *AOPP* не зависи од пола ($p=0,494$, $\beta= -0,064$), старости ($p=0,076$, $\beta=0,166$), пушења ($p=0,062$, $\beta= 0,231$), дужине трајања МС ($p=0,670$, $\beta= 0,040$), *EDSS* ($p=0,155$, $\beta=0,133$), примењене МС терапије-*DMT* ($p=0,983$, $\beta=-0,002$), као ни од учесталости релапса ($p=0,073$, $\beta=-0,168$).

3.2. Утицај витамина Д на оксидативни стрес код оболелих од мултипле склерозе у зависности од фазе болести

Надаље, испитана је корелација витамина Д и параметара ОС код МС пацијената током ремисије и током релапса. И у фази релапса, као и у фази ремисије, статистичка анализа је вршена у односу на суплементацију витамином Д. Примењена је Пирсонова корелациона анализа.

Повезаност витамина Д и параметара ОС код МС пацијената током релапса без суплементације витамином Д, као ни са суплементацијом витамином Д нису биле статистички значајне (резултати нису приказани).

С друге стране, након испитивања односа витамина Д и параметара ОС код МС пацијената у ремисији, без суплементације витамином Д, добијене су статистички значајне корелације. Резултати су приказани у Табели 14.

Табела 14. Корелациона анализа витамина Д и параметара ОС код МС пацијената у ремисији, без суплементације витамином Д

Параметар	Витамин Д (<i>nmol/L</i>)	
	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,066	0,656
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	0,203	0,104
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,341	<0,05
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,389	<0,01
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)	-0,143	0,334
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	-0,025	0,865
<i>PON1</i> (<i>U/L</i>)	-0,219	0,134
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,118	0,426
<i>SH</i> -групе (<i>mmol/L</i>)	-0,199	0,190
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)	-0,054	0,714
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	0,131	0,376
Феритин ($\mu\text{g/L}$)	0,098	0,501
Трансферин (<i>g/L</i>)	0,106	0,474

r- Пирсонов коефицијент корелације

AOPP-протеински продукти унапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PON1*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Корелациона анализа МС испитаника у ремисији, без суплементације витамином Д, показује да постоји позитивна корелација витамина Д са *NO₃* и *NO₂*, ($r=0,389$; $p<0,01$) као и негативна корелација витамина Д и *MDA* ($r= -0,341$; $p<0,05$).

Испитиван је утицај пола, старости, пушења, дужине трајања МС, *EDSS*, *DMT* и учесталости релапса на предиктивну способност витамина Д на NO_3 и NO_2 и на *MDA* код МС пацијената у ремисији, без суплементације витамином Д. Појединачном линеарном регресионом анализом утврђено је да однос витамина Д и NO_3 и NO_2 код МС пацијената у ремисији, без витамин Д суплементације не зависи од пола ($p=0,293$; $\beta= -0,169$), старости ($p=0,453$; $\beta= -0,137$), пушења ($p=0,606$; $\beta= -0,063$), дужине трајања болести ($p=0,182$; $\beta= -0,191$), *EDSS* ($p=0,538$; $\beta= -0,123$), *DMT* ($p=0,744$; $\beta= -0,067$), као ни од учесталости релапса ($p=0,390$; $\beta=0,153$). Такође, резултати показују да на однос витамина Д и *MDA* код МС пацијената у ремисији који нису на суплементацији витамином Д не утичу пол ($p=0,438$; $\beta= -0,094$), старост ($p=0,435$; $\beta=0,095$), пушење ($p=0,366$; $\beta= -0,110$), дужина трајања МС ($p=0,579$; $\beta= -0,068$), *EDSS* ($p=0,175$; $\beta= 0,178$), *DMT* ($p=0,446$; $\beta= -0,093$), ни учесталост релапса ($p=0,989$; $\beta=0,002$).

Код МС пацијената у ремисији, са суплементацијом витамином Д, Пирсоновом корелационом анализом није установљена статистички значајна корелација између логаритмоване вредности витамина Д и параметара оксидативног стреса (резултати нису приказани).

V4. Повезаност параметара оксидативног стреса, витамина Д и клиничких карактеристика болести

4.1. Корелација параметара оксидативног стреса и витамина Д с клиничким подацима код пацијената с мултиплом склерозом

Циљ истраживања је био и да се утврди повезаност параметара оксидативног стреса, антиоксидативне заштите и витамина Д с клиничким карактеристикама болести. У групи МС пацијената испитивано је колико трајање МС, вредност *EDSS*, као и учесталост релапса утичу на испитиване параметре оксидативно-стресног статуса и концентрацију витамина Д. За утврђивање односа између параметара ОС и клиничких података коришћена је Спирманова корелациона анализа.

Резултати корелације параметара оксидативно-стресног статуса и клиничких карактеристика оболелих од мултипле склерозе су приказани у Табели 15.

Табела 15. Корелациона анализа параметара ОС и клиничких карактеристика у МС групи

Параметар	Трајање болести	EDSS	Број релапса по години
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,082	-0,106	0,171
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	-0,108	-0,127	0,020
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,061	0,117	0,192*
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,104	-0,093	-0,109
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)	0,005	0,089	0,009
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	-0,117	-0,058	-0,079
<i>PONI</i> (<i>U/L</i>)	-0,039	0,107	0,103
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,003	-0,089	0,027
<i>SH</i> -групе (<i>mmol/L</i>)	0,128	-0,105	-0,039
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)	-0,071	0,029	-0,188*
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	-0,158*	-0,057	-0,055
Феритин ($\mu\text{g/L}$)	0,002	0,064	-0,124
Трансферин (<i>g/L</i>)	0,048	-0,087	0,018
Витамин Д (<i>nmol/L</i>)	-0,109	0,051	0,087

Приказан је Спирманов коефицијент корелације; * $p < 0,05$

EDSS-проширена скала статуса онеспособљености; *AOPP*-протеински производи узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PONI*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Установљена је негативна корелација између мокраћне киселине и дужине трајања МС ($\rho = -0,158$; $p < 0,05$), као и између укупног билирубина и учесталости релапса ($\rho = -0,188$; $p < 0,05$). Такође, концентрација *MDA* позитивно корелира са учесталашћу релапса ($\rho = 0,192$; $p < 0,05$).

4.2. Корелација параметара оксидативног стреса и витамина Д с клиничким подацима током ремисије и релапса

Код МС пацијената добијене су значајне корелације између параметара ОС и клиничких карактеристика болести. Циљ је да се утврди да ли фаза болести утиче на установљену повезаност. Урађена је Спирманова корелациона анализа параметара ОС и клиничких података код МС пацијената у зависности од клиничке фазе болести: током ремисије и током релапса.

Спирманова корелациона анализа параметара ОС и клиничких карактеристика код пацијената са МС током ремисије је приказана у Табели 16.

Табела 16. Корелациона анализа параметара ОС и клиничких података код оболелих од МС у фази ремисије

Параметар	Трајање болести	EDSS	Број релапса по години
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,047	-0,102	-0,014
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	-0,136	-0,116	0,004
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,044	-0,139	0,201*
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,108	-0,040	-0,100
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)	-0,020	0,039	0,006
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	-0,118	0,117	-0,142
<i>PON1</i> (<i>U/L</i>)	-0,014	0,197	0,173
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,063	-0,062	0,073
<i>SH</i> -групе (<i>mmol/L</i>)	0,070	-0,048	-0,029
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)	-0,050	0,075	0,069
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	-0,187*	0,019	-0,004
Феритин ($\mu\text{g/L}$)	0,061	0,120	-0,108
Трансферин (<i>g/L</i>)	0,012	-0,061	0,081
Витамин Д (<i>nmol/L</i>)	-0,134	0,076	0,044

Приказан је Спирманов коефицијент корелације; * $p < 0,05$

EDSS-проширена скала статуса онеспособљености; *AOPP*-протеински продукти узапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдеhid; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PON1*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Корелациона анализа МС пацијената током ремисије показује да постоји значајна негативна корелација између концентрације мокраћне киселине и дужине трајања МС ($\rho = -0,187$; $p < 0,05$). Значајна позитивна корелација код ових пацијената установљена је и између *MDA* и учесталости релапса ($\rho = 0,201$; $p < 0,05$).

Надаље, однос између параметара оксидативно-стресног статуса и клиничких карактеристика оболелих од МС у фази релапса је приказан у Табели 17.

Табела 17. Корелациона анализа параметара ОС и клиничких података код оболелих од МС у фази релапса

Параметар	Трајање болести	EDSS	Број релапса по години
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,111	0,092	-0,081
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	0,078	0,027	0,007
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,012	0,109	0,089
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,053	0,097	0,014
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)	0,055	0,076	0,018
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	-0,103	-0,015	0,019
<i>PON1</i> (<i>U/L</i>)	-0,128	0,152	-0,102
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	-0,057	-0,136	0,108
<i>SH</i> -групе (<i>mmol/L</i>)	0,068	-0,133	-0,034
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)	-0,109	-0,025	-0,274*
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	-0,106	0,054	0,009
Феритин ($\mu\text{g/L}$)	-0,108	0,028	-0,074
Трансферин (<i>g/L</i>)	0,047	-0,006	-0,027
Витамин Д (<i>nmol/L</i>)	-0,105	-0,145	0,059

Приказан је Спирманов коефицијент корелације; * $p < 0,05$

EDSS-проширена скала статуса онеспособљености; *AOPP*-протеински продукти узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдеhid; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PON1*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Утврђено је да код оболелих од МС током фазе релапса постоји негативна корелација концентрације укупног билирубина и учесталости релапса ($\rho = -0,274$; $p < 0,05$). С друге стране, није утврђена статистички значајна повезаност параметара ОС са дужином трајања МС и вредношћу *EDSS*.

V 5. Основне карактеристике, параметри оксидативног стреса и антиоксидативне заштите и витамина Д код оболелих од мултипле склерозе у зависности од пола

У истраживању је учествовало 85 мушких и 93 женских пацијената оболелих од мултипле склерозе. Основни демографски и клинички подаци у односу на пол пацијената са МС су приказани у Табели 18.

Табела 18. Основни демографски и клинички подаци у односу на пол оболелих од МС

Параметар	Мушкарци	Жене	<i>p</i>
Број испитаника	85	93	
Старост (године)	41,5 ± 9,7	40,5 ± 9,9	0,524
Релапс/ремисија	24/61	37/56	0,105
Трајање болести (у годинама) [#]	8,0 (5,0-12,5)	7,0 (4,0-13,5)	0,929
<i>EDSS</i> [#]	3,0 (1,5-4,5)	2,5 (1,5-4,0)	0,328
Број релапса по години [#]	0,3 (0,2-0,55)	0,4 (0,2-0,7)	0,075
Суплементација витамином Д (да/не)	57/28	55/38	0,275
<i>DMT</i> (да/не)	67/18	65/28	0,174
Пушење (да/не)	28/57	31/62	0,956

Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација за континуиране податке који следе нормалну расподелу, односно као апсолутне фреквенце за категоричке податке. [#] Подаци који не следе нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Континуиране променљиве које следе нормалну расподелу су поређене Студентовим *t*-тестом, док променљиве које нису нормално дистрибуиране су поређене Ман Витнијевим тестом. Категорички подаци су поређени Хи квадрат тестом. *EDSS*-проширена скала статуса онеспособљености; *DMT*-терапија која модификује природан ток болести

Утврђено је да се мушкарци и жене оболели од МС не разликују по годинама, дужини трајања болести, *EDSS*, учесталости релапса, фази болести, суплементацији витамином Д, као ни по примени терапије која модификује природан ток болести.

Пошто резултати Хи квадрат теста не показују разлику између мушкараца и жена у односу на суплементацију витамином Д, вредности витамина Д су анализирани без прилагођавања (енг. *Adjustment*). Концентрације параметара ОС и витамина Д код мушких и женских пацијената су приказани у Табели 19.

Табела 19. Параметри оксидативног стреса, антиоксидативне заштите и витамина Д код мушкараца и жена оболелих од мултипле склерозе

Параметар	Мушкарци	Жене	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$) [#]	23,5 (21,9-25,2)	22,1 (20,7-23,6)	0,232
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	127,9 (91,1-167,5)	175,7 (117,1-203,2)	<0,001
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$) [#]	9,1 (8,6-9,7)	9,1 (8,5-9,6)	0,956
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)	4,6±1,8	4,7 ±1,9	0,867
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>) [*]	740 (615-921)	747 (615-985)	0,788
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	15,1 (14,4-16,5)	15,9 (15,0-16,7)	< 0,05
<i>PON1</i> (<i>U/L</i>) [*]	258 (162-493)	274 (156-595)	0,749
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$) [*]	1006 (722-1119)	954(785-1082)	0,305
<i>SH</i> групе (<i>mmol/L</i>)	0,31±0,12	0,29±0,11	0,426
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$) [*]	11,0 (8,5-15,0)	8,0 (7,0-10,0)	<0,001
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$) [#]	313±66	239±60	<0,001
Феритин ($\mu\text{g/L}$) [*]	91,0 (64,0-133,0)	29,4 (16,4-43,5)	<0,001
Трансферин (<i>g/L</i>)	2,5±0,4	2,7±0,5	<0,01
Витамин Д (<i>nmol/L</i>) [*]	74,0 (48,1-107,1)	60,6 (40,2-97,5)	0,300

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација за податке који следе нормалну расподелу. [#]Подаци који су након логаритмовања нормално дистрибуирани су приказани као геометријска средња вредност и 95 % интервал поузданости. ^{*}Подаци који не прате нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Студентов т-тест је коришћен за поређење променљивих које следе нормалну расподелу, односно Ман Витни тест је коришћен за утврђивање разлике између параметара који нису нормално дистрибуирани. *EDSS*- проширена скала статуса онеспособљености; *AOPP*-протеински производи узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PON1*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Утврђено је да жене имају више концентрације *PAB* ($p<0,01$) и трансферина ($p<0,05$), као и вишу активност каталазе ($p<0,05$) у односу на мушкараце са мултиплом склерозом. С друге стране, вредности укупног билирубина ($p<0,001$), мокраћне киселине ($p<0,001$) и феритина ($p<0,001$) су значајно ниже код жена у поређењу с мушкарцима који болују од мултипле склерозе.

V 6. Основне карактеристике, параметри оксидативно-стресног статуса и витамина Д код оболелих од мултипле склерозе у зависности од година (старости)

Просечна старост оболелих од МС износила је $40,9 \pm 9,8$ година (Табела 2). На основу старосне границе од 40 година оболели од МС су подељени у две групе: на млађе од 40 година и на старије од 40 година.

Основни демографски и клинички подаци МС испитаника у зависности од година живота су приказани у Табели 20.

Табела 20. Основни демографски и клинички подаци код оболелих од МС у зависности од старости

Параметар	Године ≤ 40	Године > 40	<i>p</i>
Број испитаника	86	92	
Пол, м/ж	42/44	43/49	0,780
Релапс/ремисија	32/54	29/63	0,423
Трајање болести (у годинама) [#]	5,0 (4,0-9,0)	11,0 (7,0-17,0)	<0,001
<i>EDSS</i> [#]	2,5 (1,5-4,0)	3,0 (1,5-4,5)	0,094
Број релапса по години [#]	0,4 (0,2-0,8)	0,3 (0,2-0,5)	0,068
Суплементација витамином Д (да/не)	60/26	52/40	0,075
<i>DMT</i> (да/не)	63/23	69/23	0,790
Пушење (да/не)	28/58	31/61	0,872

Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација за податке који следе нормалну расподелу. [#]Резултати за континуиране податке који не следе нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Резултати су приказани као апсолутне фреквенце за категоричке податке. Континуиране променљиве које нису нормално дистрибуиране су поређене Ман Витнијевим тестом. Категорички подаци су поређени Хи квадрат тестом. *EDSS*-проширена скала статуса онеспособљености; *DMT*-терапија која модификује природан ток болести

Утврђено је да на основу година старости нема разлике код оболелих од МС по полу, *EDSS*, учесталости релапса, фази болести, суплементацији витамином Д, као ни по примени терапије која модификује природан ток болести. С друге стране, као што је и очекивано, оболели од МС старији од 40 година, дуже болују од МС у односу на испитанике млађе од 40 година ($p < 0,001$). Параметри оксидативно-стресног статуса и витамина Д у односу на године старости оболелих од МС су приказани у Табели 21.

Табела 21. Параметри оксидативно-стресног статуса и витамина Д у зависности од старости пацијената

Параметар	Године ≤ 40	Године > 40	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)*	21,9 (18,4-26,1)	23,1 (18,7-29,0)	0,282
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)*	145,5 (112,2-190,2)	146,7 (103,6-190,6)	0,572
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)#	9,2 (8,6-9,9)	9,0 (8,5-9,5)	0,348
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$)	4,5 ± 1,8	4,8 ± 1,9	0,341
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)*	742 (615-998)	747 (598-922)	0,516
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)*	15,7 (14,4-16,7)	15,5 (14,6-16,5)	0,604
<i>PONI</i> (<i>U/L</i>)*	284 (162-570)	236 (156-520)	0,461
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)*	954 (724-1101)	968 (770-1095)	0,965
<i>SH</i> групе (<i>mmol/L</i>)*	0,29 (0,20-0,40)	0,31 (0,21-0,39)	0,532
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)#	10 (9-11)	9 (8-10)	0,150
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)#	280 (265-295)	253 (239-267)	< 0,05
Феритин ($\mu\text{g/L}$)*	44,9 (26,4-95,5)	56,3 (29,2-98,5)	0,505
Трансферин (<i>g/L</i>)#	2,5 (2,4-2,6)	2,6 (2,5-2,7)	0,089
Витамин Д (<i>nmol/L</i>)#	77,0 (66,6-89,0)	58,4 (49,6-68,6)	0,118

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација за податке који следе нормалну расподелу. #Подаци који су након логаритмовања нормално дистрибуирани су приказани као геометријска средња вредност и 95 % интервал поузданости. *Подаци који не прате нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Студентов т-тест је коришћен за поређење променљивих које следе нормалну расподелу, односно Ман Витнијев тест је коришћен за утврђивање разлике између параметара који нису нормално дистрибуирани. *EDSS*- проширена скала статуса онеспособљености; *AOPP*-протеински производи узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PONI*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Статистички значајна разлика је установљена једино за мокраћну киселину, тако да млађи пацијенти оболели од МС имају веће концентрације мокраћне киселине у поређењу са старијим оболелим од МС ($p < 0,05$).

V 7. Основне карактеристике, параметри оксидативно-стресног статуса и витамина Д код оболелих од мултипле склерозе у зависности од пушачког статуса

У зависности од пушачког статуса, оболели од МС су подељени на непушаче и на пушаче.

Основни демографски и клинички подаци оболелих од МС у зависности од пушења су приказани у Табели 22.

Табела 22. Основни демографски и клинички подаци пацијената са МС у зависности од пушачког статуса

Параметар	Непушачи	Пушачи	<i>p</i>
Број испитаника	119	59	
Старост (године)	40,4 ± 10,5	42,1 ± 8,3	0,257
Пол, м/ж	57/62	28/31	0,956
Трајање болести (у годинама) [#]	8,0 (5,0-14,0)	7,0 (5,0-12,0)	0,407
<i>EDSS</i> [#]	3,0 (1,5-4,5)	2,0 (1,5-4,0)	<0,05
Број релапса по години [#]	0,4 (0,2-0,7)	0,3 (0,2-0,5)	0,483
Релапс/ремисија	44/75	17/42	0,280
Суплементација витамином Д (да/не)	79/40	33/26	0,174
<i>DMT</i> (да/не)	90/29	42/17	0,524

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација за податке који следе нормалну расподелу. [#]Резултати за континуиране податке који не следе нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Резултати су приказани као апсолутне фреквенце за категоријске податке. Континуиране променљиве које нису нормално дистрибуиране су поређене Ман Витнијевим тестом. Категоријски подаци су поређени Хи квадрат тестом. *EDSS*-проширена скала статуса онеспособљености; *DMT*-терапија која модификује природан ток болести

Статистичком анализом карактеристика непушача и пушача, установљено је да се испитиване групе разликују једино по вредности *EDSS* ($p < 0,05$), са већим *EDSS* код непушача. Непушачи и пушачи оболели од МС се не разликују по старости, полу, трајању болести, учесталости релапса, фази болести, суплементацији витамином Д и примени терапије која модификује природан ток болести.

Параметри оксидативно-стресног статуса и витамина Д у односу на пушачки статус оболелих од МС су приказани у Табели 23.

Табела 23. Параметри оксидативно-стресног статуса и витамина Д у зависности од пушења код пацијената оболелих од МС

Параметар	Непушачи	Пушачи	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$) [#]	21,8 (20,6-23,1)	24,8 (22,8-27,0)	< 0,05
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	145 (103-182)	179 (119-198)	< 0,05
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	8,9 (7,3-11,0)	8,9 (7,1-11,0)	0,793
<i>NO₃</i> и <i>NO₂</i> ($\mu\text{mol/L}$) [#]	4,2 (3,9-4,5)	4,7 (4,3-5,2)	< 0,05
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)	736 (614-968)	770 (618-926)	0,722
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	15,4 ± 1,8	15,5 ± 1,6	0,592
<i>PONI</i> (<i>U/L</i>)	266 (160-557)	272 (155-435)	0,592
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	976 (726-1116)	942 (784-1048)	0,099
<i>SH</i> групе (<i>mmol/L</i>)	0,30 (0,20-0,36)	0,31 (0,21-0,41)	0,061
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$) [#]	10 (9-11)	8 (8-9)	< 0,01
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	262 ± 65	270 ± 64	0,503
Феритин ($\mu\text{g/L}$) [#]	44,2 (37,1-52,7)	50,4 (39,3-64,6)	0,511
Трансферин (<i>g/L</i>) [#]	2,5 (2,5-2,6)	2,6 (2,5-2,7)	0,735
Витамин Д (<i>nmol/L</i>) [#]	69,7 (60,6-80,3)	61,1 (51,3-72,7)	0,195

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација код података који следе нормалну расподелу. [#]Подаци који су након логаритмовања нормално дистрибуирани представљени су као геометријска средња вредност и 95 % интервал поузданости. *Подаци који не прате нормалну расподелу су приказани као медијана и 25-75. перцентил. Поређење променљивих је вршено Студентовим т-тестом код параметара који следе нормалну расподелу, односно Ман Витнијевим тестом код параметара који нису нормално дистрибуирани. *AOPP*-протеински производи унапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; *NO₃* и *NO₂*-нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PONI*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Статистички значајна разлика између непушача и пушача је утврђена у концентрацијама *AOPP* ($p < 0,05$), *PAB* ($p < 0,05$), *NO₃* и *NO₂* ($p < 0,05$) и укупног билирубина ($p < 0,01$), са већим вредностима прооксиданаса (*AOPP*, *PAB* и *NO₃* и *NO₂*) и нижим вредностима антиоксиданса (укупни билирубин) код пушачког дела МС пацијената.

V 8. Анализа *Receiver Operating Characteristic* кривих за параметре оксидативно-стресног статуса и витамина Д

За утврђивање дијагностичке тачности параметара оксидативно-стресног статуса и витамина Д у разликовању пацијената са МС од здравих испитаника, примењена је *Receiver Operating Characteristic (ROC)* анализа. Као мера тачности испитиваних параметара у диференцирању МС пацијената од здравих испитаника, коришћена је површина испод *ROC* криве (енг. *Area Under the ROC Curve; AUC*). На основу ове вредности, може се оценити дијагностички потенцијал биомаркера, који може бити слаб ($0,5 \leq AUC < 0,7$), прихватљив ($0,7 \leq AUC < 0,8$), одличан ($0,8 \leq AUC < 0,9$) и изванредан ($AUC \geq 0,9$) (*Hosmer* и *Lemeshow*, 2000).

Прво је за сваки параметар оксидативно-стресног статуса и за витамин Д урађена *ROC* анализа. Резултати анализа *ROC* су приказани у Табели 24.

Табела 24. *ROC* анализа за појединачне параметре оксидативно-стресног статуса и витамина Д у разликовању пацијента с мултиплом склерозом од контролне групе

Параметар	<i>AUC</i>	95 % <i>CI</i>	Станд. Грешка	<i>p</i>
<i>AOPP</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,658	0,586-0,730	0,037	< 0,001
<i>PAB</i> (<i>HKU</i>)	0,959	0,938-0,980	0,011	< 0,001
<i>MDA</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,611	0,542-0,680	0,035	< 0,01
NO_3 и NO_2 ($\mu\text{mol/L}$)	0,834	0,783-0,884	0,026	< 0,001
<i>SOD</i> (<i>U/L</i>)	0,950	0,921-0,980	0,015	< 0,001
<i>CAT</i> (<i>U/L</i>)	0,669	0,605-0,734	0,033	< 0,001
<i>PON1</i> (<i>U/L</i>)	0,718	0,655-0,780	0,032	< 0,001
<i>TAS</i> ($\mu\text{mol/L}$)	0,892	0,849-0,934	0,022	< 0,001
<i>SH</i> групе (<i>mmol/L</i>)	0,918	0,885-0,951	0,017	< 0,001
Укупни билирубин ($\mu\text{mol/L}$)	0,624	0,549-0,699	0,038	< 0,01
Мокраћна киселина ($\mu\text{mol/L}$)	0,514	0,435-0,592	0,040	0,610
Феритин ($\mu\text{g/L}$)	0,595	0,520-0,671	0,039	< 0,05
Трансферин (<i>g/L</i>)	0,583	0,507-0,658	0,038	< 0,05
Витамин Д (<i>nmol/L</i>)	0,605	0,536-0,673	0,035	< 0,01

AUC-површина испод криве; *CI*-интервал поузданости; *AOPP*-протеински производи узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; NO_3 и NO_2 -нитрат и нитрит; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PON1*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Појединачном *ROC* анализом се са изванредним потенцијалом раздвајања оболелих од МС од контролне групе издвајају *PAB* ($AUC=0,959$), *SOD* ($AUC=0,950$) и *SH* групе ($AUC=0,918$), док су одличну дијагностичку тачност испољили NO_3 и NO_2 ($AUC=0,834$) и *TAS* ($AUC=0,892$).

С обзиром на то да су поједини биомаркери испољили слабу дијагностичку тачност (*AOPP*, *MDA*, *CAT*, *PON1*, укупни билирубин, феритин, трансферин и витамин Д), као и на изостанак статистичке значајности у *ROC* анализи мокраћне киселине ($p=0,610$) конструисани су одговарајући модели. Модел 1 је садржао прооксидансе, у Моделу 2 су представљени антиоксиданси, док је Модел 3 обухватио и прооксидансе и антиоксидансе. Резултати *ROC* анализа за моделе параметара ОС су приказани у Табели 25.

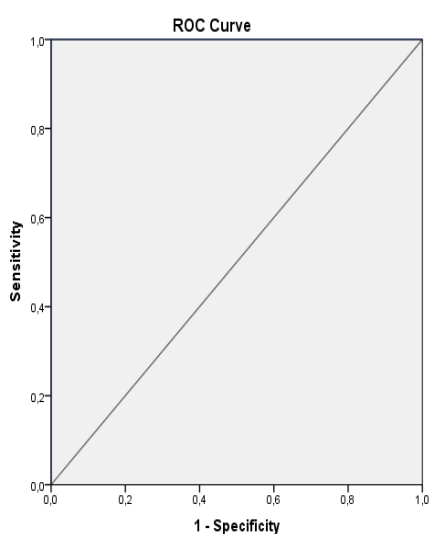
Табела 25. ROC анализа за моделе параметара оксидативно-стресног статуса у разликовању пацијената са MC од контролне групе

Параметар	AUC	95 % CI	Станд. грешка	p
Модел 1	0,986	0,976-0,997	0,005	< 0,001
Модел 2	0,998	0,996-1,000	0,001	< 0,001
Модел 3	0,999	1,000-1,000	0,000	< 0,001

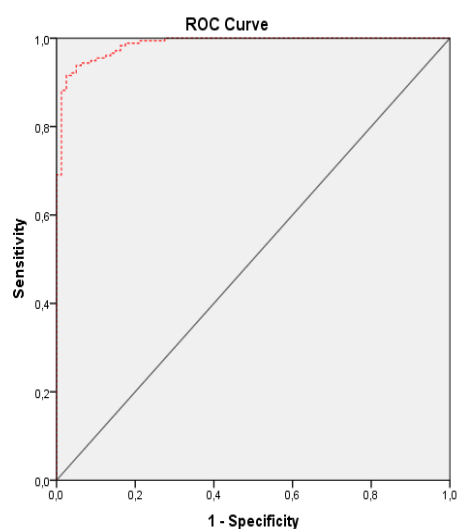
Модел 1-*AOPP, PAB, MDA, NO₃ и NO₂*

Модел 2- *PON1, TAS, SH-групе, SOD, CAT, мокраћна киселина, укупни билирубин, феритин, трансферин*

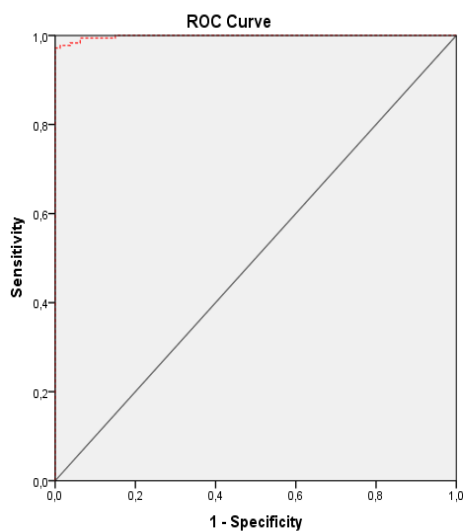
Модел 3- *AOPP, PAB, MDA, NO₃ и NO₂, PON1, TAS, SH-групе, SOD, CAT, мокраћна киселина, укупни билирубин, феритин, трансферин*



а)



б)



в)

Слика V 1: ROC анализа модела а) прооксиданси, б) антиоксиданси, в) прооксиданси и антиоксиданси

ROC анализа модела указује да изванредну дијагностичну тачност имају модели који садрже само прооксидансе, само антиоксидансе, као и комбинацију прооксиданаса и антиоксиданаса. Поређењем појединачних *ROC* резултата са *ROC* моделима, јасно је да комбинације параметара, тј. модели имају већи потенцијал раздвајања оболелих од МС од здравих испитаника, у поређењу с појединачним параметрима. Површина испод криве (*AUC*) је била највећа у Моделу 3. Ипак, поређење модела показује да се Модел 3 није значајно разликовао од Модела 1 и Модела 2.

VI ДИСКУСИЈА

Бројна истраживања су проучавала улогу ОС и витамина Д у патогенези мултипле склерозе (*Gilgun-Sherki* и сар., 2004; *Peterson* и *Fujinami*, 2007; *Pierrot-Deseilligny* и *Souberbielle* 2013). Суплементација витамином Д и антиоксидативна терапија су као допуне основне *DMT* потенцијално значајан приступ у лечењу ове болести. Ипак, међусобни однос витамина Д, параметара оксидативно-стресног статуса, пушења, старости и других фактора ризика за МС није у потпуности разјашњен, што је и био циљ овог истраживања.

Основна карактеристика свих неуродегенеративних болести, па и МС јесте поремећај на нивоу митохондрија (*Lin* и *Beal*, 2006). Митохондрије стварањем енергије и регулацијом апоптозе утичу на животни циклус ћелије (*Rajda* и сар., 2017). У случају поремећаја митохондрија, СР се уместо у физиолошким, генеришу у токсичним концентрацијама и доводе до оксидативног стреса. Митохондрије неурона, активирани микроглије и астроцити доводе до ОС у централном нервном систему (*Chun* и сар., 2001). *Mao* и *Reddy* су промовисали теорију о поремећају митохондрија као кључном патофизиолошком механизму мултипле склерозе (*Mao* и *Reddy*, 2010). Слично процесима који индукују неуродегенерацију, примарни поремећај на нивоу митохондрија индукује инфламацију (*Sadeghian* и сар., 2016). Кључни значај дисфункционалности митохондрија у настанку поремећаја детерминише управо напоре да се она умањи како би се зауставила инфламација, а самим тим и даља прогресија мултипле склерозе. Уклањање дисфункционалних митохондрија у ћелијама врши се процесом аутофагије, чија је активност регулисана витамином Д. Управо ту се истиче значај, као и вишеструка повезаност витамина Д и мултипле склерозе. Истовремено, витамин Д смањује епигенетске промене које фактори ризика за МС могу изазвати код генетски пријемчивих особа (*Pereira* и сар., 2012).

Истраживања на пољу патофизиологије МС су кључна у корекцији постојећег терапијског режима, како би се из тренутног терапијског модалитета санирања последица прешло на превенцију неуродегенерације. Јасно је да поремећај митохондрија доприноси развоју ОС који се уклања механизмом антиоксидативне заштите. Хронична неуроинфламација, присутна у МС, узрокује константну хиперактивност антиоксидативних ензима и постојање тзв. „оксидативне меморије“ (*Mossakowski* и сар., 2015). Повезаност ОС, витамина Д и МС је несумњива.

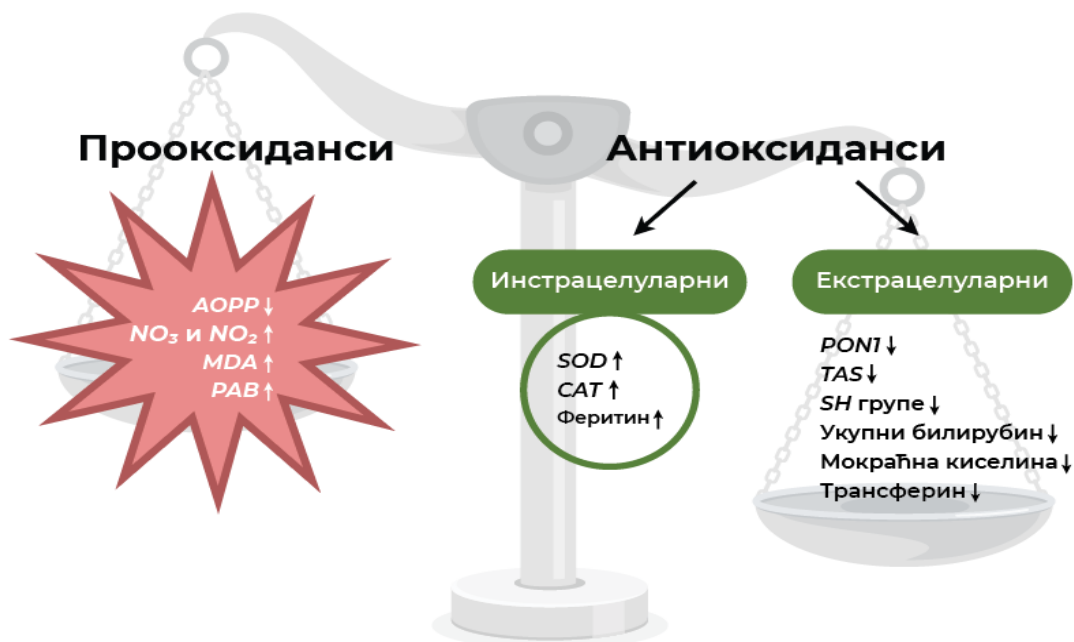
Због комплексности истраживања, великог броја испитиваних параметара оксидативно-стресног статуса, као и постојања три групе пацијената (МС група, пацијенти у фази релапса и пацијенти у фази ремисије), ради веће прегледности, дискусија је подељена на више целина.

VI 1. Оксидативни стрес код оболелих од мултипле склерозе

Резултати спроведеног истраживања су показали да оболели од МС имају више вредности прооксиданаса (*PAB*, *MDA*, NO_3 и NO_2), веће концентрације интрацелуларних (*SOD*, *CAT* и феритин) и ниже концентрације екстрацелуларних антиоксиданаса (*PON1*, *TAS*, *SH*-групе, укупни билирубин, мокраћна киселина, трансферин) у односу на здраве испитанике (Табела 4, Слика VI 1.)

Током инфламације која се развија и одржава током патогенезе МС, ћелије имунског система обилато стварају слободне радикале (*Biswas* и сар., 2015). Мозак је посебно осетљив на дејство СР због велике метаболичке активности, акумулације гвожђа, слабе антиоксидативне заштите

и присуства великог броја ланаца незасићених масних киселина подложних оксидацији (Cobley и сар., 2018). Оксидацијом масних киселина настају оксидовани фосфолипиди и реактивни алдехиди који повећавају пермеабилитет КМБ и олакшавају миграцију имунских ћелија (Tasset и сар., 2012).



Слика VI 1. Схематизован приказ анализираних прооксиданаса и антиоксиданаса у спроведеном истраживању код оболелих од мултипле склерозе у односу на здраве испитанике. *AOPP*-протеински производи узнапредовале оксидације; *PAB*-прооксидативно-антиоксидативни баланс; *MDA*-малондиалдехид; NO_3 и NO_2 -нитрати и нитрити; *SOD*-супероксид-дизмутаза; *CAT*-каталаза; *PON1*-параоксоназа 1; *TAS*-тотални антиоксидативни статус; *SH*-сулфхидрилне групе

Последично се ствара значајно више прооксиданаса: азот-моноксида, *MDA* и *PAB* у групи МС пацијената у поређењу са здравим особама (Табела 4). Повећано стварање азот-моноксида код оболелих од МС, слично резултатима из ове студије, документовали су и други аутори (Ortiz и сар., 2009; Roghani и сар., 2010). Неспецифично ослобођени азот-моноксид од стране активираних имунских и ћелија глије оштећује олигодендроците чиме поспешује већ присутну демиелинизацију и неуродегенерацију (Smith и Hans, 2002). Очекивано, резултати нашег (Табела 4), као и истраживања других аутора су повишен *MDA* код оболелих од МС (Tavazzi и сар., 2011; Ljubisavljevic и сар., 2014; Polachini и сар., 2016). *MDA* је индикатор касне фазе оксидативног оштећења (крајњи производ разградње липидних хидропероксида који су индикатори ране фазе), што се поклапа са чињеницом да се ради о пацијентима са хроничним обољењем које траје 8,0 (5,0-13,0) година (Табела 2). Додатно, концентрација *MDA* позитивно корелира са учесталošћу релапса у укупној МС групи (Табела 15) и у групи пацијената у фази ремисије (Табела 16) што указује на значај величине липидне пероксидације у процени активности болести. Позитивна корелација липидне пероксидације и вредности *EDSS*, документована је и у студији Oliveira Sayonara и сарадника (Oliveira и сар., 2012) што наглашава потребу одређивања параметара липидне пероксидације у мултиплој склерози.

У условима ОС се повећано ствара супероксидни анјон. У реакцији коју катализује антиоксидативни ензим *SOD*, настаје водоник-пероксид, који свој деструктивни ефекат испољава и самостално, али је значајнији као прекурсор знатно токсичнијег хидроксилног радикала што умногоме утиче на прооксидативно-антиоксидативни баланс (*Alamdari* и сар., 2007). Повишен *PAB* код МС испитаника (Табела 4) је потврда нарушене равнотеже између прооксиданаса и антиоксиданаса, у корист прооксиданаса. Повећан ниво *PAB* је забележен и у другим студијама које су проучавале ОС у Паркинсоновој болести (*Miletic* и сар., 2018), реуматоидном артритису (*Sahebari* и сар., 2015), као и у коронарној болести (*Kotur-Stevuljevic* и сар., 2007).

Концентрације *AOPP* су за разлику од осталих анализираних прооксиданаса, значајно ниже у групи пацијената оболелих од МС у поређењу с контролном групом (Табела 4). Ниво *AOPP* је мера оксидације протеина, првенствено албумина (*Żurawska-Plaksej* и сар., 2014). Албумин одржава онкотски притисак плазме, транспортује ендogene и екзогене лиганде (*LeVineSteven*, 2016) и представља негативни реактант акутне фазе (*Gruys* и сар., 2005). Истовремено, албумин испољава и антиоксидативна својства: везивањем бакра и гвожђа спречава Фентонову и Хабер-Вајсову реакцију и смањује ОС (*Halliwell Barry*, 1988). Инфламација, повећана пропустљивост КМБ и борба са прооксидансима узрокују смањење албумина у серуму у МС, што је документовано у спроведеном истраживању (Табела 3), као и у другим студијама (*Audin* и сар., 2014; *Wang* и сар., 2014; *Kallaur* и сар., 2016). За разлику од албумина, вредности *AOPP* у МС су контрадикторне. Документоване су и повишене (*Sadowska-Bartosz* и сар., 2013), као и снижене концентрације *AOPP* код МС пацијената (*Oliveira* и сар., 2017-а). Нижи *AOPP* у нашој студији може бити последица одржавања стања ОС и континуиране оксидације протеина (па и албумина) током МС, која на крају изазива иреверзибилне промене, односно прво доводи до нарушавања функције, а затим и оштећења структуре протеина и њихове деградације (*Yan Liang-Jun*, 2014). Очекивано је да нижи ниво супстрата-албумина, узрокује и нижи *AOPP*, као крајњи производ. Значај *AOPP* у МС документује управо *AOPP* као валидан прогностички маркер опоравка након релапса и примљене кортикостероидне терапије (*Obradovic* и сар., 2020).

ROC анализа указује на значај истовременог одређивања више прооксиданаса у процени оксидативног стања. Прооксиданс са изванредним дијагностичким потенцијалом и највећим *AUC* је управо прооксидативно-антиоксидативни баланс (Табела 24). Увођењем модела 1 који обухвата све анализиране прооксидансе (*AOPP*, *PAB*, *MDA*, NO_3 и NO_2) добијена је дијагностичка тачност од скоро 1, указујући на „комплет“ лабораторијских параметара који би могао постати значајно оруђе у дијагностици МС, с обзиром на одличну специфичност и сензитивност (Табела 25).

У физиолошким условима, увећаном стварању СР се супротстављају неензимски и ензимски системи антиоксидативне заштите. Код МС пацијената региструју се повећане концентрације доминантно интрацелуларних (*SOD*, *CAT* и феритин) и снижене концентрације претежно екстрацелуларних антиоксиданаса (*TAS*, *SH*-групе, укупни билирубин, мокраћна киселина, трансферин и активност параоксоназе 1) (Табела 4, Слика VI 1.).

Примарни антиоксидативни ензими, *SOD* и *CAT* су прва линија заштите организма од оксидативног стреса. Њихова основна функција је уклањање штетних последица које ОС испољава на организм. Активност *SOD* и *CAT* контролише активност нуклеарног фактора (енг. *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*; *Nrf2*) (*Berridge Michael*, 2016). Стање ОС

активира *Nrf2*, транскрипциони фактор који активира таргет гене посредством антиоксидативног зависног фактора (енг. *Antioxidant Response Element; ARE*). Индукована генска експресија затим повећава синтезу *SOD* и *CAT* ензима. Диметил, монометил и диоксимел фумарат, клинички доказана терапија за МС, делују управо стимулацијом *Nrf2*-посредованог регулаторног мезанизма (*Kourakis* и сар., 2020). То значи да се у третману МС сустижу ефекти ендогено створених *SOD* и *CAT* и егзогено индуковане терапије, што би могао бити подстицај за примену антиоксиданаса током МС. Бројне студије су документовале већу активност *SOD* и *CAT*, како у крви (*Acar* и сар., 2012, *Ljubisavljevic* и сар., 2013-а), тако и у можданим лезијама МС пацијената (*Van Horsen* и сар., 2008; *Gray* и сар., 2014). Показано је да активност *SOD* у релапсу у крви МС пацијената указује на квалитет опоравка након кортикостероидне терапије (*Obradovic*, 2020) што одређивање *SOD* у МС делегира као изванредан дијагностички маркер (Табела 24).

Супероксид дизмутаза постоји у три изоформе: цитозолна (*SOD1*), митохондријска (*SOD2*) и екстрацелуларна *SOD* (*SOD3*) (*Kim*, 2015). У нашој студији је мерена укупна *SOD* активност, која представља збир све три изоформе. С обзиром на то да преко 90 % активности *SOD* потиче од *SOD1* (*Weydert* и *Cullen*, 2010), као и да је *SOD3* детектована и у неутрофилима и макрофагама (*Hu* и сар., 2019), добијена укупна *SOD* је сврстана у групу интрацелуларних антиоксиданаса.

Феритин, као позитиван протеин акутне фазе (*Kell* и сар., 2014) је у МС групи виши у поређењу са контролном групом (Табела 4). Оксидација мембранских липида и протеина, присутна током ОС, доприноси ћелијској деградацији и ослобађању феритина из ћелије (*LeVine* и сар., 1999). Феритин је и интрацелуларни депо гвожђа у облику фери јона (*Arosio* и сар., 2017), који је пак као кофактор неопходан у синтези укупног укупног холестерола и других липида па тако и синтези мијелина (*Todorich* и сар., 2009). Истовремено, гвожђе је неопходно за сазревање раних ћелија прогенитора које се диференцирају у олигодендроците. Штавише, показано је да је захтев за гвожђем знатно већи у олигодендроцитима у односу на друге мождане ћелије. Ово је од значаја током процеса ремиелинизације када се дешава обнова и опоравак оштећених ћелија (*Grubic-Kezele* и *Curko-Cofek*, 2020). Повећање феритина може да упути на компензаторни механизам потенциране ремиелинизације. У прилог овој тези су студије у којима прогресија МС корелира с концентрацијом феритина (*da Costa* и сар., 2011; *Ferreira* и сар., 2017). У нашем истраживању није утврђена корелација феритина с клиничким карактеристикама болести (трајањем болести, *EDSS* и учесталости релапса), у укупној МС групи (Табела 15), фази ремисије (Табела 16), као ни у фази релапса (Табела 17).

Поред локацијске припадности интрацелуларном простору, ***SOD*, *CAT* и феритин** су једини од анализираних антиоксиданаса **под директном *NF-κB* контролом**. То значи да активација *NF-κB* доводи до повећане експресије *SOD*, *CAT* и феритина (*Morgan* и *Liu*, 2011). Компензаторни одговор организма на повишен ОС зависи од степена оксидативног стреса. Први одговор у редуковању ОС је индуковање *Nrf2* и активирање гена одговорних за синтезу антиоксидативних ензима. Уколико није превладан, па и даље перзистира ОС, активира се и *NF-κB* и додатно повећава концентрацију антиоксиданаса (*SOD*, *CAT* и феритина). Последњи стадијум борбе организма са ОС подразумева активацију апоптозе или некрозе ћелија, која се у оба случаја завршава ћелијском смрћу (*Gloire* и сар., 2006).

Паралелно са *SOD* и *CAT*, анализирана је активност још једног антиоксидативног ензима: параоксоназе 1. За разлику од *SOD* и *CAT*, *PON1* није интрацелуларни ензим, већ је саставни

део *HDL*-ога. Параоксоназа 1 разграђује (хидролизује) производе липидне пероксидације у *HDL* и *LDL* честицама (Corsetti и сар., 2019). Нижи *PON1* код МС испитаника у поређењу с контролном групом (Табела 4) је последица повећане потрошње *PON1* у МС, услед перзистентног оксидативног стреса. Оксидативни стрес доприноси смањењу активности *PON1* услед промене редокс статуса слободних *SH*-група протеинских молекула овог ензима, првенствено *SH*-група цистеина, присутних у активном центру *PON1* (Tavori и сар., 2010). Такође, нижи *HDL* холестерол код оболелих од МС (Табела 3) указује на мању количину *HDL* честица које *PON1* преносе. Антиатерогени ефекат *PON1* је добро познат (Cheraghi и сар., 2017) и снижена активност *PON1* у МС (Feretti и сар., 2005; Kirbas и сар., 2013) може бити узрок кардиоваскуларног коморбидитета, документованог код оболелих од мултипле склерозе (Magyari и Sorensen, 2020). Поремећај кардиоваскуларног система активира системски инфламаторни одговор и погоршава већ присутну демјелинизацију и неуродегенерацију у мултиплој склерози (Tettey и сар., 2014). Све ово наглашава значај одређивања *PON1* код оболелих од МС, посебно имајући у виду прихватљиву дијагностичку тачност овог ензима, документовану у нашем истраживању (Табела 24).

Од неензимских екстрацелуларних антиоксиданаса анализирани су мокраћна киселина, укупни билирубин, *SH* групе, *TAS* и трансферин.

Мокраћна киселина се традиционално користи као биомаркер гихта, бубрежних и кардиоваскуларних поремећаја (Liu и сар., 2019). Међутим, секундарно, мокраћна киселина делује антиоксидативно елиминишући токсичан пероксинитрит (Whiteman и сар., 2002) и то првенствено у централном нервном систему (Sautin и Johnson, 2008). Пероксинитрит индукује демјелинизацију, деградацију олигодендроцита и оштећење аксона (Touil и сар., 2001). Вођене су полемике да ли је нижа мокраћна киселина у МС, документована у нашем (Табела 4) као и у истраживањима бројних других аутора (Whiteman и сар., 2002; Koch и сар., 2006; Obradovic и сар., 2020), узрок или последица болести. Према најновијим генетским истраживањима снижење мокраћне киселине у серуму је последица патолошког обрасца мултипле склерозе (Niu и сар., 2020).

Слично је и са укупним билирубином, *SH*-групама и трансферином. Укупни билирубин делује протективно на имунски и на нервни систем (Kapitulnik Jaime, 2004). Антиоксидативно дејство укупни билирубин остварује инхибицијом стварања супероксидног анјона (Vasavda и сар., 2019), смањујући липидну пероксидацију *LDL* холестерола (Sameiro-Faria и сар., 2014) и активацијом арил хидрокарбон рецептора (енг. *Aryl Hydrocarbon Receptor*; *AhR*) (Bock и сар., 2010). Рецептор *AhR* активира *Nrf2* транскрипциони фактор и посредно регулише антиоксидативну одбрану организма (Dietrich Cornelia, 2016). Теоретски, индиректно стимулишући *Nrf2*, укупни билирубин индукује и синтезу *SOD* и *CAT* ензима. Ипак, организам је сувише комплексан систем и као такав превазилази математичке моделе, тако да ова теза није устоличена ни у литератури ни у нашим резултатима. Значај антиоксидативног дејства укупног билирубина најбоље документује примена билирубина у наномедицини (Chen и сар., 2020). Налаз смањеног укупног билирубина у МС, сличан нашем (Табела 4), документовали су и други аутори (Ljubisavljevic и сар., 2013-б; Peng и сар., 2011). Наши резултати показују негативну корелацију укупног билирубина и учесталости релапса у укупној МС групи (Табела 15) и у групи пацијената у фази релапса (Табела 17). Могуће је да са већим бројем релапса и самим тим, активнијом формом МС, долази до повећане потрошње и последично снижења концентрације укупног билирубина.

Као и албумин, трансферин је такође негативни протеин акутне фазе (*Don* и сар., 2001), што објашњава снижене концентрације трансферина код пацијената у поређењу са контролном групом (Табела 4). Трансферин транспортује гвожђе и на тај начин контролише концентрацију слободног гвожђа.

Истовремено, трансферин индукује мијелинизацију и ремијелинизацију у ЦНС-у (*Franco* и сар., 2015) и поспешује фагоцитни капацитет микроглије (*Carden* и сар., 2019). Акумулација гвожђа је доказана у МС плаковима, што је подржало теорију о улози поремећаја метаболизма гвожђа на патогенезу мултипле склерозе. Документоване су ниже вредности трансферина у цереброспиналној течности оболелих од МС у поређењу са контролом (*Khalil* и сар., 2014).

Добијени нижи ниво *TAS* код МС пацијената у односу на здраве испитанике (Табела 4) у складу је са литературним подацима (*Acar* и сар., 2012; *Siotto* и сар., 2019). Највећи део *TAS* чине протеинске *SH* групе и мокраћна киселина, док мањи део чине витамин Ц, укупни билирубин, витамин Е и други антиоксиданси (*Erel* и сар., 2004). С обзиром на то да наши резултати указују на смањену концентрацију укупних *SH* група, мокраћне киселине, као и укупног билирубина, нижи *TAS* у нашој МС групи није изненађујући. У складу са нашим резултатима, нижу концентрацију укупних *SH* група, документовао је и *Ljubisavljevic* са сарадницима (*Ljubisavljevic* и сар., 2013-в). Укупне *SH* групе у активном центру *PONI* су одговорне и за активност ензима *PONI* и за спречавање липидне пероксидације (*Tavori* и сар., 2010), тако да ниже концентрације укупних *SH* група последично изазивају и мању активност *PONI*. Истовремено, *ROC* анализа показује да је концентрација укупних *SH* група имала изванредан, а концентрација *TAS* одличан дијагностички потенцијал у диференцирању оболелих са МС од контролне групе (Табела 24). Модели сачињени од више прооксиданаса и/или антиоксиданаса су показали бољи потенцијал раздвајања оболелих од МС од здравих испитаника у односу на појединачне параметре оксидативно-стресног статуса (Табеле 24 и 25). Ови резултати су очекивани с обзиром на то да различити параметри указују на различите биомолекуле оштећене повећаним оксидативним стресом.

VI 2. Витамин Д у мултиплој склерози

Препоручена серумска концентрација витамина Д у општој популацији је вредност 25 (ОН)Д већа од 75 nmol/L. Ниске концентрације витамина Д су класификоване као тешка дефицијенција (концентрације мање од 25 nmol/L), блага дефицијенција (опсег концентрација између 25 и 50 nmol/L) и инсуфицијенција (вредности од 50 до 75 nmol/L) (*Holick* и сар., 2011).

Умерено излагање сунцу, као и примена крема за заштиту коже од сунца због превенције меланома и других облика рака коже је довела до глобалне дефицијенције витамина Д (*Wang* и сар., 2017). Дефицијенција витамина Д је присутна чак и у подручјима са довољно УВ-Б зрака, као и у земљама са исхраном обогаћеном Д витамином. На недостатак витамина Д утичу и болести јетре и бубрега, поремећај у липидној апсорпцији (цистична фиброза) и примена лекова који убрзавају метаболизам 25(ОН)Д (нпр. антиепилептици).

Истовремено велики број медицинских стручњака указује на неадекватне референтне вредности за витамин Д и потребу за успостављањем нових, нижих референтних вредности (*Manson* и сар., 2016). Чињеница је да вредности које се користе као референтне у лабораторијама широм Србије нису устоличене испитивањем наше здраве популације, већ су преузете из стране литературе. Према тренутно јединој студији о статусу витамина Д у Србији, средња вредност износи 41,8 nmol/L (*Jovicic* и сар., 2012). Додатни проблем праве и разлике у

концентрацијама витамина Д у зависности од методе одређивања. Бројне су препоруке за стандардизацију и хармонизацију метода за одређивање 25(ОН)Д, иако то још увек није урађено. Златни стандард и референтна метода за одређивање 25(ОН)Д је течно масена хроматографија (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) која због бројних процеса претретмана узорка и доста времена потребног за извођење анализе није у широкој употреби (*Jovicic и сар., 2012*). Најчешћа метода одређивања су хемилуминисцентна аутоматизована имуноодређивања (*CLIA, ECLIA, CMIA*), проблематична услед разлика између метода, које су условљене унакрсном реактивношћу метаболита витамина Д (*Lee и сар., 2015*).

Код популације која има повећане потребе за витамином Д, у коју спадају и оболели од МС, проблем је знатно комплекснији. Основна карактеристика МС јесте физичка онеспособљеност, која условљава дужи боравак у затвореном простору, што негативно утиче на витамин Д статус. Доминантан извор витамина Д3 представља ендогена синтеза, која у тропским крајевима износи 2000-4000 IU дневно (*Luxwolda и сар., 2012*). Србија припада подручју са умерено-континенталном климом, односно ендогена синтеза витамина Д је знатно нижа, чак и у летњим месецима. Избалансирана исхрана омогућава дневни унос витамина Д од свега 100 IU (односно 300-400 IU, ако је храна обогаћена витамином Д) (*Holick и сар., 2011*). Због свега наведеног се суплементација витамином Д примењује као додатна терапијска опција у третману мултипле склерозе. Саветује се суплементација витамином Д3 јер је доказано веће повећање 25(ОН)витамина Д применом холекалциферола у односу на ергокалциферол (*Tripkovic и сар., 2012*). Препорука за оболеле од МС је суплементација 2000-5000 IU витамина Д3 дневно (у зависности од иницијалних концентрација), како би се постигла, за МС пацијенте, оптимална концентрација 25(ОН)витамина Д од 75-120 nmol/L (*Moretti и сар., 2018*). Дефинитиван консензус о суплементацији витамина Д код МС пацијената још увек није усвојен и доминира ниво препоруке.

Паралелно са суплементацијом витамина Д неопходна је и лабораторијска провера његове концентрације. Вредности витамина Д преко 150 nmol/L су токсичне и примарно се манифестују секундарном хиперкалцемијом, која стимулише Т лимфоците (*Marcinowska-Suchowierska и сар., 2018*). Третман високим дозама витамина Д (преко 200 nmol/L) преко три месеца довео је до штетних ефеката, узрокованих инфилтрацијом ЦНС активираним Т лимфоцитима (*Hausler и сар., 2019*).

Управо због свега наведеног је очигледно зашто је већина МС пацијената (63 %) у овом истраживању била на суплементацији витамином Д (Табела 11), за разлику од здравих испитаника, који нису узимали витамин Д и код којих је суплементација витамином Д била критеријум за искључење из истраживања. Прилагођавање (енг. *Adjustment*) вредности витамина Д услед суплементације је рађено код МС пацијената и код контролне групе. Резултати истраживања су, након прилагођавања, показали статистички значајно ниже концентрације витамина Д код оболелих од МС у односу на контролну групу (Табела б), што је у складу са студијама других аутора (*Ascherio и сар., 2010; Agnello и сар., 2016; Duan и сар., 2014*). Анализирајући повезаност витамина Д и клиничких карактеристика болести, код пацијената није утврђена повезаност витамина Д са дужином трајања болести, *EDSS*, ни са учесталешћу релапса ни у укупној МС групи (Табела 15), као ни код оболелих у фази ремисије (Табела 16) и релапса (Табела 17).

На доказано ниже вредности витамина Д код оболелих од МС утиче и примена кортикостероида у третману релапса. Доказано је да кортикостероиди помоћу два међусобно

независна механизма смањују концентрацију витамина Д (*Rosen Clifford, 2011*). Први механизам је индуковање катаболизма витамина Д, а други је кортикостероидима условљено повећање телесне тежине, јер је доказана акумулација витамина Д у адипоцитима (*Davidson и сар., 2012*).

VI 3. Оксидативно-стресни статус и витамин Д током ремисије и релапса

Параметри оксидативно-стресног статуса и витамин Д имају дијагностички потенцијал раздвајања МС пацијената и контроле (Табела 4 и Табела 5). С обзиром на значај релапса у МС, као и на искључиво клиничку дијагностику релапса (*Repovic Pavle, 2019*), наш циљ је био и идентификовање потенцијалног биомаркера релапса поређењем параметара оксидативно-стресног статуса и витамина Д током ремисије и релапса.

Бројна су истраживања о узроцима релапса у мултиплој склерози (*Tremlett и сар., 2008; Artemiadis и сар., 2011; Xie и сар., 2020*). Установљено је да вирусне и бактеријске инфекције, стрес, постпартум триместар, нижи ниво витамина Д и *in vitro* фертилизација повећавају ризик за настанак релапса (*Kalincik Tomas, 2015*). С друге стране, документовано је протективно деловање паразитарних инфекција (*Correale и Farez, 2011*), као и мањи број релапса у трудноћи, посебно у трећем триместру (*Lai и сар., 2018*).

Без обзира на узрок релапса, терапијски циљ лечења МС је смањење њиховог броја, јер сваки релапс може за собом да остави нови неуролошки и функционални дефицит.

Резултати нашег истраживања су исте вредности параметара оксидативно-стресног статуса током релапса и ремисије (Табела 8). То значи да су оболели од МС хронично експонирани инфламацији и оксидативном стресу, без обзира на клиничку презентацију болести (*Oliveira и сар., 2012*). Наши резултати указују на континуираност инфламације, демјелинизације и неуродегенерације током МС, односно клиничка ремисија је само врх леденог брега у активности ове комплексне болести. Непромењен оксидативно стресни статус у ремисији у односу на релапс објашњава и чињеница да ОС не узрокује МС, већ пре одражава константну инфламацију и неуродегенерацију. Перзистентан ОС, без обзира на клиничку манифестацију болести оштећује неуроне и провоцира даљу инфламацију, стварајући зачарани круг између инфламације и оксидативног стреса. Све ово указује на значај ОС у МС и потребу за што ранијом применом антиоксидативне терапије. Примена антиоксидативне терапије у МС представља посебан терапијски изазов јер је потребан пролазак лека кроз КМБ и адекватна количина за испољавање антиоксидативног потенцијала у централном нервном систему. Редукцијом ОС је могуће сачувати неуролошку резерву и одложити клиничку онеспособљеност. У складу с нашим налазима и конзистентним ОС како у ремисији, тако и у релапсу је рад *Acar* и сарадника (*Acar и сар., 2003*). С друге стране су студије које су детектовале разлике у ОС статусу у релапсу и ремисији (*Guerrero и сар., 2011; Naseer и сар., 2020*). Очигледно неслагање у резултатима је последица разлика у дизајну студија, испитиваном ОС биомаркеру и примени различитих *DMT* у третману мултипле склерозе.

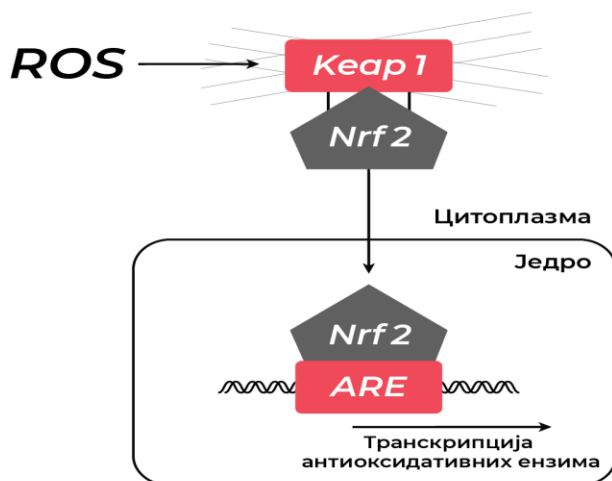
Вредности витамина Д у релапсу и ремисији се не разликују код наших МС испитаника пре (Табела 9), као ни након прилагођавања вредности услед суплементације витамином Д (Табела 10). Мало је студија које су проучавале концентрацију витамина Д током релапса и ремисије. У складу са нашим резултатима је студија *Slavov* и сарадника у којој су документоване исте вредности витамина Д у релапсу и ремисији (*Slavov и сар., 2014*). За разлику од нас, ниже

вредности витамина Д у релапсу у поређењу са ремисијом су документовали *Soilu-Hanninen* (*Soilu-Hanninen* и сар., 2005) и *Correale* (*Correale* и сар., 2009). Велики број студија је истраживао утицај витамина Д на инциденцију релапса и активност мултипле склерозе (*Smolders* и сар., 2008, *Muris* и сар., 2016, *Cree* и сар., 2016). Колико је несумњива улога витамина Д у настанку МС, толико његова улога на ток и прогресију МС изазива бројне контроверзе. По једним студијама витамин Д делује протективно на активност и ток МС смањујући број релапса, вредност *EDSS* и број лезија на магнетној резонанци (*Burton* и сар., 2010; *Simpson* и сар., 2010; *Soilu-Hanninen* и сар., 2012; *Fitzgerald* и сар., 2015), а по другим, нема ефекта у овој болести (*Mosayebi* и сар., 2011; *Kampman* и сар., 2012; *Muris* и сар., 2016; *Fragoso* и сар., 2017). Наши резултати не показују повезаност витамина Д и клиничких карактеристика мултипле склерозе. Концентрација витамина Д не корелира са дужином трајања болести, величином *EDSS*, као ни са учесталошћу релапса, ни у укупној МС групи (Табела 15), ни током релапса (Табела 17) и ремисије (Табела 16). У складу са нашим резултатима је и студија од *Hawkes* и сар. у којој суплементација витамином Д не утиче на ток и прогресију већ установљене мултипле склерозе (*Hawkes* и сар., 2019). Међутим, витамин Д свакако протективно делује на оболеле од МС: било да штити пермеабилност КМБ (*Takahashi* и сар., 2017), смањује дегенерацију аксона (*Sandberg* и сар., 2016), повећава ремијелинизацију (*Matias-Guiu* и сар., 2017), модулише имунски одговор (*Liu* и сар., 2018), делује антиинфламаторно (*Sassi* и сар., 2018) или антиоксидативним дејством смањује штетне ефекте оксидативног стреса.

VI 4. Повезаност параметара оксидативно-стресног статуса и витамина Д у мултиплој склерози

Антиоксидативно дејство витамин Д остварује индуковањем експресије *Nrf2* и повећањем синтезе протеина клото.

Активан облик витамина Д повећава експресију *Nrf2* (*Hayes* и сар., 2014). Истовремено и *Nrf2* индукује експресију *VDR* и *RXR*, односно утиче на функцију витамина Д. У физиолошким условима *Nrf2* је везан за *Keap1* протеин (енг. *Kelch-Like ECH-Associated Protein*), који супримира његову активност. У условима ОС и повећаног стварања и/или смањене разградње *ROS*, долази до оксидације *Keap1* и ослобађања *Nrf2* из *Keap1* комплекса (*Lee* и сар., 2012). Слободан *Nrf2* прелази у нуклеус где се везује за *ARE* и активира генску експресију каталазе и супероксид дизмутазе (*Beridgge* и сар., 2016). Овај процес је приказан на Слици VI 2. Комплекс *Nrf2-Keap1* је главни целуларни механизам одбране од оксидативног стреса (*Suzuki* и *Yamamoto*, 2015).



Слика VI 2. Активација *Nrf2* *ARE* каскаде посредством *ROS* (адаптирано према *Shreibelt* и сар., 2007). *ROS*-реактивна кисеонична једињења; *Keap 1*-енг. *Kelch-Like ECH-Associated Protein*; *Nrf2*-нуклеарни фактор; *ARE*-антиоксидативни зависни фактор.

Активни витамин Д облик повећава концентрацију протеина клото (*Hausler* и сар., 2016). Антиоксидативна својства протеин клото остварује двојачко: повећањем антиоксидативне ензимске активности и снижењем прооксидативног дејства реактивних једињења кисеоника. Клото инхибира интрацелуларну сигналну каскаду инсулину сличног фактора раста 1 (енг. *Insulin Like Growth Factor 1; IGF 1*). Последица је активација *FoxO* транскрипционог фактора (енг. *Forkhead Transcription Factors*) који индукује експресију *SOD* и каталазе (*Yamamoto* и сар., 2005). Истовремено, клото смањујући активност никотинамид аденин динуклеотид фосфат (енг. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate; NADPH*) оксидазе (*Wang* и сар., 2012), смањује и количину супероксидног ањона (*Tain* и *Baylis*, 2006). Витамин Д- *Klotho-Nrf2* у интеракцији повећавају активност *CAT* и *SOD*, смањују стварање *ROS* (*Berridge Michael*, 2016) и подстичу сазревање олигодендроцита и мијелинизацију (*Chen* и сар., 2013).

Управо због утицаја витамина Д на *SOD* и *CAT*, очекивана је корелација витамина Д и примарних антиоксидативних ензима. Међутим, резултати нашег истраживања су да витамин Д смањује *MDA*, односно повећава NO_3 и NO_2 у МС групи без суплементације витамином Д (Табела 12). С друге стране, витамин Д смањује *AOPP* у МС групи на суплементацији витамином Д (Табела 13). **То значи да витамин Д смањује липидну пероксидацију и повећава азот-моноксид пацијентима без суплементације, односно супримира оксидацију протеина пацијентима на суплементацији витамином Д.** На ефекат витамина Д на *MDA*, NO_3 и NO_2 , као и на *AOPP* не утичу пол, старост, пушење, дужина трајања болести, *EDSS*, примењена *DMT*, као ни учесталост релапса. Проучавали смо и међусобну зависност витамина Д и параметара ОС у зависности од фазе болести. Добијен је исти однос витамина Д са *MDA* (позитивна корелација), као и са NO_3 и NO_2 (негативна корелација) у МС групи која није на витамин Д суплементацији у фази ремисије (Табела 14). Такође је доказано да на овај однос не утичу пол, старост, пушење, дужина трајања болести, *EDSS*, *DMT* и учесталост релапса. С друге стране, није утврђена статистички значајна корелација витамина Д и параметара ОС код пацијената у фази ремисије на суплементацији витамином Д. Недостатак статистичке значајности између витамина Д и параметара ОС документован је код пацијената током релапса, било да узимају или не витамин Д. Претпоставка је да је то последица малог статистичког узорка. Повезаност витамина Д и параметара ОС код укупне МС групе,

пацијената током ремисије и релапса у односу на суплементацију витамином Д је приказан на Слици VI 3.

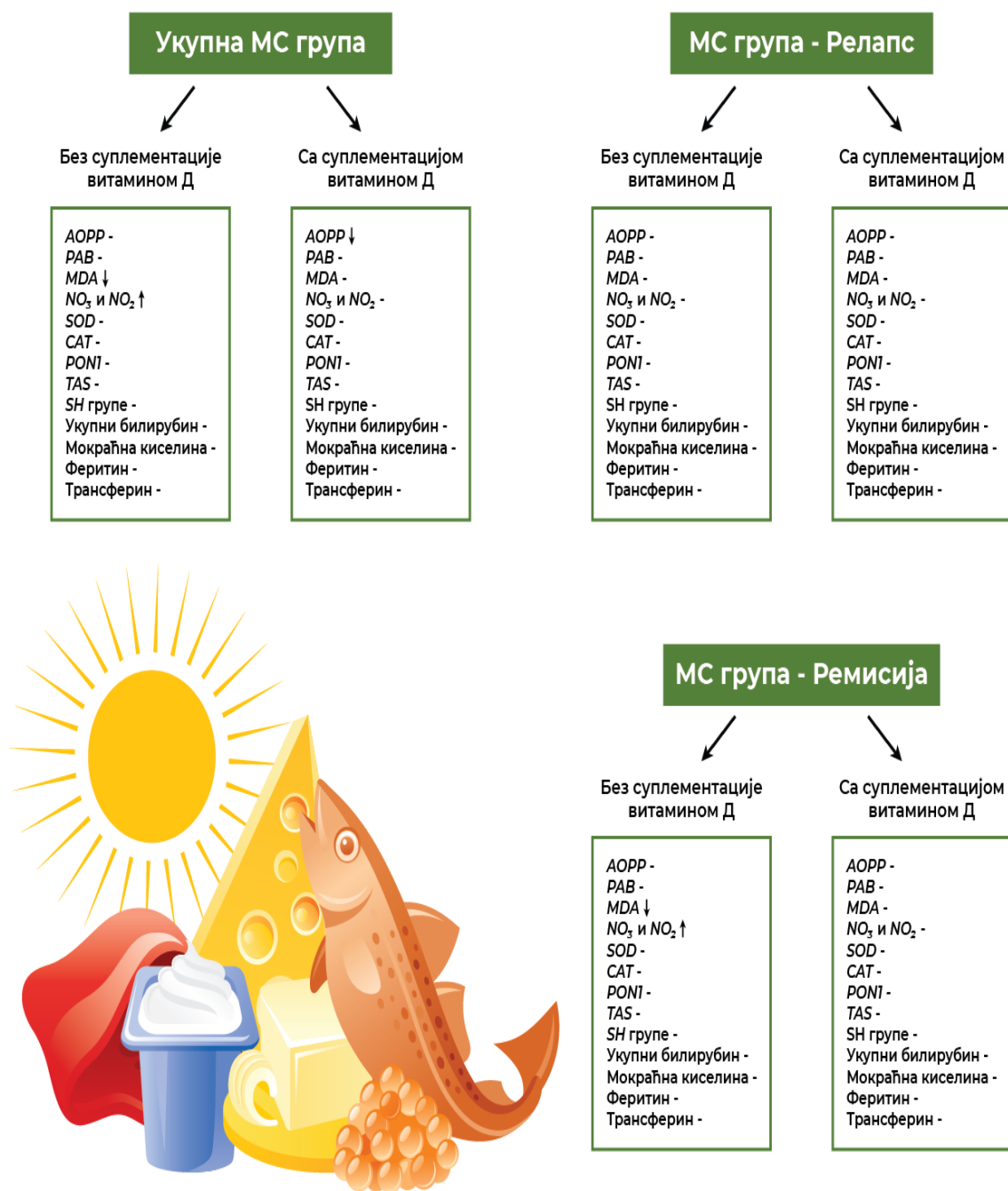
Витамин Д има хемијску структуру сличну укупном холестеролу и инхибира липидну пероксидацију механизмом структурне мимикрије (*Wiseman Helen*, 1993). Бројни аутори су документовали снижење *MDA* под дејством витамина Д (*Sharifi* и сар., 2014; *Shab-Bidar* и сар., 2015; *Tamadon* и сар., 2018), што је у складу с нашим истраживањем код МС пацијената без суплементације витамином Д (Табела 12).

Витамин Д повећава концентрацију азот-моноксида стимулишући ендотелну азот-оксид синтазу (*NOS*) (*Lee* и сар., 2018). Фамилија *NOS* катализује стварање азот-моноксида из *L*-аргинина и испољава се као ендотелна, неуронска и индуцибилна азот-оксид синтаза (*Sessa WC*, 1994). Калцијум, чију регулацију промовише витамин Д, стимулише ендотелну и неуронску *NOS*, који су конститутивни изотипски облици ензима са бројним физиолошким функцијама (*Berridge Michael*, 2016). Повећање концентрације азот-моноксида је контрадикторно антиоксидативном деловању Д витамина. Ипак, смањујући продукцију супероксидног анијона, активирајући ензим који катализује његово уклањање (*SOD*), витамин Д редукује концентрацију најштетнијег производа азот-моноксида- пероксинитрита, који настаје у реакцији супероксидног анијона и азот-моноксида (*Estevez* и сар., 2002).

Азот-моноксид јесте моћан оксиданс, али има и позитивне карактеристике: учествује у неуротрансмисији, снажан је инхибитор агрегације и адхезије тромбоцита, регулише тонус глатких мишићних ћелија у зиду крвних судова и испољава вазодилаторна својства. Значај азот-моноксида најбоље презентује титула „Молекул године“ у часопису *Science* 1992. године, као и додела Нобелове награде *Robert Furchgott*-у, *Louis Ignarro*-у и *Ferid Murad*-у 1998. године за откриће о карактеристикама азот-моноксида (*Koshland Daniel*, 1992).

У складу с нашим истраживањима су и резултати *De Almeida* и сар. који су утврдили позитивну корелацију витамина Д са *NO* и негативну са *AOPP* код оболелих од хепатитис Ц вируса (*De Almeida* и сар., 2016).

Тачан механизам којим витамин Д снижава вредност *AOPP* није познат. Међутим, витамин Д не само да смањује оксидацију протеина, него утиче и на рецепторе преко којих производи протеинске оксидације делују. Витамин Д смањује експресију рецептора за крајњи производ гликације протеина (енг. *Receptor for Advanced Glycation End Product; RAGE*) (*Torino* и сар., 2017). Због хемијске структуре сличне *AGE*, *AOPP* представља лиганд за *RAGE* рецептор (*Zhou* и сар., 2012). Везивањем ендогеног лиганда за *RAGE* активира се *MAPK* сигнални пут и *NF-κB* транскрипциони фактор (*Wang* и сар., 2020). Последица је повећано стварање *ROS* и проинфламаторних цитокина. Супресијом *RAGE* од стране витамина Д, супримира се и ОС и инфламација. О значају *RAGE* најбоље сведоче истраживања о *RAGE* инхибиторима као терапијској опцији код неуродегенеративних болести (*Borgarzone* и сар., 2017). Студије показују да оболели од МС имају повећану експресију *RAGE* у односу на контролну групу (*Sternberg* и сар., 2008). *RAGE* не само да је биомаркер селекције оболелих од МС у односу на здраву популацију, него је и параметар степена прогресије болести (*Sternberg* и сар., 2016).



Слика VI 3. Схематизован приказ повезаности витамина Д и параметара оксидативно-стресног статуса код укупне МС групе, МС пацијената током релапса и ремисије у односу на суплементацију витамином Д. AOPP-протеински производи узнапредовале оксидације; PAB-прооксидативно-антиоксидативни баланс; MDA-малондиалдехид; NO₃ и NO₂-нитрат и нитрит; SOD-супероксид-дизмутаза; CAT-каталаза; PONI-параоксоназа 1; TAS-тотални антиоксидативни статус; SH-сулфхидрилне групе

У супротности са нашим резултатима су студије у којима није документована корелација витамина Д и параметара оксидативно-стресног статуса (Wang и сар., 2017; Oliveira и сар., 2017-б).

VI 5. Оксидативни стрес и витамин Д у мултиплој склерози у зависности од пола

У погледу полних карактеристика, доказано је чешће оболевање жена од МС (2,5 пута), осим у примарно прогресивној форми болести (Alonso и сар., 2008). Пол има важну улогу у развоју, прогресији, клиничким симптомима МС, као и у одговору на терапију. Иако су жене подложније оболевању од МС, тежа клиничка слика и агресивнији облик болести доминирају код мушкараца (Bove и Chitnis, 2014). Ове разлике су последице генетских, епигенетских, хормонских фактора, као и разлика у имунском и нервном систему мушкараца и жена. Генски посредован Т ћелијски одговор је више експримиран код жена, што објашњава већу преваленцију аутоимунских болести у женској популацији (Hewagama и сар., 2009). Истовремено од значаја су и фактори спољашње средине, односно полне разлике у изложености или осетљивости на њихово деловање. Промена начина живота жена у последњих пола века објашњава пораст инциденције МС код жена (Voskuhl и Gold, 2012).

Мушки и женски МС испитаници у нашем истраживању се нису разликовали по старости, фази и дужини трајања болести, вредности EDSS, учесталости релапса, суплементацији витамином Д, примени DMT, као ни по пушачком статусу (Табела 18). Такође, приближно исти број мушкараца и жена оболелих од МС у нашем истраживању је последица преминације мушкараца у војном систему, према Политици и циљевима система квалитета Војномедицинске академије и приоритетности лечења војних осигураника (у Србији и даље доминантно мушког пола).

У зависности од пола, документоване се веће концентрације PAB и укупног билирубина, већа активност каталазе и ниже вредности мокраћне киселине, феритина и трансферина код жена у односу на мушкарце оболеле од МС (Табела 19). PAB је однос водоник-пероксида и мокраћне киселине, тако да нижа мокраћна киселина, карактеристична за женску популацију узрокује виши PAB. Естроген повећавајући бубрежну елиминацију подстиче клиренс мокраћне киселине и узрокује њене ниже серумске концентрације (Anton и сар., 1986). Веће концентрације PAB код жена документовали су и Dopsaj и сарадници (Dopsaj и сар., 2011). Већа активност каталазе код женских МС пацијената указује на већу концентрацију водоник-пероксида, супстрата за деловање каталазе, што додатно објашњава већи PAB код жена. Различите студије су документовале већу каталазну активност у женској популацији (Bolzan и сар., 1997; Mariani и сар., 2006).

Просечна старост жена у нашем истраживању је $40,5 \pm 9,9$ година, што указује да је већина жена у репродуктивном периоду (Табела 18). Управо због тога, нижи феритин и трансферин код жена у поређењу с мушкарцима је очекиван. Жене су због менструалног циклуса и углавном ниског дијететског уноса, дефицијентне у концентрацији гвожђа (Rushton и Barth, 2010). Ниже серумско гвожђе код жена узрокује виши трансферин и нижи феритин, који су, слично спроведеном истраживању, документовали и други аутори (Burger и сар., 2020). Ниже серумско гвожђе се рефлектује и у nižем хемоглобину код жена, што последично условљава и мању концентрацију његовог деградационог метаболита- укупног билирубина (Kapitulnik Jaime, 2004).

У погледу витамина Д, жене и мушкарци оболели од МС у нашем истраживању се не разликују у концентрацији витамина Д (Табела 19). Естроген индукује функцију витамина Д, тако што повећава експресију *VDR* и фаворизује акумулацију витамина Д. С друге стране, витамин Д снижава концентрацију естрогена, редукујући експресију ароматазе, кључног ензима у синтези естрогена, што је показатељ међусобних регулаторних ефеката који су значајни у хомеостазу (*Dupuis* и сар., 2021). За разлику од нас, ниже концентрације витамина Д код здравих жена су документовали *Verdoia* и *Al-Horani* са сарадницима (*Verdoia* и сар., 2015; *Al-Horani* и сар., 2016).

VI 6. Оксидативни стрес и витамин Д у мултиплој склерози у зависности од старости

Једна од карактеристика старења је хронична инфламација ниског степена, која се одржава услед константне, дуготрајне антигенске стимулације и пораста проинфламаторних маркера (*Sevenini* и сар., 2013). Истовремено, са годинама се смањују: структурне резерве ЦНС-а, потенцијал ремиелинизације, опоравак након релапса, ефикасност, а повећавају се *DMT*-узрокована нежељена дејства (*Zeydan* и *Kantarci*, 2020). Постоји директна корелација између година и ОС, што је потврда једне од теорија о старењу као последици прекомерног оксидативног стреса (*Liochev Stefan*, 2013). Као један од узрока повећаног ОС у старијој популацији наводи се акумулација гвожђа у ЦНС-у, услед фагоцитозе гвожђем богатих олигодендроцита (*Sanaei* и сар., 2016).

Наши пацијенти се у зависности од старосне границе од 40 година, нису разликовали по полу, фази болести, *EDSS*, учесталости релапса, суплементацији витамином Д, *DMT*, као ни по пушачком статусу. Очекивано, разликовали су се по трајању болести, са дужим трајањем болести код старијих пацијената (Табела 20).

Параметри оксидативно-стресног статуса се у односу на године живота наших пацијената разликују једино у вредности мокраћне киселине. Пацијенти старији од 40 година имају ниже вредности мокраћне киселине у поређењу са пацијентима који имају мање од 40 година (Табела 21). То је интересантно, зато што концентрација мокраћне киселине, према литературним подацима, опада са годинама (*Кизица* и сар., 2002; *Flauzino* и сар., 2019). Нижа концентрација мокраћне киселине наших старијих пацијената је нађена паралелно са негативном корелацијом мокраћне киселине и дужине трајања болести у МС групи и у групи пацијената у ремисији (Табела 15 и Табела 16). Слично, инверзну повезаност дужине трајања МС и концентрације мокраћне киселине су документовали и *Moccia* и сарадници (*Moccia* и сар., 2015).

Током старења, метаболизам витамина Д је знатно измењен, узрокујући све ниже концентрације витамина Д. Са годинама се смањују: количина 7-дехидрохолестерола и последично, синтеза витамина Д, конверзија 25(ОН)Д у 1,25(ОН)₂Д, апсорпција калцијума и *VDR* концентрација. Сви ови процеси се одвијају доминантно у животном добу од 65-70 година (*Gallagher Christopher*, 2013). Како је најстарији пацијент у овом истраживању имао 61 годину, то објашњава недостатак статистичке значајности у односу на године живота, иако генерално гледано, старији од 40 година имају ниже концентрације витамина Д (Табела 21).

Са старењем не развијају сви оболели од РРМС секундарно прогресивни облик: 33,7 % оболелих је и даље у релапсно-ремитентној фази без обзира на дужину трајања болести и већу животну

доб. Ипак, оболели од МС старији од 65 година углавном имају прогресиван ток болести (Sanaei и сар., 2016).

VI 7. Оксидативни стрес и витамин Д у мултиплој склерози у зависности од пушачког статуса

У оквиру истраживања проучавана је и концентрација параметара ОС и витамина Д код оболелих од МС у зависности од пушачког статуса. У групи МС испитаника *EDSS* је био већи код непушача него код пушача (Табела 22). То не изненађује с обзиром на то да је пушење вољна активност и да већина МС пацијената са погоршањем болести и порастом *EDSS* оставља пушење. Занимљиво је да у односу на светски стандард од 15,2 % пушача у МС популацији (Friend и сар., 2006), у истраживачкој групи је овај проценат дупло већи (33 %, Табела 22). Пушење не само да је фактор ризика за настанак МС, него и дозно зависно повећава активност МС и убрзава конверзију из РРМС у прогресивну форму (Hedstrom и сар., 2020-б). Индукујући инфекције респираторног тракта, пушење утиче на развој релапса и погоршање неуролошког дефицита (Sitas и сар., 2021). Такође, конзумација цигарета узрокује дефицијенцију витамина Д (Mousavia и сар., 2019) и негативно утиче на цревни микробиом (Savin и сар., 2018).

У испитиваној групи пацијената, пушачи и непушачи оболели од МС се нису разликовали по годинама, полу, фази и трајању болести, учесталости релапса и клиничкој фази болести (Табела 22). Добијене су веће концентрације прооксиданаса (*AOPP*, *PAB*, NO_3 и NO_2) и мања вредност антиоксиданса- укупног билирубина код МС пушача у поређењу са непушачима (Табела 23). Повећан ОС и снижен ниво антиоксидативне заштите код пушача је документован у бројним студијама (Mendez-Alvarez и сар., 1998; Ayaori и сар., 2000; Dietrich и сар., 2003).

Виши *AOPP*, *PAB*, NO_3 и NO_2 у МС групи испитаника који конзумирају цигарете су очекивани, посебно што је азот-моноксид присутан у дуванском диму (Jafari и Hintzen, 2011). Токсини из дуванског дима стимулишу неутрофиле и макрофаге на продукцију *ROS* (Der Vaart и сар., 2004) који активирају *NF-kB* и промовишу инфламацију и оксидативни стрес (Jimenez и сар., 2000).

С друге стране, нема разлике у концентрацијама *MDA* између пушача и непушача оболелих од мултипле склерозе (Табела 23). У складу са нашим резултатима је студија Kamal и сарадника (Kamal и сар., 1992). Претпоставка је да на липидну пероксидацију у МС више утиче патолошки образац болести, него само пушење.

Нижи укупни билирубин код пушача у односу на непушаче, као и ми, документовали су и бројни други аутори (Van Hoydonck и сар., 2001; Horsfall и сар., 2011; O'Malley и сар., 2014). Показано је да компоненте дуванског дима индукују уридин дифостат (енг. *Uridine diphosphate*; *UDP*) глукуронил трансферазу 1 *A1* ген (*UGT 1A1*). На основу *UGT 1A1* инструкција синтетиче се *UDP* глукуронил трансфераза, кључни ензим у катаболизму билирубина (Van der Bol и сар., 2007). Ова хипотеза је потврђена у истраживању на животињама (Villard и сар., 1998) за разлику од хуманих студија (Kodal и сар., 2020). Свакако, остаје препорука свим пушачима оболелим од МС да оставе пушење одмах по успостављању дијагнозе.

Резултати спроведеног истраживања су недвосмислено показали повећан ОС, повишен интрацелуларни, уз снижен екстрацелуларни антиоксидативни одговор, као и антиоксидативни капацитет витамина Д у крви код оболелих од мултипле склерозе. То потенцира значај што раније примене антиоксидативне терапије, као комплементарне терапијске опције у третману ове комплексне болести. Тако су показани позитивни ефекти суплементације мелатонином која повећава активност *SOD* и *GPx*, уз истовремено смањење *MDA* (Miller и сар., 2013, Adamczyk-

Sowa и сар., 2014;), док коензим *Q10* активира *SOD*, повећава *TAS* и снижава *MDA* код МС пацијената (*Sanoobar* и сар., 2013). Оно што компликује суплементацију антиоксидансима или витамином Д су њихове потенцијалне интеракције са *DMT*, као неприкосновеним приступом у лечењу ове болести. Могућа је имунолошка интеракција витамина Д и *DMT* која истовремено утиче на ефикасност *DMT* и на протективно дејство витамина Д (*Rotsteine* и сар., 2015), као и конкуренција у имуномодулаторном дејству мелатонина и интерферона (*Adamzyk-Sowa* и сар., 2017). Колики је њихов међусобни утицај, још увек није разјашњено, што указује на потребу за већим, проспективним студијама за расветљавање повезаности оксидативно-стресног статуса и витамина Д код оболелих од мултипле склерозе.

VII ЗАКЉУЧЦИ

1. Оболели од мултипле склерозе имају повећан ниво прооксиданаса (*PAB*, *MDA*, NO_3 и NO_2) у периферној крви у односу на здраве испитанике.
2. Концентрација *AOPP* је нижа код МС пацијената у односу на контролну групу, услед ниже концентрације супстрата за *AOPP*, албумина.
3. Оболели од МС имају повећане вредности интрацелулатних антиоксиданаса (*SOD*, *CAT* и феритин) у периферној крви у односу на здраве особе.
4. Вредности екстрацелулатних антиоксиданаса (*PONI*, *TAS*, укупних *SH* групе, укупног билирубина, мокраћне киселине и трансферина) су ниже код оболелих од мултипле склерозе у односу на контролну групу.
5. Пацијенти оболели од МС у фази релапса и у фази ремисије се не разликују у концентрацији параметара оксидативно-стресног статуса.
6. Оболели од МС након прилагођавања (енг. *Adjustment*) концентрације витамина Д услед суплементације витамином Д имају ниже вредности витамина Д у односу на контролну групу.
7. Концентрације витамина Д у серуму се не разликују између пацијената оболелих од МС у фази ремисије и пацијената у фази релапса.
8. Витамин Д смањује *MDA* и повећава NO_3 и NO_2 код оболелих од МС који нису на суплементацији витамином Д.
9. Код пацијената оболелих од МС, који су у фази ремисије и нису на суплементацији витамином Д, витамин Д смањује *MDA* и повећава NO_3 и NO_2 , док код пацијената у релапсу који нису на суплементацији витамином Д нема утицаја на *MDA* и NO_3 и NO_2 .
10. Витамин Д супримира оксидацију протеина (снижава *AOPP*) у укупној групи оболелих од МС који су на суплементацији витамином Д. Витамин Д не утиче на параметре оксидативно-стресног статуса код пацијената који су на суплементацији витамином Д током ремисије, ни током релапса.
11. Код оболелих од МС, са трајањем болести троши се и смањује концентрација мокраћне киселине, док се са повећањем учесталости релапса повећава *MDA* и смањује концентрација укупног билирубина. На вредност *EDSS* не утиче ни један од испитиваних параметара оксидативно-стресног статуса, као ни витамин Д.
12. Код пацијената у фази ремисије, утврђена је негативна корелација између дужине трајања МС и концентрације мокраћне киселине, као и позитивна корелација учесталости релапса и концентрације *MDA*. Вредност *EDSS* не корелира ни са параметрима оксидативно-стресног статуса ни са витамином Д.
13. Код МС пацијената у фази релапса већа учесталост релапса утиче на смањење концентрације укупног билирубина. На дужину трајања болести и на вредност *EDSS* не утичу испитивани параметри ОС и витамин Д.
14. У *ROC* анализи дијагностичке тачности параметара, изванредан потенцијал раздвајања пацијената са МС од контролне групе имају вредности *PAB*, *SOD* и укупних *SH*-група, док се са одличном дијагностичком тачношћу одликују концентрације NO_3 и NO_2 и *TAS*.

VIII ЛІТЕРАТУРА

- Acar A, Cevik MU, Evliyaoglu O, Uzar E, Tamam Y, Arıkanoglu A, и cap. Evaluation of Serum Oxidant/Antioxidant Balance in Multiple Sclerosis. *Acta Neurol Belg.* 2012;112(3):275-80.
- Adamczyk-Sowa M, Galiniak S, Żyracka E, Grzesik M, Naparło K, Sowa P, и cap. Oxidative Modification of Blood Serum Proteins in Multiple Sclerosis after Interferon Beta and Melatonin Treatment. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7905148.doi: 10.1155/2017/7905148.
- Adamczyk-Sowa M, Pierzchala K, Sowa P, Polaniak R, Kukla M, Hartel M. Influence of Melatonin Supplementation on Serum Antioxidative Properties and Impact of the Quality of Life in Multiple Sclerosis Patients. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(4):543-50.
- Agnello L, Scazzone C, Ragonese P, Salemi G, Sasso BL, Schillaci R и cap. Vitamin D receptor polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. *Neurol Sci.* 2016;37(2):261-7.
- Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Kolianos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem.* 2007;40(3-4):248-54.
- Alfredsson Lars, Olsson Tomas. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(4):a028944.doi: 10.1101/cshperspect.a028944.
- Al-Horani H, Abu Dayyih W, Mallah E, Hamad M, Mima M, Awad R, и cap. Nationality, Gender, Age, and Body Mass Index Influences on Vitamin D Concentration among Elderly Patients and Young Iraqi and Jordanian in Jordan. *Biochem Res Int.* 2016;2016:8920503.doi: 10.1155/2016/8920503.
- Alonso Alvaro, Hernan A Miguel. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review (review). *Neurology.* 2008;71:129–35.
- Amer Muhammad, Qayyum Rehan. Relation between serum 25-hydroxyvitamin d and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous national health and nutrition examination survey 2001 to 2006). *Am. J. Cardiol.* 2012;109(2):226–30.
- Anderson H Paul. Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2017;15:443–9.
- Anton FM, Puig JG, TRamos T, Gonzalez P, Ordas J. Sex Differences in Uric Acid Metabolism in Adults: Evidence for a Lack of Influence of estradiol-17 Beta (E2) on the Renal Handling of Urate. *Metabolism.* 1986;35(4):343-8.
- Armada-Moreira A, Gomes JI, Pina CC, Savchak OK, Concalves-Ribeiro J, Rei N, u cap. Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:90. doi: 10.3389/fncel.2020.00090.
- Arneth M Borros. Impact of B cells to the pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):128.doi: 10.1186/s12974-019-1517-1.
- Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, Cellular Iron Storage and Regulation. *IUBMB Life.* 2017;69(6):414-22.
- Arrambide Georgina and Tintore Mar. Diagnosis of multiple sclerosis: what is changing? *Expert Rev Neurother.* 2020;20(8):743-6.
- Artemiadis AK, Anagnostouli MC, Alexopoulos EC. Stress as a risk factor for multiple sclerosis onset or relapse: a systematic review. *Neuroepidemiology.* 2011;36(2):109–20.
- Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010;(6):599-612.
- Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;360438.doi:10.1155/2014/360438.

- Ayaori M, Hisada T, Suzukawa M, Yoshida H, Nishiwaki M, Ito T, и cap. Plasma levels and redox status of ascorbic acid and levels of lipid peroxidation products in active and passive smokers. *Environ Health Perspect.* 2000;108(2):105-8.
- Aydin O, Ellidag HY, Eren E, Kurtulus F, Yaman A, Yilmaz N. Ischemia modified albumin is an indicator of oxidative stress in multiple sclerosis. *Biochem. Med.* 2014;24:383–9.
- Azizieh F, Alyahya KO, Raghupathy R. Association between levels of vitamin D and inflammatory markers in healthy women. *J. Inflamm. Res.* 2016;9:51–7.
- Baarnhielma M, Hedstrom AK, Kockumb I, Sundqvistb E, Gustafssonc SA, Hillertb J, и cap. Sunlight is associated with decreased multiple sclerosis risk: no interaction with human leukocyte antigen-DRB1*15. *Eur J Neurol.* 2012;19(7):955-62.
- Balcerczyk A, Grzelak A, Janaszewska A, Jakubowski W, Koziol S, Marszalek M, и cap. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. *Bio Factors.* 2003;17:75-82.
- Baranzini E Sergio, Oksenberg R Jorge. *The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years.* *Trends Genet.* 2017;33(12):960-70.
- Bar-Or A, Pender MP, Khanna R, Steinman L, Hartung HP, Tap Maniar T, и cap. Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis: Theory and Emerging Immunotherapies. *Trends Mol Med.* 2020;26(3):296-310.
- Berg-Hansen P, Celius EG. Socio-economic factor and immigrant population studies of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2015;132(S99):37-41.
- Berridge J Michael. Vitamin D, reactive oxygen species and calcium signaling in ageing and diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016;5;371(1700):20150434. doi: 10.1098/rstb.2015.0434.
- Bikle D Daniel. Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(6):375-84.
- Bikle D Daniel. Vitamin D: Production, Metabolism, and Mechanisms of Action. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, и cap. Editors. *Endotext [Internet].* South Dartmouth (MA): MDText. com, Inc.; 2000.
- Biswas S, Das R, Banerjee ER. Role of free radicals in human inflammatory disease. *AIMD Biophys.* 2017;4(4):596-614.
- Bivona G, Agnello L, Bellia C, Lacolino G, Scazzone C, Lo Sasso B и cap. Non-Skeletal Activities of Vitamin D: From Physiology to Brain Pathology. *Medicina.* 2019;55:341. doi:10.3390/medicina55070341
- Bock Karl Walter, Kohle Christoph. Contributions of the Ah receptor to bilirubin homeostasis and its antioxidative and atheroprotective functions. *Biol Chem.* 2010;391(6):645-53.
- Bolzan AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Human Blood: Influence of Sex, Age and Cigarette Smoking. *Clin Biochem.* 1997;30(6):449–54.
- Borgarzone S, Savickas V, Luzi F, D Gee A. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 2017;60(17):7213-32.
- Bove Riley, Chitnis Tanuja. The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2014;20(5):520-6.
- Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2001;21(1):98–108.
- Brown J, Bianco JJ, McGrath JJ, Eyles DW. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 2003;343(2):139–43.
- Brown JW, Coles A, Horakova D, Havrdova E, Izquierdo G, Prat A Girard M и cap. Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA* 2019;321(2):175-87.

Burger A, Kotze MJ, Stein DJ, van Rensburg SJ, Howells FM. The relationship between measurement of in vivo brain glutamate and markers of iron metabolism: A proton magnetic resonance spectroscopy study in healthy adults. *Eur J Neurosci.* 2020;51(4):984-90.

Buron MD, Chalmer TA, Sellebjerg F, Barzinji I, Christensen JR, Christensen ML, и cap. Initial high-efficacy disease-modifying therapy in multiple sclerosis: A nationwide cohort study. *Neurology.* 2020;95(8):e1041-e1051. doi: 10.1212/WNL.0000000000010135.

Burton JM, Kimball S, Vieth R, Bar-Or A, Dosch HM, Cheung R, и cap. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74:1852-9.

Cannell JJ, Zaslhoff M, Garland CF, Scragg R, Giovannucci E. On the epidemiology of influenza. *Virology.* 2008;5:29(1):29. doi: 10.1186/1743-422x-5-29.

Carden TR, Correale J, Pasquini JM, Perez MJ. Transferrin Enhances Microglial Phagocytic Capacity. *Mol Neurobiol.* 2019;56(9):6324-40.

Cevenini E, Monti D, Franceschi C. Inflamm-ageing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013;16(1):14-20.

Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J. Immunol.* 2007;179:1634-47.

Chen Y, Zhang J, Ge X, Du J, Deb DK, Chun Y. Vitamin D Receptor Inhibits Nuclear Factor κ B Activation by Interacting with I κ B Kinase β Protein. *J Biol Chem.* 2013; 288(27):19450-8.

Chen Z, Vong CT, Gao C, Chen S, Wu X, Wang S, и cap. Bilirubin Nanomedicines for the Treatment of Reactive Oxygen Species (ROS)-Mediated Diseases. *Mol Pharm* 2020;17(7):2260-74. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00337.

Cheraghi M, Shahsavari G, Maleki A, Ahmadvand H. Paraoxonase 1 Activity, Lipid Profile, and Atherogenic Indexes Status in Coronary Heart Disease. *Rep Biochem Mol Biol.* 2017;6(1):1-7.

Chun HS, Gibson GE, DeGiorgio LA, Zhang H, Kidd VJ, Son JH. Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *J Neurochem.* 2001;76(4):1010-21.

Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Auto Immun Highlights.* 2017;8 (1):9. doi: 10.1007/s13317-017-0097-2.

Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol.* 2018;15:490-503.

Compston Alastair, Coles Alasdair. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2002;359(9313):1221-31.

Correale Jorge, Farez F Mauricio. The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 2011;33(1-2):6-11.

Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain.* 2009;132(Pt 5):1146-60.

Corsetti JP, Sparks CE, James RW, Bakker SJL, Dullaart RPF. Low Serum Paraoxonase-1 Activity Associates with Incident Cardiovascular Disease Risk in Subjects with Concurrently High Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol and C-Reactive Protein. *J Clin Med.* 2019;8(9):1357. doi: 10.3390/jcm8091357.

Cree BAC, Gourraud PA, Oksenberg JR, Bevan C, Crabtree-Hartman E, Gelfand JM и cap. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann Neurol.* 2016;80(4):499-510.

da Costa R, Szyper-Kravitz M, Szekanecz Z, Csepány T, Danko K, Shapira Y, и cap. Ferritin and prolactin levels in multiple sclerosis. *Isr Med Assoc J.* 2011;13: 91-5.

Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, и cap. PPAR mediates innate immunity by regulating the 1,25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 2010;60:179-86.

- Dankers W, Colin EM, van Hamburg JP, Lubberts E. Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front Immunol.* 2016;7: 697. doi: 10.3389/fimmu.2016.00697.
- Davidson ZE, Walker KZ, Truby H. Do Glucocorticosteroids Alter Vitamin D Status? A Systematic Review with Meta-Analyses of Observational Studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(3):738-44.
- de Almeida JP, Liberatti LS, Barros FE, Kallaur AP, Lozovoy MAB, Scavuzzi BM, и cap. Profile of oxidative stress markers is dependent on vitamin D levels in patients with chronic hepatitis C. *Nutrition* 2016;32(3):362-7.
- de Stefano N, Stromillo ML, Giorgio A, Bartolozzi ML, Battaglini M, Baldini, и cap. Establishing pathological cut-offs of brain atrophy rates in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2016;87:93-9.
- del Giudice MM, Indolfi C, Strisciuglio C. Vitamin D Immunomodulatory Aspects. *J Clin Gastroenterol.* 2018;52(1):S86-S88. doi: 10.1097/MCG.0000000000001112
- der Vaart H, Postma DS, Timens W, N H T ten Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax.* 2004;59(8):713-21.
- Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem.* 2007;14(11):1189-97.
- Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, Mathews RJ, Emery P, McDermott MF. Vitamin D₃ down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49(8):1466-71.
- Dietrich Cornelia. Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7943495. doi: 10.1155/2016/7943495.
- Dietrich M, Block G, Norkus EP, Hudes M, Traber MG, Cross CE, Packer L. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase γ -tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(1):160-6.
- Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol* 2019;26(1):27-40.
- Don BR, Rosales LM, Levine NW, Mitch W, Kaysen GA. Leptin is a negative acute phase protein in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2001;59(3):1114-20.
- Dopsaj V, Martinovic J, Dopsaj M, Stevuljevic JK, Bogavac-Stanojevic N. Gender-specific oxidative stress parameters. *Int J Sports Med.* 2011;32(1):14-9.
- Duan S, Lv Z, Fan X, Wang L, Han F, Wang H и cap. Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Lett.* 2014;570:108-13.
- Dupuis ML, Pagano MT, Pierdominici M, Ortona E. The role of vitamin D in autoimmune diseases: could sex make the difference? *Biol Sex Differ.* 2021;12(1):12. doi: 10.1186/s13293-021-00358-3.
- Ellman Gl. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1952;82:70-7.
- Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanisms and complications. *Arch. Med. Sci* 2017;13(4):851-63.
- Erel Ozcan. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37:277-85.
- Estevez G Alvaro, Jordan Joaquín. Nitric oxide and Superoxide, a Deadly Cocktail. *Ann N.Y.Acad. Sci.* 2002 (962):207-11.
- Famitafreshi Hamidreza, Karimian Morteza. Prostaglandins as the Agents That Modulate the Course of Brain Disorders. *Degener Neurol Neuromuscul Dis.* 2020;10:1-13.

Ferreira KPZ, Oliveira SR, Kallaur AP, Kaimen-Maciel DR, Lozovoy MAB, Regina E, и cap. Disease progression and oxidative stress are associated with higher serum ferritin levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2017;373:236-41.

Ferretti G, Bacchetti T, Principi F, Ludovico D, Viti B, Angeleri VA, и cap. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Mult Scler.* 2005;11(6):677-82.

Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, и cap. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):43. doi: 10.1038/s41572-018-0041-4.

Fisher SA, Brierley C, Gration B, Kimber CE, Cajide AP, Lamikanra AA. The role of vitamin D in increasing circulating T regulatory cell numbers and modulating T regulatory cell phenotypes in patients with inflammatory disease or in healthy volunteers: A systematic review. *PLoS One.* 2019;14(9): e0222313. doi: 10.1371/journal.pone.0222313

Fitzgerald KC, Munger KL, Köchert K, Arnason BG, Comi G, Cook S. Association of Vitamin D Levels With Multiple Sclerosis Activity and Progression in Patients Receiving Interferon Beta-1b. *JAMA Neurol.* 2015;72(12):1458-65.

Flauzino T, Simao ANC, Pereira WLCJ, Alfieri DF, Oliveira SR, Kallaur AP, и cap. Disability in multiple sclerosis is associated with age and inflammatory, metabolic and oxidative/nitrosative stress biomarkers: results of multivariate and machine learning procedures. *Metab Brain Dis.* 2019;34(5):1401-13.

Fleet C James. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Mol Cel Endocrinol.* 2017;453:36-45.

Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 2010;162:1-11.

Fragoso YD, Adoni T, Alves-Leon SV, Apostolos-Pereira SL, Arruda WO, Brooks JBB. No correlation was observed between vitamin D levels and disability of patients with multiple sclerosis between latitudes 18° and 30° South. *Arq Neuropsiquiatr.* 2017;75(1):3-8.

Franco PG, Pasquini LA, Perez MJ, Rosato-Siri MV, Silvestroff L, Pasquini JM. Paving the way for adequate myelination: The contribution of galectin-3, transferrin and iron. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3388-95.

Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.

Friend KB, Mernoff ST, Block P, Reeve G. Smoking rates and smoking cessation among individuals with multiple sclerosis. *Disabil Rehabil.* 2006;28(18):1135-41.

Galetta S, Villoslada P, Levin N, Shingler K, Ishikawa H, Parr E, и cap. Acute optic neuritis: unmet clinical needs and model for new therapies. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2015;2(4):e135. doi: 10.1212/NXI.0000000000000135.

Gallagher J Christopher. Vitamin D and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013;42(2):319–32.

Gianfrancesco MA, Stridh P, Rhead B, Shao X, Xu E, Graves JS, и cap. Evidence for a causal relationship between low vitamin D, high BMI, and pediatric-onset MS. *Neurology.* 2017;88(17):1623-9.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol.* 2004;251(3):261-8.

Giovannoni G, Butzkueven H, Dhin-Jalbut S, Hibart J, Kobelt G, Pepper G, и cap. Brain health: time matters in multiple sclerosis. *Mult Scler and Rel Dis.* 2016;9(1):S5-S48.

Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma.* 1991;31(1):32-5.

- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1493-505.
- Gold R, Wolinsky JS. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol. Scand.* 2011;124:75–84.
- Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology.* 2009;72:1914–21.
- Goswami B, Tayal D, Gupta N, Malika V. Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clin Chim Acta.* 2009;410:1-12.
- Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta.* 1991;196:143–51.
- Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev.* 2012;248(1):87-103.
- Goverman M Joan. Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol Rev.* 2011;241:228-40.
- Gray E, Kemp K, Hares K, Redondo J, Rice C, Scolding N, Wilkins A. Increased microglial catalase activity in multiple sclerosis grey matter. *Brain Res.* 2014;1559:55-64.
- Grubic Kezele Tanja, Curko-Cofek Bozana. Age-Related Changes and Sex-Related Differences in Brain Iron Metabolism. *Nutrients* 2020 ;12(9):2601. doi: 10.3390/nu12092601.
- Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005;6(11):1045-56.
- Guerrero AL, Gutierrez F, Iglesias F, Martin-Polo J, Merino S, Martin-Serradilla JA, и cap. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients inversely correlate with disability. *Neurol Sci.* 2011;32:347-50.
- Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Hollsborg P. A role of late Epstein- Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 2004;109:270–5.
- Haas J, Schwarz A, Korporal-Kuhnke M, Faller S, Jarius S, Wildemann B. Hypovitaminosis D upscales B-cell immunoreactivity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2016;294:18–26.
- Halliwell Barry. Albumin—An important extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.* 1988;37:569–71.
- Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2017;20:43–7.
- Hart PH, Lucas RM, Booth DR, Carroll WM, Nolan D, Cole JM, и cap. Narrowband uvb phototherapy for clinically isolated syndrome: A trial to deliver the benefits of vitamin D and other uvb-induced molecules. *Front. Immunol.* 2017;8:3. doi: 10.3389/fimmu.2017.00003.
- Hauser L Stephen, Oksenberg R Jorge. *The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration.* Neuron. 2006;52:61–76.
- Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, и cap. Ocrelizumab versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376:221–34.
- Hausler D, Torke S, Peelen E, Bertsch T, Djukic M, Nau R, и cap. High dose vitamin D exacerbates central nervous system autoimmunity by raising T-cell excitatory calcium. *Brain* 2019;142(9):2737-55.
- Hausler MR, Whitfield GK, Hausler AC, Sabir MS, Khan Z, Sandoval R, и cap. 1,25-Dihydroxyvitamin D and Klotho: A Tale of Two Renal Hormones Coming of Age. *Vitam Horm* 2016;100:165-230.
- Havrdova E, Belova A, Goloborodko A, Tisserant A, Wright A, Wallstroem E, и cap. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J Neurol* 2016;263(7):1287-95.

- Hawkes C, Giovannoni G, Lechner-Scott J, Levy M, Waubant E. Multiple Sclerosis and Vitamin D – Caviar or a Dog's Dinner? *Mult Scler Relat Disord*. 2019;28:A1-A2.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism, *Trends Biochem. Sci*. 2014;39:199-218.
- Hedstrom AK, Alfredsson L, Olsson T. Environmental factors and their interactions with risk genotypes in MS susceptibility. *Curr Opin Neurol*. 2016;29(3):293-8-a.
- Hedstrom AK, Olsson T, Alfredsson L. Smoking is a major preventable risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016;22(8):1021-6.
- Hedstrom AK, Olsson T, Kockum I, Hillert J, Alfredsson L. Low sun exposure increases multiple sclerosis risk both directly and indirectly. *J Neurol*. 2020;267(4):1045-52-a.
- Hedstrom Anna Karin. Smoking and disability progression in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2020;8:739-41-6.
- Herold J Marco, Reichardt M Holger. Glucocorticoid-induced apoptosis in animal models of multiple sclerosis. *Crit Rev Immunol*. 2013;33(3):183-202.
- Hewagama A, Patel D, Yarlagadda S, Strickland F, Richardson B. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun*. 2009;10(5):509-16.
- Hobart J, Bowen A, Pepper G, Crofts H, Eberhard L, T Berger T и cap. International consensus on quality standards for brain health-focused care in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2019;25(13):1809-18.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, и cap. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):1911-30.
- Horsfall LJ, Rait G, Walters K, Swallow DM, Pereira SP, Nazareth I, и cap. Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death. *JAMA* 2011;305: 691-7.
- Hosmer W David, Lemeshow Stanley. Assessing the fit of the model. *Applied logistic regression*. NY John Wiley and Sons; 2000:160-4.
- Hu Jim, Wan Yonghong. Tolerogenic dendritic cells and their potential applications. *Immunology*. 2011;132(3):307-14.
- Hu L, Zachariae ED, Larsen UG, Vilhardt F, Petersen SV. The dynamic uptake and release of SOD3 from intracellular stores in macrophages modulates the inflammatory response. *Redox Biol*. 2019;26:101268.doi: 10.1016/j.redox.2019.101268.
- Ighodaro M Osasenaga, Akinloye A Oluseyi. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *AJM* 2018;54: 287–93.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 2019;365(6460):eaav7188.
- Irving AA, Marling SJ, Seeman J, Plum LA, Hector F, DeLuca HF. UV light suppression of EAE (a mouse model of multiple sclerosis) is independent of vitamin D and its receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(45):22552-5.
- Jablonski KL, Chonchol M, Pierce GL, Walker AE, Seals DR. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with inflammation- linked vascular endothelial dysfunction in middle-aged and older adults. *Hypertension*. 2011;57(1):63–9.
- Jafari Naghme, Hintzen Q Rogier. The association between cigarette smoking and multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2011;1-2:78-85.

Jimenez LA, Thompson J, Brown DA, Rahman I, Antonicelli F, Ruffin R, и cap. Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;166(2):101-10.

Jirapongsananuruk O, Melamed I, Leung DYM. Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(5):981-5.

Jovicic S, Ignjatovic S, Kangrga R, Beletic A, Mirkovic D, Singh-Majkic N. Comparison of three different methods for 25(OH)/vitamin D determination and vitamin D status in general population-Serbian experience. *J Med Biochem.* 2012;31:347-57.

Kalincik T, Manouchehrinia A, Sobisek L, Jokubaitis V, Spelman T, Horakova D, и cap. Towards personalized therapy for multiple sclerosis: prediction of individual treatment response. *Brain* 2017;140(9):2426-43.

Kalincik Tomas. Multiple sclerosis relapses:epidemiology, outcomes and management. A systematic review. *Neuroepidemiology.* 2015;44(4):199–214.

Kallaur AP, Lopes J, Oliveira SR, Simao AN, Reiche EM, de Almeida ER, и cap. Immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress biomarkers of depression symptoms in subjects with multiple sclerosis: increased peripheral inflammation but less acute neuroinflammation. *Mol Neurobiol.* 2016;53:5191–202.

Kamal AAM, El Khafif M, Koraah S, Massoud A, Caillard JF. Blood Superoxide Dismutase and Plasma Malondialdehyde Among Workers Exposed to Asbestos. *Am J Ind Med.* 1992;21:353-61.

Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol.* 2014;72(3-4):132-41.

Kampman MT, Steffensen LH, Mellgren SI, Jorgensen L. Effect of vitamin D3 supplementation on relapses, disease progression, and measures of function in persons with multiple sclerosis: exploratory outcomes from a double-blind randomised controlled trial. *Mult Scler.* 2012;18(8):1144–51.

Kapitulnik Jaime. Bilirubin: An Endogenous Product of Heme Degradation with Both Cytotoxic and Cytoprotective Properties. *Mol Pharmacol.* 2004;66(4):773-9.

Kaur G, Trowsdale J, Fugger L. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. *Brain.* 2013;136(Pt 9):2657-76.

Kell B Douglas, Pretorius Ethersia. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics.* 2014;6:748-73.

Khalil M, Riedlbauer B, Langkammer C, Enzinger C, Ropele S, Stojakovic T, и cap. Cerebrospinal fluid transferrin levels are reduced in patients with early multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014;20(12):1569-77.

Kim SH, Kim SH, Lee JH, Lee BH, Yoon HJ, Shin DH. Superoxide Dismutase Gene (SOD1, SOD2, and SOD3) Polymorphisms and Antituberculosis Drug-induced Hepatitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015;7(1):88-91.

Kingwell E, Marriott J, Jette N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow S, и cap. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurolol.* 2013;13:128. doi: 10.1186/1471-2377-13-128.

Kirbas A, Kirbas S, Anlar O, Efe H, Yilmaz A. Serum paraoxonase and arylesterase activity and oxidative status in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci.* 2013(20):1106-9.

Koch Marcus, De Keyser Jacques. Uric acid and multiple sclerosis. *Neurol Res.* 2006;28(3):316-9.

Kodal JK, Colak Y, Kobylecki CJ, Vedel-Krogh S, Nordestgaard BG, Shoaib Afzal S. Smoking Reduces Plasma Bilirubin: Observational and Genetic Analyses in the Copenhagen General Population Study. *Nicotine Tob Res.* 2020;22(1):104–10.

Koshland E Daniel Jr. "The molecule of the year". *Science* 1992;258(5090):1861-992.

Kotur Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, Spasic S, Spasojevic Kalimanovska V, Bogavac Stanojevic N и cap. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem.* 2007;40:181-7.

Kourakis S, Timpani CA, de Haan JB, Gueven N, Fischer D, Rybalka E. Dimethyl Fumarate and Its Esters: A Drug with Broad Clinical Utility? *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(10):306. doi: 10.3390/ph13100306.

Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(12):1997-2015.

Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, Robles JA, Stenger S, Adams JS, Modlin RL. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol.* 2008;181:7115-20.

Kumar DR, Aslinia F, Yale SH, Mazza JJ. Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. *Clin Med Res.* 2011;9(1):46-9.

Kurtuncu M, Tuzun E, Turkoglu R, Petek-Balci B, Icoz S, Pehlivan M, и cap. Effect of short-term interferon-beta treatment on cytokines in multiple sclerosis: significant modulation of IL-17 and IL-23. *Cytokine.* 2012;59:400-2.

Kurtzke F John. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurol.* 1983;33(11):1444-52.

Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H. Effect of Aging on Serum Uric Acid Levels: Longitudinal Changes in a Large Japanese Population Group. *J Gerontol.* 2002;57(10):M660-4.

Lai W, Kinoshita M, Peng A, Li W, Qiu X, Zhu X, и cap. Does pregnancy affect women with multiple sclerosis? A prospective study in Western China. *J Neuroimmunol.* 2018;321:24-8.

Laird E, McNulty H, Ward M, Hoey L, McSorley E, Wallace JMW, и cap. Vitamin D deficiency is associated with inflammation in older Irish adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1807-15.

Langer-Gould A, Lucas RM, Xiang AH, Wu J, Chen LH, Gonzales E и cap. Vitamin D-Binding Protein Polymorphisms, 25-Hydroxyvitamin D, Sunshine and Multiple Sclerosis. *Nutrients* 2018;10(2):184. doi: 10.3390/nu10020184-a.

Langer-Gould A, Lucas R, Xiang AH, Chen LH, Wun J, Gonzales E и cap. MS Sunshine Study: Sun Exposure But Not Vitamin D Is Associated with Multiple Sclerosis Risk in Blacks and Hispanics. *Nutrients* 2018;10:268. doi:10.3390/nu10030268-6.

Lassmann Hans. Multiple sclerosis pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(3):a028936. doi: 10.1101/cshperspect.a028936.

Lee DH, Gold R, Linker RA. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and neurodegenerative diseases: therapeutic modulation via fumaric acid esters. *Int J Mol Sci.* 2012;13:11783-803.

Lee JH, Choi J-H, Kweon OJ, Park AJ. Discrepancy between Vitamin D Total Immunoassays due to Various Cross-reactivities. *J Bone Metab.* 2015;22:107-12.

Lee WC, Mokhtar SS, Munisamy S, Yahaya S, Rasool AHG. Vitamin D status and oxidative stress in diabetes mellitus. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2018;64(7):60-9.

Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, и cap. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain.* 2010;133(7):1900-13.

LeVine SM, Lynch SG, Ou CN, Wulser MJ, Tam E, Boo N. Ferritin, transferrin and iron concentrations in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Brain Res.* 1999;821(2):511-5.

LeVine M Steven. Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2016;16:47. doi: 10.1186/s12883-016-0564-9

Li CH, Tang X, Wasnik S, Wang X, Zhang J, Xu Y, и cap. Mechanistic study of the cause of decreased blood 1,25-Dihydroxyvitamin D in sepsis. *BMC Infect Dis.* 2019;19:1020. doi: 10.1186/s12879-019-4529-7.

- Li R, Patterson K, Bar- Or A. Reassessing the contributions of B cells in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2018;19:696–707.
- Lin T Michael, Beal M Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;443:787–95.
- Lin Rui. Crosstalk between Vitamin D Metabolism, VDR Signalling, and Innate Immunity. *Biomed Res Int*. 2016; Article ID Biomed Res Int 2016;2016:1375858. doi: 10.1155/2016/1375858.
- Liochev Stefan. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med*. 2013;60:1-4.
- Liu D, Yun Y, Yang D, Xinyu X, Dong X, Zhang N, и cap. What Is the Biological Function of Uric Acid? An Antioxidant for Neural Protection or a Biomarker for Cell Death. *Dis Markers*. 2019;2019:4081962. doi: 10.1155/2019/4081962.
- Liu W, Zhang L, Xu HJ, Li Y, Hu CM, Yang JY, и cap. The Anti-Inflammatory Effects of Vitamin D in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2736. doi: 10.3390/ijms19092736.
- Luxwolda, M., Kuiperst, R., Kema, I., Dijck- Brouwer, J., Muskiet, F. Traditionally living populations in East Africa have a mean serum 25-hydroxyvitamin D concentration of 115 nmol/L. *Br. J. Nutr*. 2012;108:1557–61.
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Cvetkovic T, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic D, и cap. Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. *J Neurol Sci*. 2014;337(1–2):8–13.
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Kocic G, и cap. Cerebrospinal fluid and plasma oxidative stress biomarkers in different clinical phenotypes of neuroinflammatory acute attacks. Conceptual accession: from fundamental to clinic. *Cell Mol Neurobiol*. 2013;33(6):767–77-a.
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Milojkovic M, Dunjic O, Stojanov D, и cap. Association of serum bilirubin and uric acid levels changes during neuroinflammation in patients with initial and relapsed demyelination attacks. *Metab Brain Dis*. 2013;28(4):629-38-6.
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Cvetkovic T, и cap. The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced protein oxidation products and total thiol content in plasma and CSF. *Neurochem Int*. 2013;62(7):988-97-b.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118–26.
- Longhini AL, von Glehn F, Brandao CO, de Paula RF, Pradella F, Moraes AS, и cap. Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse. *J Neuroinflammation*. 2011; 8(1):2. doi: 10.1186/1742-2094-8-2.
- Lorenzo GD, Minciullo PL, Leto-Barone MS, Piana SL, Porta GL, Saija A, и cap. Differences in the behavior of advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in patients with allergic rhinitis. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23(2):101-6.
- Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Cell Mol Med*. 2010;4:840-60.
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, и cap. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83:278-6.
- Lushchak I Volodymyr. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224:164-75.
- MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest*. 1985;76(4):1536-8.

- Magyari Melinda, Sorensen Per Soelberg. Comorbidity in Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2020;11:851.doi: 10.3389/fneur.2020.00851.
- Malaguarnera Lucia. Vitamin D and microbiota: Two sides of the same coin in the immunomodulatory aspects. *Int Immunopharmacol.* 2020; 79:106112. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106112.
- Mandia D, Ferraro EO, Nosari G, Montomoli C, Zardini E, Bergamaschi R. Environmental Factors and Multiple Sclerosis Severity: A Descriptive Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11:6417-32.
- Manson JE, Brannon PM, Rosen CJ, Taylor CL. Vitamin D Deficiency - Is There Really a Pandemic? *N Engl J Med.* 2016;375(19):1817-20.
- MaoPeizhong, Reddy P Hemachandra. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(1):66–79.
- Marcinowska-Suchowierska E, Kupisz-Urbańska M, Łukaszewicz J, Paweł Phudowski P, Jones G. Vitamin D Toxicity—A Clinical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:550. doi: 10.3389/fendo.2018.00550.
- Matías-Guiu J, Oreja-Guevara C, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis. *Neurologia.* 2018;33(3):177-86.
- McCracken E, Valeriani V, Simpson C, Jover T, McCulloch J, Dewar D. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxynonenal is toxic to axons and oligodendrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(11):1529-36.
- McKay KA, Jahanfar S, Duggan T, Tkachuk S, Tremlett H. Factors associated with onset, relapses or progression in multiple sclerosis: A systematic review. *Neurotoxicology.* 2017;61:189-212.
- Mendez-Álvarez E, Soto-Otero R, Sanchez-Sellero I, Lamas MLR. In vitro inhibition of catalase activity by cigarette smoke: relevance for oxidative stress. *J Appl Toxicol.* 1998;18(6):443-8.
- Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurology.* 2014 (14): 58.doi: 10.1186/1471-2377-14-58.
- Miletic J, Darakulic D, Pejic S, Petkovic M, Ilic VT, Miljkovic M, и cap. Prooxidant-antioxidant balance, advanced oxidation protein products and lipid peroxidation in Serbian patients with Parkinson's disease. *Int J Neurosci.* 2018;128(7):600-7.
- Miller E, Walczak A, Majsterek I, Kedziora J. Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. *J Neuroimmunol.* 2013;257(1-2):97-101.
- Mimura LAN, Silva TFC, Oliveita LRC, Ishikawa LLW, Borim PA, Machado CM и cap. Preclinical Therapy with Vitamin D3 in Experimental Encephalomyelitis: Efficacy and Comparison with Paricalcitol. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(4): 1914. doi: 10.3390/ijms22041914.
- Mocanu V, Oboroceanu T, Zugun-Eloae F. Current status in vitamin D and regulatory T cells--immunological implications. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2013;117 (4):965-73.
- Moccia M, Lanzillo R, Palladino R, Russo C, Carotenuto A, Massarelli M, и cap. Uric acid: a potential biomarker of multiple sclerosis and of its disability. *Clin Chem Lab Med.* 2015; 53(5): 753–9.
- Moretti R, Morelli ME, Caruso P. Vitamin D in Neurological Diseases: A Rationale for a Pathogenic Impact. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2245.doi: 10.3390/ijms19082245.
- Morgan J Michael, Liu Zheng-gang. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 2011;21(1):103-15.
- Mosayebi G, Ghazavi A, Ghasami K, Jand Y, Kokhaei P. Therapeutic effect of vitamin D3 in multiple sclerosis patients. *Immunol Invest.* 2011;40(6):627–39.
- Mossakowski AA, Pohlan J, Bremer D, Lindquist R, Millward JM, Bock M, и cap. Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation. *Acta Neuropathol.* 2015;130(6):799–814. doi.org/10.1007/s00401-015-1497-x.

- Mousa A, de Courten MPJ, Forbes J, de Courten B. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with nuclear factor-B activity but not with inflammatory markers in healthy normoglycemic adults. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;177:216-22.
- Mousavia SE, Aminic H, Heydarpour P, Chermahinig FA, Godderish L. Air pollution, environmental chemicals, and smoking may trigger vitamin D deficiency: Evidence and potential mechanisms. *Environ Int.* 2019;122:67-90.
- Moussa Z, Judeh ZMA, Ahmed SA. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 2019. doi:10.5772/intechopen.87778.
- Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2015;47(10):1107-13.
- Munzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(2):212-29.
- Muris AH, Smolders J, Rolf L, Klinkenberg LJJ, van der Linden N, Meex S, и cap. Vitamin D Status Does Not Affect Disability Progression of Patients with Multiple Sclerosis over Three Year Follow-Up. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156122. doi: 10.1371/journal.pone.0156122.
- Naseer MA, Rabah AM, Rasher RA, Hassan A, Fouad AM. Glutamate and Nitric Oxide as biomarkers for disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2020;38:101873. doi: 10.1016/j.msard.2019.101873
- Navarro-Gonzalez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem.* 1998;44 679-81.
- Nimse SBalasaheb, Pal Dilipkumar. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 2015;5:27986-8006.
- Nischwitz S, Muller-Myhsok B, Weber F. Risk conferring genes in multiple sclerosis. *FEBS Letters.* 2011;585:3789-97.
- Niu PP, Bo Song B, Xue Wang X, Xu YM. Serum Uric Acid Level and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *Front Genet.* 2020;11:254. doi: 10.3389/fgene.2020.00254.
- O'Malley SS, Wu R, Mayne ST, Jatlow PI. Smoking Cessation Is Followed by Increases in Serum Bilirubin, an Endogenous Antioxidant Associated With Lower Risk of Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *Nicotine Tob Res.* 2014;8:1145–9.
- Obradovic D, Andjelic T, Ninkovic M, Dejanovic B, Kotur-Stevuljevic J. Superoxide dismutase (SOD), advanced oxidation protein-products (AOPP) and disease-modifying treatment are related to better relapse recovery after corticosteroid treatment in multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2020. doi: 10.1007/s10072-020-04928-y.
- Oliveira SR, Kallaur AP, Reiche EMV, Kaimen-Maciel DR, Panis C, Lozovoy MAB, и cap. Albumin and Protein Oxidation are Predictors that Differentiate Relapsing-Remitting from Progressive Clinical Forms of Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol.* 2017;54(4):2961-8-a.
- Oliveira SR, Simao ANC, Alfieri DF, Flauzino T, Kallaur AP, Mezzaroba L, и cap. Vitamin D deficiency is associated with disability and disease progression in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress. *J Neurol Sci.* 2017;381:213-19-5.
- Oliveira SR, Kallaur AP, Simao ANC, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, и cap. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci.* 2012;321(1-2):49-53.
- Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2017;13:25-36.

Ortiz GG, Macias-Islas MA, Pacheco-Moises FP, Cruz-Ramos JA, Sustersik S, Barba EA и cap. Oxidative stress is increased in serum from Mexican patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Dis Markers*. 2009;26:35-9.

Palace J, Duddy M, Lawton M, Bregenzer T, Zhu F, Boggild M, и cap. Assessing the long-term effectiveness of interferon-beta and glatiramer acetate in multiple sclerosis: final 10-year results from the UK multiple sclerosis risksharing scheme. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90:251–60.

Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, и cap. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 1999;1411:385-400.

Pegoretti V, Swanson KA, Bethea JR, Probert L, Eisel ULM, Fischer R, и cap. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:7191080.doi: 10.1155/2020/7191080.

Peng F, Deng X, Yu Y, Chen X, Shen L, Zhong X, и cap. Serum bilirubin concentrations and multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2011;18(10):1355-9.

Pereira F, Barbachano A, Singh PK, Campbell MJ, Munoz A, Larriba MJ. Vitamin D has wide regulatory effects on histone demethylase genes. *Cell Cycle*. 2012;11(6):1081-9.

Perez-Mirrales FC. Daclizumab in multiple sclerosis. *Neurol*. 2018;66:271-82.

Peterson K Lisa, Fujinami S Robert. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007;184(1-2):37-44.

Pierrot-Deseilligny Charles, Souberbielle Jean-Claude. Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013;6(2):81-116.

Pinchuk I, Shoal H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids*. 2012;165(6):638-47.

Pineda-Torra I, Siddique S, Waddington KE, Farrell R, Jury EC. Disrupted Lipid Metabolism in Multiple Sclerosis: A Role for Liver X Receptors? *Front Endocrinol*. 2021.doi.org/10.3389/fendo.2021.639757.

Polachini CLN, Spanavello RM, Zanini D, Baldissarelli J, Pereira LB, Schetinger MRC, и cap. Evaluation of Delta-Aminolevulinic Dehydratase Activity, Oxidative Stress Biomarkers, and Vitamin D Levels in Patients with Multiple Sclerosis. *Neurotox Res*. 2016;29:230-42.

Poljsak B, Suput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:956792.doi:10.1155/2013/956792.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, и cap. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the ‘‘McDonald Criteria.’’ *Ann. Neurol*. 2011;69:292–302.

Pourshahidi L Kirsty. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *Proc Nutr Soc*. 2015;74(2):115-24.

Rajda C, Pukoli D, Bende Z, Majlath Z, Vécsei L. Excitotoxins, mitochondrial and redox disturbances in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):353. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18020353>.

Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetth L, Lincoln MR, Orton SM, Dymment DA, и cap. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet*. 2009;5(2):e1000369.

Rasul Thamini, Frederiksen Jette Lautrup. Link between overweight/obese in children and youngsters and occurrence of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2018; 265(12):2755-63.

Repovic Pavle. Management of Multiple Sclerosis Relapses. *Continuum (Minneapolis)* 2019;25(3):655-69.

Rhead B, Baarnhielm M, Gianfrancesco M, Mok A, Shao X, Quach H, и cap. Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. *Neurol Genet.* 2016;2 (5):e97.doi: 10.1212/NXG.000000000000097.

Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics.* 1999;9(6):745-53.

Roghani M, Mahboudi F, Saharian MA, Etemadifar M, Esfahani AJ, Nahrevanian H, и cap. Concentrations of nitric oxides metabolites in the serum of Iranian multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2010;294:92-4.

Rosen J Clifford. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med.* 2011;364(3):248–54.

Rosjo E, Lossius A, Abdelmagid N, Lindstrom JC, Kampman MT, Jorgensen L, и cap. Effect of high-dose vitamin D₃ supplementation on antibody responses against Epstein-Barr virus in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2017;23(3):395-402.

Rotstein DL, Healy BC, Malik MT, Carruthers RL, Musallam AJ, и cap. Effect of vitamin D on MS activity by disease-modifying therapy class. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015; 2(6): e167. doi: 10.1212/NXI.000000000000167.

Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, и cap. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology.* 2005;64:1144-51.

Ruggieri S, Tortorella C, Gasperini C. Pharmacology and clinical efficacy of dimethyl fumarate (BG-12) for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:229-39.

Rushton D Hugh, BarthH Julian. What is the evidence for gender differences in ferritin and haemoglobin? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010;73(1):1-9.

Sadeghi KB, Wessner U, Laggner M, Ploder D, Tamandl J, Friedl U, и cap. Vitamin D₃ down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol.* 2006;36(2):361-70.

Sadeghian M, Mastrolia V, Rezaei HA, Mosley A, Mullali G, Schiza D, и cap. Mitochondrial dysfunction is an important cause of neurological deficits in an inflammatory model of multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2016;6:33249. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33249>.

Sadowska-Bartosz I, Adamczyk-Sowa M, Galiniak S, Mucha S, Pierzchala K, Bartosz G. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. *Neurochem Int.* 2013;63:507–16.

Sadowska-Bartosz I, Bartosz G, Grune T and Sereikaite J. Role of Oxidative, Nitrate, and Chlorinative Protein Modifications in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;3267898.doi:10.1155/2018/3267898.

Sahebari M, Shakeri F, Azadi HG, Arjmand MH, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh MR, и cap. Pro-oxidant-Antioxidant Balance (PAB) in Rheumatoid Arthritis and its Relationship to Disease Activity. *Curr Rheumatol Rev.* 2015;11(1):28-33.

Salari N, Rasoulpoor S, Hosseinian-Far A, Razazian N, Mansouri K, Mohammadi M, и cap. Association between serum paraoxonase I activity and its polymorphisms with multiple sclerosis: a systematic review. *Neurol Sci.* 2021;42(2):491-500.

Sameiro-Faria M, Kohlova M, Ribeiro S, Rocha-Pereira P, Teixeira L, Nascimento H, и cap. Potential cardiovascular risk protection of bilirubin in end-stage renal disease patients under hemodialysis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:175286. doi: 10.1155/2014/175286.

Sanai SA, Saini V, Benedict RHB, Zivadinov R, Teter BE, Ramanathan M, и cap. Aging and multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2016;22(6):717-25.

Sandberg L, Bistrom M, Salzer J, Vagberg M, Svenningsson A, Sundstrom P. Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2016;22:1027–3.

Sanoobar M, Eghtesadi S, Azimi A, Khalili M, Jazayeri S, Gohari MR. Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Int J Neurosci*. 2013;123(11):776-82.

Sarsour EH, Louise Kalen A, Goswami P. Manganese superoxide dismutase regulates aredox cycle within the cell cycle. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(10):1618-27.

Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrient, Hormone and Immunomodulator. *Nutrients*. 2018;10:1656.doi: 10.3390/nu10111656.

Sautin YYuri, Johnson J Richard. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008;27(6):608-19.

Savin Z, Kivity S, Yonath H, Yehuda S. Smoking and the intestinal microbiome. *Arch Microbiol*. 2018;200:677–84.

Schofield C, Fischer SK, Townsend MJ, Mosesova M, Peng K, Setiadi AF, и cap. Characterization of IL-17AA and IL-17FF in Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis. *Bioanalysis*. 2016;8:2317-27.

Schreibelt G, van Horssen J, van Rossum S, Dijkstra CD, Drukarch B, de Vries HE. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res. Rev*. 2007;56(2):322–30.

Sempos CT, Heijboer AC, Bikle DD, Bollersler J, Bouillon R, Bronnon PM. Vitamin D assays and the definition of hypovitaminosis D: results from the First International Conference on Controversies in Vitamin D. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(10):2194-07.

Sessa W C. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res*. 1994;31(3):131-43.

Shab-Bidar S, Neyestani TR, Djazayeri A. The interactive effect of improvement of vitamin D status and VDR FokI variants on oxidative stress in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2015;69:216–22.

Sharifi N, Amani R, Hajiani E, Cheragian B. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? *Endocrine*. 2014;47:70–80.

Shea MK, Booth SL, Massaro HM, Jacques PF, D'Agostino RB, Dawson-Hughes B, и cap. Vitamin K and Vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring study. *Am J Epidemiol*. 2008;167(3):313–20.

Shirazi HA, Rasouli J, Ciric B, Rostami A, Zhang GX. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances neural stem cell proliferation and oligodendrocyte differentiation. *Exp Mol Pathol*. 2015;98:240–5.

Simpson S Jr, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, и cap. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;68:193–203.

Siotto M, Filippi MM, Simonelli I, Landi D, Ghazaryan A, Vollaro S, и cap. Oxidative Stress Related to Iron Metabolism in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients With Low Disability. *Front Neurosci*. 2019;13:86. doi: 10.3389/fnins.2019.00086.

Sitas F, Harris-Roxas B, Bradshaw D, Lopez AD. Smoking and epidemics of respiratory infections. *Bull World Health Organ*. 2021 ;99(2):164-5.

Slavov GS, Manova MG, Trenova AG, Kostadinova II , Pavlov PI, и cap. A prospective study on 25 hydroxyvitamin D serum levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Biomed Clin Res*. 2014;7(1):37-41.

Smith J Kenneth, Lassmann Hans. The role of nitric oxid in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2002;1(4):232-41.

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;14:1220–4.

Soilu-Hanninen M, Airas L, Mononen I, Heikkilä A, Viljanen M, Hanninen A. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2005;11(3):266–71.

Soilu-Hanninen M, Aivo J, Lindstrom BM, Elovaara I, Sumelahti ML, Farkkila M, и cap. A randomised, double blind, placebo controlled trial with vitamin D3 as an add on treatment to interferon beta-1b in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83(5):565–71.

Sosa AR, Murphey C, Ji N, Cardona EA, Fosthuber GT. The kinetics of myelin antigen uptake by myeloid cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2013;191(12):5848–57.

Sospedra Mireia, Martin Roland. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683–747.

Stankiewicz M James, Weiner L Howard. An argument for broad use of high efficacy treatments in early multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2019. doi: 10.1212/NXI.0000000000000636.

Steinman Lawrence. A rush to judgement on Th17. *J Exp Med.* 2008;205:1517–22.

Stepanović-Petrović Radica, Micov Ana. Novine u terapiji multiple skleroze. *Arh Farm.* 2015;65:223–36.

Sternberg Z, Weinstock-Guttman B, Hojnacki D, Zamboni P, Zivadinov RK, Chadha K, и cap. Soluble receptor for advanced glycation end products in multiple sclerosis: a potential marker of disease severity. *Mult Scler.* 2008;14(6):759–63.

Sternberg Z, Chiotti A, Tario J, Chichelli T, Patel N, Chadha K, и cap. Reduced expression of membrane-bound (m)RAGE is a biomarker of multiple sclerosis disease progression. *Immunobiology.* 2016;221(2):193–8.

Sun Ming, Zigman Seymour. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem.* 1978;90(1):81–9.

Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Pt B):93–100.

Szabo C, Isciropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:662–80.

Tain You-Lin, Baylis Chris. Dissecting the causes of oxidative stress in an in vivo model of hypertension. *Hypertension.* 2006; 48:828–9.

Takahashi S, Maeda T, Sano Y, Nishihara H, Takeshita Y, Shimizu F, и cap. Active form of vitamin D directly protects the blood–brain barrier in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2017;8:244–54.

Tamadon MR, Soleimani A, Keneshlou F, Mojarrad MZ, Bahmani F, Naseri A, и cap. Clinical trial on the effects of vitamin D supplementation on metabolic profiles in diabetic hemodialysis. *Horm Metab Res.* 2018;50(1):50–5.

Tankou SK, Regev K, Healy BC, Cox LM, Tjon E, Kivisakk P. Investigation of probiotics in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2018;24(1):58–63.

Tasset I, Aguera E, Sanchez-Lopez F, Feijoo M, Giraldo A, Cruz A, и cap. Peripheral oxidative stress in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Biochem.* 2012;45:440–4.

Tavazzi B, Batocchi AP, Amorini AM, Nociti V, D'Urso S, Longo S, и cap. Serum metabolic profile in multiple sclerosis patients. *Mult Scler Int.* 2011:167156. doi: 10.1155/2011/167156.

Tavori H, Rosenblat M, Vaya M, Aviram M. Paraoxonase 1 interaction with atherosclerotic lesions and arterial macrophages protect against foam cell formation and atherosclerosis development. *Clin Lipidol.* 2010;5(5):685–97.

Tetty P, Simpson S Jr, Bruce V, van der Mei IAF. Vascular comorbidities in the onset and progression of multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2014;347:23–33.

- Thomson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, и cap. *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria.* *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-73.
- Todorich B, Pasquini JM, Garcia CI, Paez PM, Connor JR. *Oligodendrocytes and myelination: the role of iron.* *Glia.* 2009;57(5):467-78.
- Toncev G, Miletic Drakulic S, Knezevic Z, Boskovic Matic T, Gavrilovic A, Toncev S и cap. *Prevalence of multiple sclerosis in the Serbian district Sumadija.* *Neuroepidemiology.* 2011;37(2):102-6.
- Torino C, Pizzini P, Cutrupi S, Tripepi R, Vilasi A, Tripepi G, и cap. *Effect of Vitamin D Receptor Activation on the AGE/RAGE System and Myeloperoxidase in Chronic Kidney Disease Patients.* *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:2801324.doi: 10.1155/2017/2801324.
- Touil T, Deloire-Grassin MS, Vital C, Petry KG, Brochet B. *In vivo damage of CNS myelin and axons induced by peroxynitrite.* *Neuroreport.* 2001;12(16):3637-44.
- Tremlett H, van der Mei IAF, Pittas F, Blizzard L, Paley G, Mesaros D, и cap. *Monthly ambient sunlight, infections and relapse rates in multiple sclerosis.* *Neuroepidemiology.* 2008;31:271-9.
- Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, и cap. *Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis.* *Am J Clin Nutr.* 2012;95(6):1357-64.
- Trochoutsou AI, Kloukina V, Samitas K, Xanthou G. *Vitamin-D in the immune system: Genomic and non-genomic actions.* *Mini Rev Med Chem.* 2015;15(11):953-63.
- Van der Bol JM, Mathijssen RH, Loos WJ, Friberg LE, van Schoik RHN, de Jonge MJA, и cap. *Cigarette smoking and irinotecan treatment: pharmacokinetic interaction and effects on neutropenia.* *J Clin Oncol.* 2007; 25: 2719-26.
- van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, Van der Valk P, и cap. *Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression.* *Free Radic Biol Med.* 2008;45(12):1729-37.
- van Hoydonck PG, Temme EH, Schouten EG. *Serum bilirubin concentration in a Belgian population: the association with smoking status and type of cigarettes.* *Int J Epidemiol.* 2001;30:1465-72.
- van Langelaar J, van der Vuurst de Vries MR, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepmann TA, и cap. *T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention.* *Brain.* 2018;141: 1334-49.
- Vasavda C, Kothari R, Malla AP, Tokhunts R, Lin A, Ji M, и cap. *Bilirubin links heme metabolism to neuroprotection by scavenging superoxide.* *Cell Chem Biol.* 2019;26(10):1450-60.
- Verdoia M, Schaffer A, Barbieri L, Giovine GD, Marino P, Suryapranata H, и cap. *Impact of gender difference on vitamin D status and its relationship with the extent of coronary artery disease.* *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25(5):464-70.
- Villard PH, Hcrber R, Seree EM, Attolini L, Magdalou J, Lacarelle B. *Effect of cigarette smoke on UDP-glucuronosyltransferase activity and cytochrome P450 content in liver, lung and kidney microsomes in mice.* *Pharmacol Toxicol.* 1998;82:74-9.
- Vincent HK, Taylor AG. *Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans.* *Int J Obes (Lond).* 2006;30(3):400-18.
- Voskuhl R Rhonda, Gold M Stefan. *Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression.* *Nat Rev Neurol.* 2012;8(5):255-63.
- Wang EW, Siu PM, Pang MY, Woo J, Collins AR, Benzie FF. *Vitamin D deficiency, oxidative stress and antioxidant status: only weak association seen in the absence of advanced age, obesity or pre-existing disease.* *Br J Nutr.* 2017;118:11-6.

- Wang K, Song F, Fernandez-Escobar A, Luo G, Wang JH, Sun Yu. *The Properties of Cytokine in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. Am J Med Sci.* 2018;356(6):552-60.
- Wang P, Xie K, Wang C, Bi J. *Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. Eur Neurol.* 2014;72:249–54.
- Wang X, Sun X, Niu M, Zhang X, Wang J, Zhou C, Xie A. *RAGE Silencing Ameliorates Neuroinflammation by Inhibition of p38-NF- κ B Signaling Pathway in Mouse Model of Parkinson's Disease. Front Neurosci.* 2020;14:353. doi: 10.3389/fnins.2020.00353. eCollection 2020.
- Wang Y, Kuro-o M, Sun Z. *Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway. Aging Cell.* 2012;11(3):410–7.
- Wasnik S, Sharma I, Baylink DJ, Tang X. *Vitamin D as a Potential Therapy for Multiple Sclerosis: Where Are We? Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3102. doi: 10.3390/ijms21093102.
- Webb AR, Kazantzidis A, Kift RC, Farrar MD, Wilkinson J, Rhodes LE. *Colour Counts: Sunlight and Skin Type as Drivers of Vitamin D Deficiency at UK Latitudes. Nutrients.* 2018;10:E457. doi.org/10.3390/nu10040457.
- Weideman AM, Tapia-Maltos MA, Johnson K, Greenwood M, Bielekova B. *Meta-analysis of the Age-Dependent Efficacy of Multiple Sclerosis Treatments. Front Neurol.* 2017;8:577. doi: 10.3389/fneur.2017.00577.
- Weydert J Christine, Cullen J Joseph. *Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Nat Protoc.* 2010;5(1):51-66.
- White H John. *Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: Past, present and future. J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121:234–8.
- Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. *A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. Ann N Y Acad Sci.* 2002;962:242-59.
- Wingerchuk M Dean. *Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. Ther Adv Neurol Disord.* 2012;5(1):13–22.
- Wiseman Helen. *Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. FEBS Lett.* 1993;326(1-3):285-8.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, и cap. *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13.
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Hollick MF. *Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. Am J clin Nutr.* 2000;72(3):690-3.
- Wrzosek M, Lukaszkiwicz J, Wrzosek M, Jakubczyk A, Matsumoto H, Piątkiewicz P, и cap. *Vitamin D and the central nervous system. Pharmacol Rep.* 2013;65(2):271-8.
- Xie Y, Tian Z, Han F, Liang S, Gao Y, Wu D. *Factors associated with relapses in relapsing-remitting multiple sclerosis. Medicine (Baltimore).* 2020;99(27):e20885. doi: 10.1097/MD.00000000000020885
- Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, и cap. *Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho. J Biol Chem.* 2005;280(45):38029–34.
- Yamout B, Sahraian M, Bohlega S, Al-Jumah M, Goueider R, Dahdaleh M, и cap. *Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of multiple sclerosis: 2019 revisions to the MENACTRIMS guidelines. Mult Scler Relat Disord.* 2020;37:101459. doi:10.1016/j.msard.2019.101459.
- Yan Liang-Jun. *Protein Redox Modification as a Cellular Defense Mechanism against Tissue Ischemic Injury. Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:343154. doi: 10.1155/2014/343154.
- Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE, Gershwin ME. *The implication of vitamin D and autoimmunity: A comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;44: 217–26.

Zeydan Burcu, Kantarci H Orhun. *Impact of Age on Multiple Sclerosis Disease Activity and Progression. Curr Neurol Neurosci Rep.* 2020;20(7):24. doi: 10.1007/s11910-020-01046-2.

Zhang Y, Leung DYM, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, и cap. *Vitamin D Inhibits Monocyte/Macrophage Proinflammatory Cytokine Production by Targeting MAPK Phosphatase-1. J Immunol.* 2012;188:2127-35.

Zhou LL, Cao W, Xie C, Tian J, Zhou Z, Qiugen Z, и cap. *The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. Kidney Int.* 2012;82(7):759-70.

Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM. *Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. Acta Physiol (Oxf).* 2015;214(3):329-48.

Żurawska-Plaksej E, Grzebyk E, Marciniak D, Szymanska-Chabowska A, Piwowar A. *Oxidatively modified forms of albumin in patients with risk factors of metabolic syndrome. J Endocrinol Invest.* 2014; 37(9): 819–27.