

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

**A D VITAMIN VIZSGÁLATA NEM DIFFERENCIÁLT
COLLAGENOSISBAN**

DR. ZÖLD ÉVA

Témavezető: Prof. Dr. Bodolay Edit



DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLOGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4.
Bevezetés	6.
Irodalmi áttekintés	8.
A Nem Differenciált Collagenosis (NDC) diagnózisa és klinikai jellemzői	8.
Az NDC kórlefolyása és prognózisa	12.
A D vitamin metabolizmusa, homeosztázisa.....	14.
A D vitamin immun-regulatív funkciója	17.
A D vitamin hatása az innate immunrendszerre	18.
Az adaptív immunitás modulációja	21.
A D vitamin hatása a monocitákra és a dendritikus sejtekre	21.
A limfociták mint a 1,25(OH) ₂ D ₃ direkt targetjei	24.
Mennyi az optimális D vitamin szint a szervezetben?	27.
Az alacsony D vitamin szint és az autoimmun betegségek	28.
D vitaminhiány az egyes autoimmun betegségekben	29.
Célkitűzések	34.
Betegek és módszerek	36.
Betegek	36.
D vitamin szint meghatározás	38.
Immunszerológiai vizsgálatok	38.
A CD4+CD25+ T sejtek izolálása	39.
Szuppressziós assay	39.
A CD4+CD25 ^{high} Foxp3+ T sejtek meghatározása Flow Citométerrel	40.
Az intracitoplazmatikus citokinek meghatározása Flow Citométerrel	41.
A szérumban IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-17 IL-23 és IL-10 meghatározása ELISA módszerrel	42.
Statisztikai analízis	42.
Eredmények	43.
A 161 NDC-s beteg klinikai és szerológiai adata	43.
A D vitamin szint meghatározás eredménye a 161 NDC-s betegben	45.
Összefüggés a D vitamin szint valamint a klinikai és laboratóriumi paraméterek között 161 NDC-s beteg vizsgálatakor	46.

Az alfacalcidol terápiában részesülő D vitamin hiányos NDC-s betegek demográfiai jellemzői	49.
Plazma D vitamin szintek orális D vitamin kezelés előtt és után NDC-s betegekben	49.
Szérum citokin koncentrációk a 25 NDC-s betegben, a D vitamin terápia előtt és azt követően	50.
CD4+IL-17 expresszáló Th17 sejtek és CD4+CD25^{high}Foxp3+T sejtek vizsgálata a 25 NDC-s beteg szérumában - Th17/nTreg egyensúly az alfacalcidol kezelés előtt és után	51.
A Treg sejtek funkcionális aktivitása az alfacalcidol terápiát követően	52.
Megbeszélés	54.
Összefoglalás - Új eredmények és az eredmények hasznosítása	68.
Irodalomjegyzék	70.
Köszönetnyilvánítás	104.
Publikáció	105.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Anti-CCP	anti-ciklikus citrullinált fehérje
Anti-ENA	extrahálható nukleáris antigén elleni antitest
Anti-Jo1	hisztidil-tRNS-szintetáz elleni antitest
Anti-PM1	myositis specifikus antitest
Anti-RNP	ribonukleoprotein elleni antitest
Anti-Scl70	scleroderma 70 antigén elleni antitest
Anti-SSA	Sjögren szindrómával összefüggő A antigén
Anti-SSB	Sjögren szindrómával összefüggő B antigén
ANF	anti-nukleáris faktor
APCs	antigén prezentáló sejtek
BMD	bone mineral density - csontsűrűség
C	komplement
CRP	C reaktív protein
CTD	connective tissue disease – definitív kötőszöveti betegség
DCs	dendritikus sejtek
ELISA	enzym linked immunosorbent assay
HRCT	nagy felbontóképességű komputer tomográf
IBD	inflammatory bowel disease - gyulladásos bélbetegség
Ig	immunglobulin
IFN	interferon
IL	interleukin
LPS	lipopoliszacharid
MCTD	mixed connective tissue disease – kevert kötőszöveti betegség

MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
NDC	nem differenciált collagenosis
OD	optikai denzitás
PM/DM	polymyositis-dermatomyositis
RA	rheumatoid arthritis
RANK	receptor activator of nuclear factor κ B
RF	rheumatoid faktor
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SS	Sjögren szindróma
SSc	szisztémás sclerosis
SM	szklerosis multiplex
UCTD	undifferentiated connective tissue disease – nem differenciált kötőszöveti betegség
Th	helper T sejt
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor nekrosis faktor
TyP1DM	immun mediálta diabetes 1
Treg	regulatorikus T sejt
VDR	D vitamin receptor
Vs	versus

BEVEZETÉS

A szisztémás autoimmun kórképek – vagy ahogyan a nemzetközi irodalomban nevezik, kötőszöveti betegségek (connective tissue disease- CTD) – olyan multifaktoriális kórképek, amelyekben a genetikai, hormonális és a környezeti tényezők együttes hatására szabályozási rendellenességek jelentkeznek, és ezek az immuntoleranciát károsítva átmeneti vagy tartós gyulladást és szervkárosodást okoznak. A kórlefolyás hullámzó, melynek során aktív és viszonylagos nyugalmi szakaszok követik egymást. A szisztémás autoimmun kórképek kialakulása egy hosszabb folyamat eredménye, mivel a betegség szintjét elérő, vagyis a klinikai tüneteket és/vagy hisztológiai elváltozást (gyulladás, elhalás, funkciókárosodás) okozó patológiai állapot létrejöttéhez időre van szükség.

Különös figyelmet érdemel a definitív poliszisztémás autoimmun kórképet megelőző állapot, az *Nem Differenciált Collagenosis* (NDC)- vagy más terminológiával UCTD (undifferentiated connective tissue disease), amikor a poliszisztémás autoimmun betegségnek a gyanúja már felmerül, de nincs meg az adott kórkép diagnosztizálásához szükséges tünetcsoport és autoantitest, illetve nincsenek meg a poliszisztémás autoimmun betegség diagnosztikai kritériumának követelményei [1-7]

Az elmúlt évek adatai szerint az autoimmun betegségek morbiditása és mortalitása világszerte nőtt, jelenleg a harmadik helyet foglalja el a kardiovaszkuláris és tumoros betegségek mögött [8]. A szisztémás autoimmun kórképek kialakulásának oki tényezői, e betegségek pontos patomechanizmusa jelenleg nem tisztázott. Tudjuk, hogy kialakulásukhoz, illetőleg a betegség progressziójához egy adott genetikai háttér mellett külső vagy belső környezeti tényezők szükségesek, például vírus-, baktérium-, gyógyszerhatás, hormonális változások, napfény.

Az 1990-es évek óta mind nagyobb számú megfigyelés bizonyítja, hogy a D vitamin homeosztázis befolyásolja az immunológiai folyamatokat, és hogy a D vitamin egyike azoknak a környezeti faktoroknak, amelynek hiánya alapvető tényező lehet az autoimmun betegségek kifejlődésében és a kórfolyamat progressziójában [9;10].

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az NDC diagnózisa és klinikai jellemzői

A hazai irodalomban 1961-ben Petrányi Gyula professzor használta elsőként a NDC fogalmát, és ismerte fel az NDC kórállapot jelentőségét. Megállapítása máig érvényesnek tekinthető, miszerint „a collagen-betegségek gyakran jelentkeznek atípusos formában, melyek a jellegzetes tüneteket mutató klasszikus differenciált collagen-betegségek bizonyos diagnosztikus tüneteit nélkülözik” [7]. A nemzetközi irodalomban az ún. Undifferentiated Connective Tissue Disease (UCTD) fogalma jórészt az 1980-as években jelent meg szélesebb körben, és azokra a kórállapotokra javasolták alkalmazását, ahol esetleg várható egy poliszisztémás autoimmun kórkép kifejlődése, de a meglévő eltérések alapján a diagnózis még nem állítható fel [1;11-13]. (Kasukawa, Elsevier Amsterdam 1987; Sharp, GC Amsterdam Elsevier, 1987).

Hosszú időbe telt, hogy az NDC, mint önálló entitás szerepeljen a szakirodalomban, mert hovatarozása, megítélése nem volt egységes, elsősorban a szisztémás lupus erythematosussal (SLE) kapcsolatban [12;13]. Voltak, akik a lupusszerű (lupus-like), prelupus vagy inkomplett lupus elnevezést használták akkor, amikor az SLE két vagy három jellemző tünete már jelen volt, de nem volt teljes az SLE klasszifikációja. Kétségtelenül ezekben az esetekben mondható az, hogy NDC kórállapotról van szó, ami várhatóan differenciálódni fog SLE irányába. Rendkívül fontos, hogy ezeket a betegeket szorosan ellenőrizni kell, mert a követés során olyan új szervi eltérések és autoantitestek jelenhetnek meg, ami alapján mégsem SLE lesz a végleges diagnózis [14].

Az előbbi nézettel ellentétben LeRoy az NDC-t fogalmát a sclerodermát megelőző állapotnak tartotta, [13] Cervera szerint pedig az NDC azonos az anti-U1-RNP-pozitív kevert kötőszöveti betegséggel (mixed connective tissue disease-MCTD) [15].

A szisztémás autoimmun kórképek, így az NDC diagnózisának is az alappillére: a kórképre jellemző tünettan, a sajátos patomorfológia, valamint az immunológiai abnormitások jelenléte. A poliszisztémás autoimmun kórképeknek nemzetközileg elfogadott kritériumtünetei vannak, amely szerint meghatározott klinikai és immunszerológiai eltérések jelenléte szükséges ahhoz, hogy az SLE-t, a szisztémás sclerosist (SSc), MCTD-t, a polymyositis-dermatomyositist (PM/DM), a Sjögren-szindrómát (Ss) és a rheumatoid arthritist (RA) diagnosztizálni tudjuk. Az NDC változatos tünettant produkálhat, és valamennyi poliszisztémás autoimmun kórképre jellemző sajátosság előfordulhat a kórállapotban.

Nagyon fontos a differenciáldiagnózis, miszerint ki kell zárni, hogy ezek a tünetek más okkal – például infekció, tumor – nem magyarázhatók.

Az NDC kórállapotban előforduló leggyakoribb klinikai tünetek: polyarthritisz/polyarthralgia, reggeli kéz kisízületi merevség, Raynaud jelenség a kéz és vagy a láb ujjain, myalgiform fájdalom, bőrtünetek (erythema, fotoszenzitivitás, nyálkahártya fekélyek), pleuritis/pericarditis, szem-, és szájszáradás, központi idegrendszeri tünetek (convulsio, fejfájás, migrén, trigeminus neuralgia), funkcionális és morfológiai légzőszervi eltérések, perifériás neuropathia, az egyéb okkal nem magyarázható láz, visszatérő hőemelkedés, máskor nyirokcsomó-, máj-, lépnagyobbodás. Az 1-es táblázatban az NDC-s betegek leggyakoribb szervi eltéréseit tüntettük fel (**1. táblázat**) [3;6;16-20].

Az NDC-ben észlelhető laboratóriumi és immunszerológiai eltérések közül a leggyakoribb a szérumfehérjék mennyiségi és minőségi változása, az összfehérje – ezen belül is az egyes immunglobulinok – megsaporodása (cyroglobulin-pozitivitás, a vörösvértest-süllyedés fokozódása), az akutfázis-fehérjék szintjének emelkedése (CRP), sejtmag- és citoplazmakomponensek ellen termelődött autoantitestek megjelenése, az immunkomplexek

szintjének kóros növekedése, illetve a komplementrendszer klasszikus és alternatív aktivációját jelző eltérések (a CH_{50} -, az AP_{50} -szint csökkenése). Ugyanakkor tudni kell azt, hogy az immunregulációs zavar eredményeként észlelt immunszerológiai eltérések (pl. alacsony össz hemolitikus komplement érték, autoantitestek jelenléte, immunglobulin értékek megváltozása) önmagukban klinikai tünetek nélkül **még nem jelentenek poliszisztémás autoimmun betegséget.**

Nem differenciált collagenosis

Klinikai tünetek:

- Arthralgia (37-80%), arthritis (14-70%)
- Raynaud-jelenség (45-60%)
- Myalgia, myositis (3-4%)
- Serositisek (pleuritis, pericarditis) (4%)
- Bőrtünetek (erythema, fotoszenzitivitás) (28-35%)
- Xerostomia (7-40%), xerophtalmia (8-36%)
- Központi és perifériás idegrendszeri tünetek (45-50%)
- Funkcionális és morfológiai légzőszervi eltérés (10-40%)
- Egyéb okkal nem magyarázható láz (15-25%)

Laboratóriumi és immunszerológiai eltérések:

- Autoantitestek a sejtmag- és citoplazmakomponensek ellen (ANA, anti-ENA, anti-RNP, anti-DNS, anti-SSA, anti-SSB, anti-Jo1, anti-centromer, anti-Scl70, anti-PM1, anti-foszfolipid antitestek)
- Gyorsult vörösvértest-süllyedés

1. táblázat. A nem differenciált collagenosis diagnosztikai kritériuma. A nem differenciált collagenosis diagnózisa két klinikai tünet és egy nem szervspecifikus autoantitest jelenléte esetén mondható ki (a főbb klinikai tünetek előfordulási gyakorisága zárójelben)[3;6;16-20].

Az NDC kórállapotot (klinikai + szerológiai eltérések együtt) megelőzően lehetséges egy klinikai tünetek nélküli előfázis, amikor „csak” szerológiai eltérések vannak, patogén

autoantitestek, és az autoimmunitás nem ér el olyan mértéket, hogy az klinikai tünetekben is megnyilvánuljon. A klinikai tünetek nélküli előfázis még nem NDC. NDC mint kórállapot akkor véleményezhető, ha a szerológiai, immunológiai abnormitások mellett a betegnek a poliszisztémás autoimmun betegségekhez hasonló klinikai tünetei is vannak.

Mindemellett az alacsony fehérvérsejt szám, thrombocita szám csökkenés, anaemia, proteinuria, magas rheumatoid faktor (RF) titer is észlelhető. Az NDC-s betegek szérumában kimutatható autoantitestek a sejtmag és citoplazma komponensek ellen termelődnek: anti-natív DNS, anti-ENA, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA, anti-SSB, anti-Scl-70, anti-centromer, anti-Jo1, anti-PM1, foszfolipid struktúrák elleni antitestek (anti-cardiolipin antitest) lehetnek jelen.

Az immunológiai centrumokban az NDC-t többnyire a saját kritériumtünetek alapján diagnosztizálják. *Alarcon-Segovia* 11 klinikai tünet és két laboratóriumi eltérés, a gyorsult vörösvértest-süllyedés és álpozitív VDRL-pozitivitás közül három megléte alapján véleményezett NDC-t [21]. *Czirják* és munkacsoportja a kapillármikroszkópiával észlelt eltéréseket is alapvető fontosságúnak tartja a NDC állapot kimondásához [22], Mások szerint pedig egy, a poliszisztémás autoimmun betegségre jellemző tünet és egy nem szervspecifikus autoantitest szükséges az NDC kórismézéséhez [6]. Mosca és a saját centrumunk véleménye szerint, az NDC kórállapot akkor állt fenn, ha a betegnek legalább két poliszisztémás autoimmun betegségre jellemző szervi tünete van, és egy, nem-szervspecifikus autoantitest mutatható ki a szérumában [16;20]. Megjegyzendő azonban, hogy az egyes centrumok kritériumtünetei között lényegi eltérés nincs, a különbség tulajdonképpen a szisztémás autoimmun betegségre jellemző szervi tünetek számában van. Mindemellett valamennyi munkacsoport egyetért abban, hogy az NDC kórállapot kimondásához szükséges a sejtmag- vagy citoplazma komponensek ellen termelődött antitestek jelenléte.

Az NDC kórlefolyása és prognóza

A NDC nem stabil, hanem dinamikus jellegű kórkép, aminek progresszióját a klinikai állapot változása jelzi. A betegség előrehaladásával új szervi manifesztációk jelenhetnek meg, a már meglevő klinikai és immunológiai abnormitások intenzívebbé válhatnak, állandósulhatnak. *Bodolay és mtsai* 578 NDC-s betegének követésével nyert adatai azt mutatják, hogy az NDC-s betegek 30-40%-a definitív autoimmun kórképbe differenciálódik, míg a betegek fele megmarad az NDC stádiumban [16]. 10-20%-ban az is előfordulhat, hogy a meglevő tünetek visszafejlődhetnek, és nem is jelentkeznek újra [4;16]. Általában elmondható, hogy az NDC stádiumból a poliszisztémás autoimmun betegségbe történő differenciálódás mértéke az NDC állapot fennállásának első két évében a legnagyobb, 70-80%, a továbbiakban évente 3-4%-ban alakul ki szisztémás autoimmun betegség. A 10 éven át fennálló NDC periódus után minimálisra csökken a definitív poliszisztémás autoimmun betegség kialakulásának esélye.

A progresszió során az NDC bármelyik típusú definitív poliszisztémás autoimmun betegségbe differenciálódhat, így SLE, RA, Sjögren szindróma, MCTD, PM/DM egyaránt kialakulhat. A tünetek jellegét, a laboratóriumi és immunszerológiai eltéréseket figyelembe véve nagy valószínűséggel meg lehet mondani, milyen típusú kórkép irányába történik a kimenetel (**2. táblázat**).

Fiatal nőben más okkal nem magyarázható láz, ismétlődő serositisek, fotoszenzitivitás, vagy a vizeletben észlelt proteinuria esetén SLE-re kell gondolni. Sclerodactylia vagy nyelési panaszokat okozó nyelőcső motilitási zavar SSc-re tereli a gyanút. A Raynaud jelenség és az anti-centromer vagy anti-topoizomeráz antitestek jelenléte ugyancsak az SSc első megnyilvánulása lehet. A más okkal nem magyarázható szem- és szájszáradás első és korai jele az Ss-nek. A kéz kisízületeire lokalizálódó polyarthrititis és anti-

RNP pozitivitás esetén MCTD irányába várható progresszió, míg a polyarthritisz, a reggeli ízületi merevség, az emelkedett RF titer, vagy a sokkal érzékenyebb ciklikus citrullinált peptidek (anti-CCP) ellen termelődött autoantitestek jelenléte RA-ra hajlamosító állapotot jelez.

Klinikai jel	Laboratóriumi jel	Poliszisztémás autoimmun kórkép
Pillangó erythema Fotoszenzitivitás Discooid bőrlézió Ismétlődő serositisek	ANA, anti-DNS, anti-Sm pozitivitás Leukopénia	SLE
Artériás vagy vénás thrombosisok, ismétlődő vetélések	Anti-cardiolipin, anti-β2 GPI pozitivitás	SLE+ APS
Szem – szájszáradással járó tünetcsoport	Anti-SSA, anti-SSB, RF pozitivitás	Sjögren szindróma
Arthritis, kézduzzanat	Anti-U1RNP pozitivitás	MCTD
Sclerodermás bőrtünetek	Anti-Scl70 pozitivitás, anti-centromer pozitivitás	SSc
Izomérintettség	Myositis-specifikus antitestek (anti-Jo-1), CK, LDH emelkedés	Polymyositis

2. táblázat Definitív poliszisztémás autoimmun kórképet valószínűsítő klinikai és laboratóriumi jelek a még nem differenciált állapotban (önmagában egyik eltérés sem elegendő a definitív kórkép kimondásához, illetőleg az adott tünet vagy autoantitest hiánya nem zárja ki a betegséget)

A laboratóriumi diagnosztikában alkalmazott tisztított, recombináns humán nukleáris antigének nemcsak a különböző szisztémás autoimmun betegségek korai fázisának diagnosztikájában nyújtanak jelentős segítséget, de a betegség fenotípusának meghatározásában és a prognózis megítélésében is hasznosnak lehetnek. Jól példázza ezt az előbb említett anti-CCP antitest, amelynek kimutatása nemcsak az RA korai diagnosztizálását segíti, de jelenléte prediktív értékű az ízületi destrukcióra is.

NDC-ben az autoantitestek inkább poliszpecifikusak, poliklonálisak, míg a progresszió során, a folyamat immunológiai értelemben az autoantigénekre való specifikusabb reagálással, fokozottabbá és koncentráltabbá válva halad előre. Végeredményképpen a kórfolyamat előrehaladtával egy-egy, már a definitív szisztémás autoimmun betegségre jellegzetes marker-antitest(ek) marad(nak) meg.

Az NDC állapot követése során alapvető cél, hogy minél korábbi stádiumban ismerjük fel az induló definitív szisztémás autoimmun kórképet. Ez a gondozás során a klinikai tünetek, laboratóriumi eltérések, az autoantitestek típusának és szérumkoncentrációjának szoros követését jelenti, a kutatás szempontjából pedig azoknak a tényezőknek a felismerését, amelyek elősegítik az NDC állapot differenciálódását a definitív autoimmun betegség irányába.

A D vitamin metabolizmusa, homeosztázisa

A D vitamin esszenciális tápanyag, amelyhez az ember részben a táplálékból, részben a bőrben, a napfény hatására végbemenő szintetikus folyamatok révén jut. A „D vitamin” terminológiát a vitamin számos formájára használják. Az ember számára két forma alapvető; az egyik a D₂ vitamin (ergocalciferol), a másik a D₃ vitamin (cholecalciferol). A D₂ vitamin a növényekben szintetizálódik, míg a D₃ vitamin az emberben, a bőrben alakul ki a napfény ultraibolya B (UVB) sugárzásának hatására. Az ételek D₂ és D₃ vitamint egyaránt

tartalmazhatnak. Az emberben az elsődleges D vitamin prekursor forrás a bőr; a táplálékkal bevitt D vitamin kevés, csupán a szervezet napi D vitamin szükségletének 20%-t fedezi [23;24]. A bőrben az UVB sugárzás hatására, egy ún. fotolitikus átalakulás (azaz nem enzimatis úton) során a 7-dehidrokoleszterol a D₃ vitamin elő-vitaminjává, majd egy termális izomerizáció révén D₃ vitaminná alakul. További UVB expozíció hatására a D₃ elő-vitaminból, inaktív D vitamin alakok keletkeznek, amely folyamat mintegy protektív mechanizmusként véd a D vitamin toxicitás kialakulásától. A termális izomerizációt követően, egy kétlépéses aktivációs folyamat során, előbb a májban történő hidroxiláció révén 25-hidroxivitamin D₃ (25(OH)D), majd a továbbiakban, a vesében történő hidroxiláció révén 1,25-dihidroxivitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) forma képződik. A 25-hidroxiláció kevésbé kontrollált lépés; a 25(OH)D vitamin szint a táplálékkal bevitt D vitamin és a bőrben lévő szintézis mértékétől függően növekszik [25]. A renális hidroxilációt a táplálékkal bevitt calcium, foszfát, a keringő 1,25(OH)₂D₃ metabolitok és a parathormon (PTH) szabályozzák. Az 25(OH)D vitamint aktiváló enzim az 1- α hidroxiláz (CYP27B1-hidroxiláz), számos extra-renális szöveten is megtalálható, amelynek jelentős szerepe van a D vitamin ún. „nem klasszikus”, parakrin/autokrin módon kifejtett hatásaiban.

A keringésben a D vitamin metabolitok részben a D vitamin-kötő fehérjéhez, részben az albuminhoz kötődnek. Az előbbi transzportfehérje jellegzetes, szoros struktúrális homológiát mutat az albuminnal és az alfa-foetoproteinnel. A szérumban 25(OH)D vitamin 88%-a a specifikus transzportfehérjéhez kötődik, 0,03%-a szabad, a többi albuminhoz kapcsolódva kering [26]. Az 1,25(OH)₂D₃ vitamin kötődése hasonló: 0,04%-a szabad, 85%-a transzportfehérjéhez, a többi albuminhoz kapcsolódik {Bikle, 1985 298 /id}.

A keringésből a target sejtbe belépő aktív 1,25(OH)₂D₃ metabolit a citoplazmában D vitamin receptorhoz (VDR) kötődik, amely belép a sejtmagba és a retinoid X receptorral (RXR) heterodimerizálódik. A 1,25(OH)₂D₃-RXR-VDR komplex, az ún. D vitamin-válaszoló

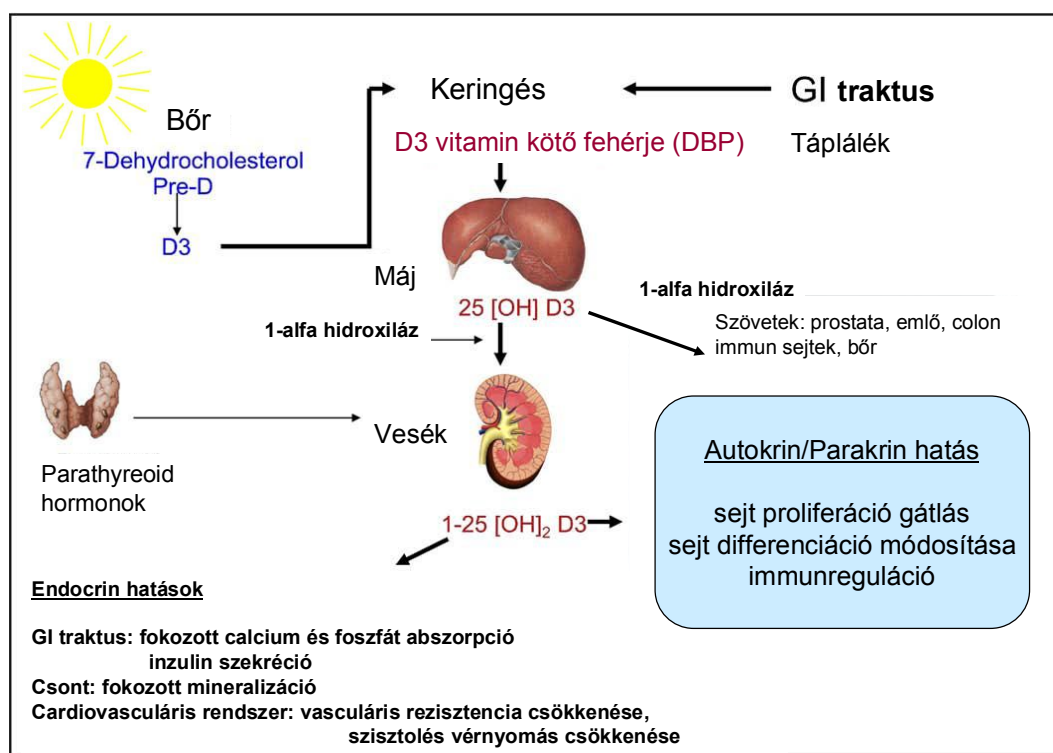
elemekhez (vitamin D response elements-VDRE) kötődik a DNS-en. A kötődést transzkripció és transzláció, majd számos fehérje megjelenése követi. A 25(OH)D és a 1,25(OH)₂D₃ vitamint a D-vitamin-24-hidroxiláz is hidrolizálhatja, amely sok szövetben, így a vesékben, porcban és az intestinumban megtalálható.

Az 1,24, 25(OH)₃D vitaminról azt tartják, hogy fő szerepe 1,25(OH)₂D₃ inaktiválása [28]. A 24, 25(OH)₂D vitamin is mutat biológiai aktivitást, fiziológiás koncentrációban a porcnövekedésben valamint a csontátépülésben játszik szerepet, de receptorát eddig még nem találták meg [29;30]. A 1,25(OH)₂D₃ vitamin fokozza a 24-hidroxiláz aktivitását, így a saját metabolizmusát szabályozza. Mindemellett a 1,25(OH)₂D₃ vitamin, számos más inaktív metabolittá képes átalakulni hidroxilációval, illetve oldallánc oxidációval, valamint hasadással, továbbá részt vesz az enterohepatikus recirkulációban [31].

A D vitamin összes ismert biológiai hatását, multiplex funkcióját, elsődlegesen az aktív D vitaminnak, nevezetesen a 1,25(OH)₂D₃-nak tulajdonítják. Az 1,25(OH)₂D₃ 1970-es évek óta ismert klasszikus funkciója a csont és ásványi anyag homeosztázis szabályozása; fokozza a kalcium és a foszfát felszívódását a belekből, valamint a pajzsmirigyre hatva gátolja a PTH szekrécióját és a mellékpajzsmirigy proliferációt [32-34]. Az 1,25(OH)₂D₃ a PTH-hoz hasonlóan az osteoblast felszínén levő VDR-hez kötődve fokozza a RANK ligand (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) és a csontmineralizációban fontos polipeptid, az osteocalcin termelődését az osteoblastokban [35]. A D vitamin hiányállapot, a csontképzés terén a ma már népbetegségnek számító osteoporosishoz vezet [36]. A hazai felmérések alapján a magyar populációban a 60 éven felüliek 34%-a D vitaminhiányban szenved [37].

Az aktív D vitamin receptort eddig több mint harminc különböző szövetben írták le, így a csont-, bél-, vese-, mellékpajzsmirigy, hematopoetikus sejtek, limfociták, monociták, dendritikus sejtek, pancreas szigetsejtek, izom- idegsejtek és tumorsejtekben is (*1. ábra*).

Mindez magyarázza, hogy a D vitaminnak nemcsak a klasszikus csontanyagcserében van funkciója, sőt biológiai hatásának döntő része lokálisan érvényesül, és többek között szerepe van a tumorsejt növekedés, a keratinocita proliferáció gátlásában. Az immun-rendszer sejtjein található VDR felismerése nyilvánvalóvá tette, hogy a D vitaminnak immunregulatív tulajdonságának is kell lennie [38]. A VDR folyamatosan expresszálódik az antigén prezentáló sejteken (APCs), mint a makrofágokon, a dendritikus sejteken (DCs), illetőleg az aktivált limfocitákon.



1.ábra Az aktív D vitamin endocrin és autokrin/parakrin hatásai. A D vitamin a májban konvertálódik 25(OH)D vitaminná, majd belépve a szisztémás keringésbe aktív, 1,25(OH)₂D₃ képződik a vesében és több más szervben.

A D vitamin immun-regulatív funkciója

Az immunrendszer modulációjában részt vevő aktív D vitamin elsősorban lokálisan képződik, mint a CYP27B1-hidroxiláz enzim szintetikus terméke, a makrofágok és limfociták

működése teremtette lokális mikro környezetben, és ennek megfelelően az aktív D vitamin lokális immunregulatív hatása a klinikai mérhető tartomány alatt van. Másrészt viszont, bizonyos granulomatosus betegségekben, mint a sarcoidosisban és a tuberculosisban észlelhető hypercalcaemia kialakulásában szerepet játszik a makrofágok fokozott $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vitamin termelése, vagyis a szérumban is mérhető hatása van [39;40]. Ellentétben a szisztémás endocrin rendszerrel, a makrofágokban jelen lévő CYP27B1-hidroxiláz enzimet, a Toll-like receptor (TLR)4 ligand, a különböző lipopoliszacharidok (LPS), a tuberculosis TLR2/1 ligandok, illetőleg a monokin interferon (IFN)- γ stimulálja. A CYP27B1-hidroxiláz enzim működése összefügg a különböző betegségekben kialakuló gyulladásos reakció fokával és befolyásolja az endogén nitrogén-oxid (NO) szintézis is.

A D vitamin hatása az innate immun rendszerre

Az innate immunrendszer sejtjei kulcsfontosságúak az immunválaszban, feladatuk a kórokozók gyors felismerése, a fagocitózis és az antimikrobiális aktivitás. Az aktív D vitamin több ponton bekapcsolódik az innate immunrendszer hálózatába, modulálja az innate immunrendszert, részben direkt antimikrobiális hatása által, részben pedig a gyulladásos aktivitás gátlásával, oly módon, hogy gátolja az adaptív immun sejtek, innate immun rendszeren keresztüli aktivációját.

Az innate immun rendszer **VDR** függő mechanizmus révén segíti elő az antigén prezentációt, a fagocitózist, a superoxid szintézist, az interleukin 1-béta és a tumor necrosis factor (TNF)- α termelődést. Az $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ emeli a savi foszfátáz szintet, és fokozza az ún. oxidatív burst-t.

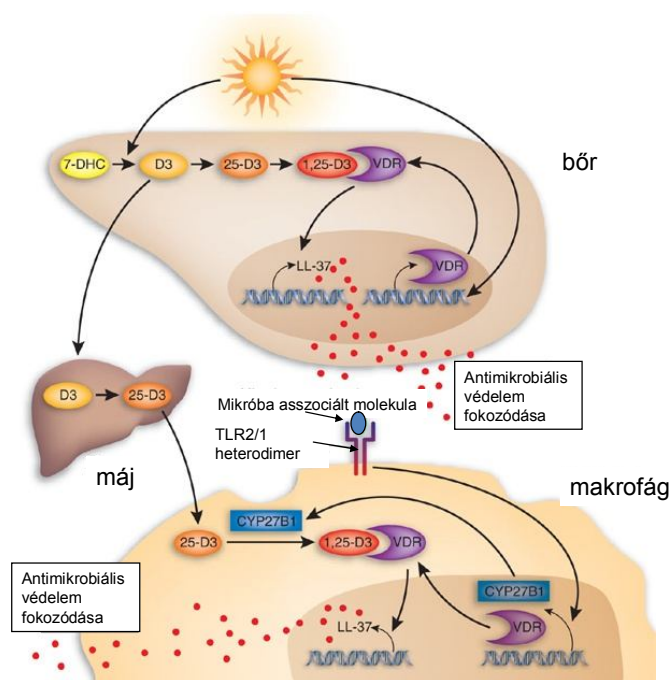
A korai gyulladásos immunválasz indukciójában igen fontosak a TLR-k azáltal, hogy felismerik a nem specifikus patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP). Napjainkig, emberben mintegy 10 típusát írták le (TLR1-10). Microarray vizsgálatokban azt

találták, hogy a bakteriális lipopoliszacharidok által stimulált humán makrofágok TLR1/2 heterodimerjei indukálják mind a CYP27B1 gén, mind a VDR expresszióját [41]. A TLR aktiválta makrofágok ezáltal az inaktív formájú D vitamint aktív formává alakítják, majd az aktív D vitamin hatására, autokrin mechanizmussal további antimikrobiális peptideket termelnek.

In vitro vizsgálatokban, a humán monociták VDR liganddal való kezelése gátolta a TLR2, más adatok szerint a TLR4-nek is az expresszióját, miközben idő és dózis dependens módon fokozta, a fő monocyta antigén és endotoxin receptor CD14 sejtfelszíni expresszióját [42-44]. A VDR ligand hatására a monocitákon végbemenő TLR expresszió csökkenés következményesen pro-inflammatórikus TNF- α citokin csökkent termelődéséhez is vezet. Az aktív D vitamin szerteágazó és finom működését példázza az is, hogy *in vitro és in vivo* vizsgálatokban fokozta a regulatív T sejtek interleukin (IL)-10 termelését és a TLR9 expresszióját [45].

A D vitamin elősegíti az antimikrobiális peptidek, mint a cathelicidin, kationos peptidek, defenzinek szintézisét, amelyek mint endogén antibiotikumok vannak jelen a szervezetben, és direkt antimikrobiális hatással bírnak, különösen a mukózális immun rendszerben. Az antimikrobiális peptidek két családjának, a CAMP (cathelicidin antimicrobial peptid, hCAP18, LL37) és DEFB2 (DEFB4, β -defensin 2) peptidek csoportjának DNS-e, a promoter régió proximális szakaszán természetes DR3-típusú "response" elemeket (VDREs) tartalmaz [46]. Dimeloe és munkatársai alacsonyabb D vitamin szinteket mértek a szeptikus betegekben az egészségesekhez képest. Ezekben a betegekben a plazma 25(OH)D vitamin szint korrelált egy, a szérumban található aktív kationos fehérje, a LL-37 szintjével, amely által arra következtettek, hogy a szisztémás LL-37 szintet befolyásolhatja a szervezet D vitamin statusa (**2.ábra**). A LL-37 a humán cathelicidinek családjába tartozó kationos peptid,

amelyet elsősorban a fagociták és az epitheliális sejtek expresszálnak. Az emlősök természetes immunvédekezésének aktív komponensei, endogén antibiotikumként viselkednek. Hatása a sajátos alfa-helikális szerkezetéből adódik, melynek révén erősen kötődik a bakterális lipid kettős membránhoz, és végeredményképpen a kórokozó lipid membránjának a destrukcióját okozza. A mikróbákban lévő TLR2/1 agonisták aktiválják a keringő monocitákat, amely végső soron a VDR és CYP27B1 enzim indukciójához vezet. A CYP27B1 enzim a 25(OH)D vitamint 1,25(OH)₂D₃ -á konvertálja, amely kapcsolódik a VDR-hez és aktiválja az LL-37 génjét. A folyamat a celluláris LL-37 emelkedéséhez és a fagocita antimikrobiális aktivitásának fokozódásához vezet [25].



2.ábra A D vitamin szerepe az infekciók elleni küzdelemben. A napfény hatására indukált D vitamin és VDR elősegíti az LL-37 antimikrobiális peptid szintézisét.

In vitro, a humán monocitákban és neutrofilekben, a D vitamin analóg terápiával indukált cathelicidin megjelenése fokozta az antimikrobiális aktivitást több légúti pathogénnel

szemben [46-48]. *In vitro*, humán daganatos sejtvonalakon, az innate immunrendszer fontos regulátorainak tekintett, calprotectin és az S100-fehérje szintje megemelkedik D vitamin hatására [49].

A D vitamin hiánnyal összefüggésben fellépő, fertőző betegségekre való fogékonyságot támasztják alá a VDR gén polimorfizmust elemző genetikai vizsgálatok is [50]. Ezekben a tanulmányokban összefüggést találtak a VDR gén polimorfizmus és számos infektív betegség, mint a *Mycobacterium tuberculosis* és *M. leprae* között, különösképpen ezen fertőzések iránti fogékonyság, valamint a betegségek kimenetele tekintetében.

További klinikai megfigyelés, hogy a kaukázusi populációhoz képest, az afrikai populáció fogékonyabb a tuberculosis virulensebb formáira. Az afro-amerikaiknak alacsonyabb a plazma 25(OH)D vitamin szintje, mert a bőrben a magasabb melanin szint mellett kisebb mértékű a napfény hatására a D vitamin szintézis.

Az adaptív immunitás modulációja

A D vitamin hatása a monocitákra és dendritikus sejtekre

Az antigén prezentáló sejtek (APCs), mint a monociták/makrofágok és a dendritikus sejtek (DCs) az adaptív immunrendszer fontos részei. A DC sejtek, professzionális antigén prezentáló sejtek, amelyeknek esszenciális szerepe van a T sejt függő immun válasz beindításában és fenntartásában. Az aktív D vitamin részben direkt módon, részben a citokin miliő komplex befolyásolása révén hat a DC sejtekre [51]. A DC sejtek differenciálódását a CD14 monocita marker downregulációja és a CD1 felszíni molekula megjelenése jellemzi. Az $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, VDR függő folyamat révén hatékonyan gátolja a sejtfelszíni markerek megjelenését, ezáltal a DC sejtek érését és monocitává történő differenciálódását [52;53] (**3. táblázat**). Az aktív D vitamin hatására ugyanis gátolt a CD1a⁺ DC sejtek differenciációja, miközben fennmarad a monocita markerek expressziója [52;54]. Itt kell megjegyezni azt is,

hogy az aktivált makrofágok és DC sejtek hordozzák az aktív D vitamin szintézis végső, 1- α -hidroxilációs lépését végző hidroxilázt, így módon 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -t tudnak szintetizálni és szekretálni.

Az 1,25(OH) $_2$ D $_3$ fiziológiás mértékű jelenléte gátolja a II. osztályba tartozó fő hisztokompatibilitási komplex (MHC-II), a kostimulációs receptorok (CD40, CD80 és CD86) és más sejtfelszíni érést jelző és elősegítő markerek (mint a CD83) megjelenését. Az aktív D vitamin, befolyásolja az antigén prezentáló sejtek másodlagos szignáljait, amelyek a T sejtek toborzásához és aktivációjához szükségesek [55;56]. Az aktív D vitamin gátolja a T helper (h) 1 és Th17 irányú differenciálódás fő citokinjeit, a proinflammatorikus IL-1 és IL-23 citokinek, valamint az IL-12 és IFN- γ képződését is, és fokozza az immunszuppressziós hatású citokinek, az IL-10 és a kemokin MIP-3 α termelődését. Ez utóbbi kemokin, amelyet CCL22-nek is neveznek, igen fontos a CCR4-expresszáló regulatív T sejtek (Tregs) toborzásában [52;53;57;58]. Az 1,25(OH) $_2$ D $_3$ vitamin, a szuppresszív jellegű prosztaglandin E $_2$ termelődését stimulálja, a granulocita-makrofág colonia stimuláló faktort (GM-CSF) gátolja, míg a szintén inflammatorikus hatású TNF- α citokin megjelenését, a monociták és makrofágok érési statusától és differenciációjától függően módosítja [59].

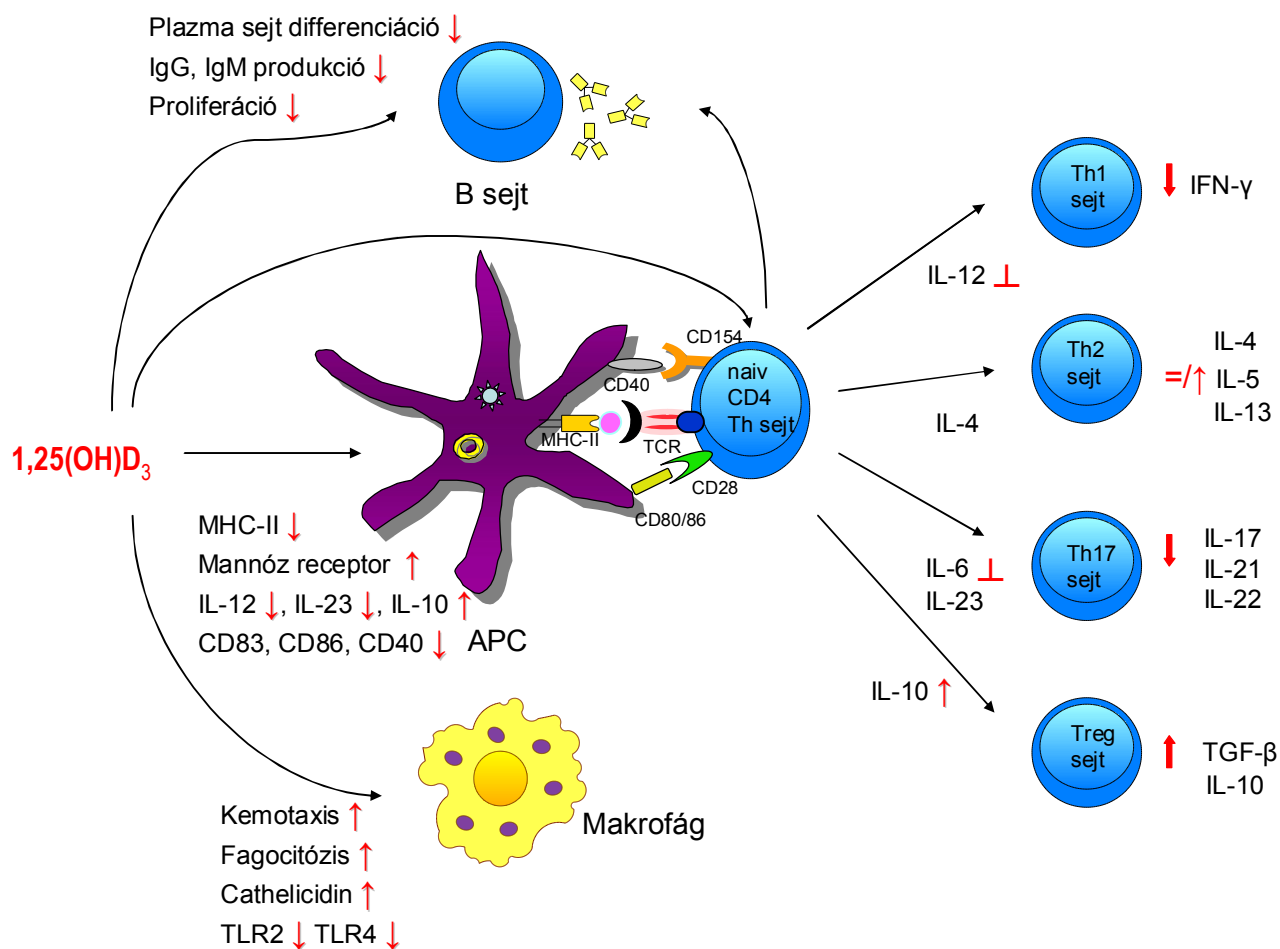
Az aktív D vitamin komplex szerepét jelzi, hogy az előbb említett hatásokkal szemben, a monociták és makrofágok kemotaktikus és fagocitáló képességét fokozza, amely alapvető az antimikrobiális aktivitásban és a tumorsejtek elleni citotoxicitásban [60].

Target sejtek	1,25(OH) ₂ D ₃ hatásai	Irodalom
Antigén prezentáló sejtek (monociták, macrofágok, dendritikus sejtek)	A dendritikus sejtek érésének gátlása	Koren 1986; Muller, 1992; Griffin 2000, Penna, 2000, 2005, 2007; van Halteren, 2002; [52;53;59;61-64]
	Az MHC II. molekulák expressziójának csökkenése	Penna 2000, 2005; Berer 2000; Canning, 2001 van Halteren 2002, [52-54;63;65]
	A kostimulációs receptorok (CD40, CD80 és CD86), érést elősegítő és jelző sejtfelszíni molekulák (CD1a, CD83) expressziójának csökkenése	van Halteren 2002; Xu 1993; Verstuyf 2010 [53;60;66]
	A monociták kemotaktikus és fagocita aktivitásának fokozódása, a monociták tumor sejt elleni citotoxikus és mikrobiális aktivitásának a növelése	Xu 1993; Tokunda 1996; Spittler 1997 [60;67;68]
	A tolerogén DC sejtek indukciója, amelyek elősegítik a regulatív T sejtek kialakulását és működését	Gregori 2001; Barrat 2002; Adorini 2003 [69-71]
	A DC sejtek IL-12 p70 termelésének gátlása	Zugel 2002; Verstuyf 2010 [66;72]
	A monociták és makrofágok proinflammatorikus citokin (l. IL-1 α , IL-1 β , TNF- α) termelésének gátlása	Koren 1985; Muller 1992; [62;73]
T limfociták	Az IL-12, IFN- γ és IL-2 felszabadulásának gátlása	D'Ambrosio 2005 [74]
	IL-4, IL-5, IL-10 termelésének fokozódása	Adorini 2003 [69]
	A humán és rágcsáló T limfociták antigén és lectin stimulált proliferációjának, citokin szekréciójának gátlása	Miyakoshi 1981 [75]
	Gátolja a Th17 sejtek megjelenését és funkcióját	Nakae 2003; Daniel 2008 [76;77]
	A regulatív T sejt irányába történő differenciálódás elősegítése	Penna 2000, 2005; Gregori 2001 [52;63;70]
	Az antigen specifikus T sejt aktiváció gátlása	Bhalla 1984, Provvedini 1983 [78;79]
B sejtek	Gátolja a plazma sejté történő differenciálódást, a memória B sejtek kialakulását. Az immunglobulin szekréció gátlása B sejtek VDR expressziójának gátlása Az IgE szekréció szuppressziója	Heine 2002, 2008 [80;81]
NK sejtek	IFN- γ downregulációja	Leug 1989 [82]

3. táblázat A D vitamin hatása az innate és az adaptív immunrendszer sejteire

A limfociták mint a 1,25(OH)₂D₃ direkt targetjei

Az innate immunitásra gyakorolt hatásán túl, az aktív D vitamin a T sejt immunválasz fiziológiás karmestere, több ponton is módosítja a T sejtek differenciálódását, effektor és regulatív funkcióját (3. ábra).



3. ábra A D vitamin, az innate és adaptív immunsejtek: molekuláris interakciók – az immunrendszer modulációja. Az aktív D vitamin gátolja a Th1 és Th17 irányú differenciálódáshoz szükséges IL-6, IL-12, valamint IL-23 citokineket, a Th1 és a Th17 sejtek proinflammatorikus citokin termelését és elősegíti az immunszuppresszív hatású IL-10 citokin megjelenését, valamint a Treg sejtek működését.

A DC sejtek által termelt citokinek modulációja, és az inflammatorikus Th1 és Th17 válasz gátlásával a T sejt választ a Th2 irányába tolja el.

A D vitamin a Th sejtek differenciálódásának és citokin szintézisének transzkripció regulátora (pl. T-bet) [76]. A T sejtek magjában D vitamin receptorok találhatóak, amelyek a VDR ligand bekötődésekor, a megfelelő gének expresszióját elindítják, vagy leállítják [83]. Ennek eredményeképpen a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a **Th1** sejtek érését gátolja, a Th1 irányú differenciálódást elősegítő citokinek képződését (IL-12) és a Th1-re jellemző citokinek termelődését (IFN- γ , IL-2) megakadályozza [84]. Az IFN- γ fontos feedback szignál az APCs számára. Az IFN- γ transzkripciójának gátlása, termelődésének csökkenése az APC sejtek antigén prezentáló képességét akadályozza, míg az IL-12 transzkripciójára gyakorolt represszív képességével a Th1 polarizáció elmaradását vagy csökkenését okozza. A D vitamin direkt hatása és/vagy a Th1 negatív gátlásának kiesése következtében egy relatív Th2 arány eltolódás jön létre. Ez utóbbi hatást erősíti az is, hogy a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ elősegíti az IL-5 és IL-10 termelődését.

Az újonnan megismert **Th17** sejtek tekintetében a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gátló hatású, gátolja a Th17 sejtek differenciálódását és azok funkcióját [76;77]. A Th17 sejtek, a T helper típusú sejtek egy speciális subpopulációját képviselik, különböznek a Th1 és Th2 sejtektől és jellegzetesen, pleiotrop hatású IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α citokineket termelnek. A Th17 sejtek igen fontosak az epithelium és a mucosalis barrierek antimikrobiális immunitásában. A Th17 sejtek hiánya a szervezet opportunistá kórokozókkal szembeni fogékonyságához vezethet. A szabályozó mechanizmus zavara fokozott IL-17 termelést okoz, másrésről viszont, az excesszív számú Th17 sejtek fontos szerepet játszanak a gyulladás és a gyulladás mediálta szöveti károsodás fenntartásában [85-87]. A humán sejtekben, az IL-6, IL-21, IL-23 és TGF- β együttes jelenléte segíti elő a naiv Th sejtek Th17 effektor sejtek irányába történő differenciálódását [88-90]. Az IL-6 csökkenti a TGF- β indukálta Foxp3 expressziót és a Treg

sejtek kialakulását, ugyanakkor az IL-6 és a TGF- β együttesen illetve ezek megfelelő aránya elősegíti a Th17 sejtek képződését. Mindez azt jelenti, hogy effektor és a regulatórikus T sejtek ugyanabból a prekursor sejtéből alakulnak ki, megjelenésük a citokin miliótól függ, másrészt pedig a lokális citokinek által vezéreltetve, egyebek mellett a TGF- β / IL-6 arány változására-, az effektor Th17 sejtek, Foxp3+ **regulatórikus**, aktív, szuppresszor **T sejtekké** (Tregs) tudnak konvertálódni [88;89;91;92]. *In vitro*, D vitamin analóg hatására az IL-6 citokinek downregulációja és a Th17 sejtek számának csökkenése figyelhető meg. Kísérletesen kiváltott colitisben a calcitriol a bél mucosában csökkentette a Th17 sejtek által termelt IL-17 citokinek mennyiségét, fokozta Th2 típusú helper sejtek számát, és növelte a regulatórikus T sejtek aktivitását [76].

Az 1,25(OH) $_2$ D $_3$ adaptív immun választ szabályozó hatásában igen fontos a regulatív T sejt választ befolyásoló képessége. A Foxp3+ regulatórikus T sejteknek alapvető regulatív-szuppresszív funkciójuk van, kulcsszerepet játszanak az immunrendszer homeosztázisának, valamint a saját antigénekkal szembeni toleranciának a fenntartásában. A természetes regulatív T sejtek fejlődésében és működésében Foxp3 (forkhead box) transzkripciós faktor molekula lényegi szerepet tölt be, hiányában több szervet érintő végzetes autoimmun megbetegedés, az ún. IPEX (immundiszreguláció, poliendocrinopathia, enteropathia, X-hez kötött szindróma) alakulhat ki. A Foxp3+ Treg sejtek és Th17 sejtek között igen kényes egyensúly áll fenn, és összjátékuk alapvető az immunválasz kimenetelének meghatározása szempontjából. Az *in vivo* vizsgálatok arra utalnak, hogy az aktív D vitamin jelenléte elősegíti a Treg sejt irányú differenciálódást, és a Treg sejteknek szuppresszor hatása van a Th17 sejtpopulációra. [63;70].

Az 1,25(OH) $_2$ D $_3$ pontos szerepe a **Th2** sejtek vonatkozásában teljességében nem ismert. Egyes megfigyelések szerint *in vivo* a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ terápia fokozza a Th2 sejtek IL-4

citokin termelését, míg más adatok azt mutatják, hogy gátolja a Th2 sejtek IL-4 citokin szekrécióját [93;94].

A humorális immun válasz tekintetében kimutatták, hogy az aktív D vitamin direkt és indirekt módon is befolyásolja az immunglobulin produkciót. Az $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gátolja a B sejtek proliferációját a plazma sejtekké történő differenciálódást, ezáltal az immunglobulin (IgG és IgM) szekréciót, valamint gátolja a memória B sejtek kialakulását, és B sejt apoptózist is indukál [95]. Lemire és munkatársai *in vitro* vizsgálatban igazolták, hogy a normál humán perifériás mononukleáris sejtek gátolják a B sejtek Ig termelését az aktív D vitamin hatására [96]. Hasonlóan *in vitro* vizsgálatban azt találták, hogy a D vitamin adása mellett az SLE-s betegekből származó perifériás mononukleáris sejtek is csökkentik mind a poliklonális antitest termelést, mind pedig az anti-dsDNS autoantitestek termelődését [97].

Összességében, az előbbieken említett folyamatok azt igazolják, hogy a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ befolyásolhatja az autoimmun betegségek, mint a szisztémás lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), a TyP1DM és a sclerosis multiplex (SM) kialakulását.

Mennyi az optimális D vitamin szint a szervezetben?

Mínt hogy a keringő $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ szorosan regulált és féléletideje rövid (4-6 óra), emiatt a szervezet D vitamin statusának legjobb indikátora a plazma $25(\text{OH})\text{D}$ vitamin szint (féléletidő: 2-3 hét). A klinikai vizsgálatok többsége szerint az optimális plazma $25(\text{OH})\text{D}$ vitamin érték 40-70 ng/ml (100-175 nmol/l) között van. Alacsony D vitamin szintnek, illetve D vitamin elégtelenségnek tekintik, ha a cirkuláló $25(\text{OH})\text{D}$ vitamin koncentráció kisebb mint 40 ng/ml és nagyobb, mint 30-32 ng/ml (75-80 nM) [98-100]. D vitamin hiányról pedig akkor beszélünk, amikor a plazma $25(\text{OH})\text{D}$ vitamin szint kisebb, mint 30 ng/ml [35;100-104]. Irodalmi adatok alapján elkülöníthető még egy úgynevezett kritikusan alacsony $25(\text{OH})\text{D}$ vitamin szint is, amikor 5 ng/ml alatt van a plazma $25(\text{OH})\text{D}$ mennyisége. A D

vitamin szint felső határa 100-125 ng/ml fölött van, ennél magasabb koncentráció mellett már fennállhat a D vitamin intoxikáció veszélye [105]. A D vitamin szint változásait szorosan követi a kalcium homeosztázis változása. Az intestinális kalcium transzport 45%-ról 65%-ra nő akkor, ha a plazma D vitamin szint a 20 ng/ml-ről 32 ng/ml-re emelkedik [106].

A D vitamin készítményeket nemzetközi egységben (IU) vagy µg-ban adják meg, 1000 IU D vitamin 0,25 µg aktivált D vitaminnak felel meg, bár a D vitamin analógokat illetően nincs jól használható equivalencia táblázat. Egészséges személyekben a D vitamin igény 51-70 év között 400 IU, 71 év felett 600 IU, míg gyerekekben és fiatal felnőttekben 200 IU (**4.táblázat**).

Jelenleg nincsenek pontos adatok arról, hogy mennyi az a D vitamin dózis amivel kedvezően lehet befolyásolni az autoimmun kórképek kialakulását és a meglévő betegség aktivitását.

Életkor	Gyerekek (µg/nap)	Férfiak (µg/nap)	Nők (µg/nap)
Születéstől-13 évig	5 (200 IU)		
14-18 évig		5 (200 IU)	5 (200 IU)
19-50 évig		5 (200 IU)	5 (200 IU)
51-70 évig		10 (400 IU)	10 (400 IU)
71 éves kor felett		15 (600 IU)	15 (600 IU)

4.táblázat. *1,25(OH)₂D₃ igény változása az élet folyamán, fiziológiás körülmények között (diétás ill. exogén 1,25(OH)₂D₃ beviteli igény az optimális plazma 25(OH)D vitamin koncentráció fenntartására)*

Az alacsony D vitamin szint és az autoimmun betegségek

A D vitamin esszenciális szerepet tölt be a csont és az ásványi anyagcsere homeosztázisban. 1651-ben Glisson ismerte fel, hogy az angolkórt a D vitamin hiány okozza.

Meglepő módon azonban a napfényhiány és az angolkór közötti összefüggést csak a 20.-dik század elején bizonyították [107]. Később igazolták azt is, hogy a D vitamin az endocrin működésben, a tumorgenezisben, a bőr keratinocyta proliferációjában és az immunrendszer szabályozásában is alapvető regulatív funkciót tölt be [108].

Kísérletes és klinikai tanulmányok erősítették meg, hogy a szervezet D vitamin statusa befolyásolja a daganatos, az infektív és a kardiovasculáris megbetegedések kialakulását [109-111], és a D vitamin egyike azoknak a környezeti tényezőknek, amelynek hiánya hatással van az autoimmun betegségek előfordulására.

A D vitamin jelentőségére utal az a régi megfigyelés, hogy a különböző autoimmun betegségek gyakorisága jellegzetes észak-déli megoszlást mutat [69;112;113]. Egyértelmű összefüggést találtak az TyP1DM, SM, RA, SLE, és a gyulladásos bélbetegségek (IBD) prevalenciája valamint az észak-déli földrajzi szélességi fok, napfény expozíció, illetőleg a D vitamin szintek között. A SM, TyP1DM és az RA gyakoribb a mérsékelt égöv magasabb szélességi fokain, mint az egyenlítő mentén. A SM és IBD előfordulása nagyobb Kanadában és az USA északi részein, valamint Európában. Az SM incidenciája az egyenlítő mentén 1-2 eset/ 10^5 lakos, míg az 50. szélességi fokon több mint 200 eset/ 10^5 lakos az előfordulási arány. Mindemellett az SM megjelenése és súlyossága szezonális jelleget mutat az évszakoknak megfelelően. A nagyobb D vitamin bevitel mellett, a napfényes órák számától függetlenül csökken az TyP1DM, RA és az SM kialakulásának valószínűsége.

D vitaminhiány az egyes autoimmun betegségekben

Autoimmun betegségekben, a szervezet D vitamin statusát több tényező befolyásolja, ezek részben általános tényezők, részben az alapbetegségből adódóak.

Az általános tényezők tekintében elsőrendű a napfény expozíció. Az 35°-dik szélességi fok felett az októbertől márciusig tartó időszakban nagyon kevés D vitamin képződik a bőrben. Az SLE-s betegeknek a fényhatásra provokálódó bőrtünetek miatt nem javasolt a napozás, amely így komoly rizikófaktort jelent a D vitaminhiány kialakulására.

További rizikófaktorok a rassz, az etnikum és a földrajzi lokalizáció. Ismert, hogy a kaukázusi rasszban nagyobb az SM kialakulásának veszélye. Az USA-ban az SLE incidenciája háromszoros az afro-amerikaiakban, mint a kaukázusi populációban, és fiatalabb életkorban kezdődik a betegség [114]. A mérsékelt égövi országokban, a szérumban D vitamin szint az évszakok változásának megfelelően, illetve a napfény expozícióval párhuzamosan emelkedik és csökken, mintegy két hónapos látenciával [115-117]. Az alacsony D vitamin szint gyakoribb az észak-amerikai és az észak-európai államok lakosaiban, mint a dél-amerikai vagy dél-európaiakéban [9]. Az RA prevalenciája északról dél felé haladva csökken; amíg Finnországban 0,8%, addig Olaszországban 0,3% az előfordulása [118;119]. Az immunmediált diabetes (TyP1DM) incidenciája is magasabb az északi népességben, mint a déli lakosokban, ami felveti, hogy az $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vitaminhiánynak szerepe lehet a TyP1DM diabetes kialakulásában.

A D vitamin szintézis mértékét emellett befolyásolja a bőr pigmentáltsága, a napfényvédők használata, az életstílus, valamint a ruházat [105;120]. A nem és a D vitamin szupplementáció szintén meghatározói a szervezetben mérhető D vitamin szintnek. Az életkor fontos tényező a bőrben végbemenő D vitamin konverzió tekintetében. A 20 éves korral szemben 70 év felett a D vitamin mindössze $\frac{1}{4}$ -e konvertálódik previtaminná a bőrben [109].

Wright és mtsai azt találták SLE-s betegekben, hogy a D vitaminhiány jelenléte összefüggést mutat a túlsúlyossággal. A kapcsolatot azzal magyarázták, hogy a D vitamin zsírszórban oldódó vitamin, és a túlsúlyos egyénekben csökkent lehet a biohasznosulása [121].

SSc-ben további potenciális faktoroknak lehet hatása szervezet D vitamin statusára, például, a dermális fibrotikus réteg megvastagodása gátolhatja D₃ vitamin elő-vitaminjának szintézisét, illetőleg a betegség gastrointestinális involvációja és a malabszorpció befolyásolhatja a D vitamin felszívódását.

Még nem bizonyított egyértelműen, hogy a megváltozott D vitamin metabolizmus összefügg-e az autoimmun betegségek immunpatológiai folyamataival, vagy csupán epifenomén.

Az autoimmun betegségekben a gyulladásos állapot okozta fokozott mértékű kalcium érzékelő receptor szintézis, relatív hypoparathyreosist eredményez. Wright és munkatársai megfigyelték, hogy az intact PTH szint szignifikánsan alacsonyabb azokban az SLE-s betegekben, akikben a 25(OH)D vitamin szint is alacsonyabb [121].

Carvalho és mtsai az autoimmun betegségekben előforduló D vitaminhiány egyik oki tényezőjének vélték a D vitamin ellen termelődött antitestek jelenlétét [122]. Eredményeik azonban nem voltak meggyőzőek, a vizsgált SLE-s betegekben anti-D vitamin antitesteket 171 betegből mindössze 7 esetben tudtak kimutatni. Ebben a tanulmányban az anti-D vitamin antitestek, valamint a plazma 25(OH)D vitamin szintek, a demografiai jellegzetességek, a szervi érintettség, az SLE-aktivitási score (DAI), az egyéb antitestek jelenléte között nem találtak szignifikáns összefüggést, kivéve az anti-dsDNS antitestek esetén, amely az anti-D vitamin antitest előfordulásával szoros összefüggést mutatott.

Elméletileg, D vitamin hiány klinikai tüneteit eredményezheti a D vitamin receptor polimorfizmusa is. A VDR polimorfizmusainak következménye teljes részleteiben nem ismert, az egyes allélek frekvenciája és bizonyos betegségek közötti kapcsolatra vonatkozóan vannak adatok. Feltételezett, hogy a gén a DNS bizonyos egyéb szakaszaival van linkage disequilibriumban (azaz a kérdéses génlokusszal nem véletlenszerű kapcsolatban), amely által

szerepe lehet a mRNS biológiai féléletidejének meghatározásában, illetve más funkcionális génváltozat markere lehet. A *BsmI* génpolimorfizmus esetén a BB genotípust a szervezet csökkent ásványi-anyag tartalmával hozták összefüggésbe, míg a *FokI* gén esetén az F génvariáció rövidebb és transzkripcionálisan aktívabb D vitamin receptort eredményez.

SLE-ben és RA-ben vizsgálták a VDR gén polimorfizmus, a D vitamin elégtelenség és a betegség előfordulása, a klinikai tünetek közötti összefüggés lehetőségét. SLE-ben a VDR gén *BsmI* polimorfizmusát vizsgálva változatos eredményeket kaptak. Japán és kínai SLE-s betegekben összefüggést írtak le a BB genotípus és a betegség jelenléte között. 58 japán SLE-s betegben ez a genotípus gyakrabban fordult elő a lupus nephritises betegek körében [123]. Egy másik, Tajvanban élő, 47 kínai SLE-s beteget vizsgáló tanulmányban gyakoribb volt az SLE-s betegekben a VDR BB genotípus és a B allél gyakorisága, de nem volt összefüggés a VDR allélikus variáció, valamint az SLE klinikai manifesztációi, laboratóriumi eltérései és a lupus nephritis között [124]. Egy hasonló, de 101 tajvani SLE-s beteget elemző vizsgálat már nem erősítette meg az előbbi eredményeket [125]. Iráni SLE-s betegek között szintén nem volt összefüggés a VDR gén *BsmI* polimorfizmus és az SLE előfordulása, a betegség aktivitási indexe (SLE- DAI) és az SLE fő szervi érintettségei között [126].

RA-ban négy VDR gén polimorfizmust, a *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, és a *TaqI* géneket elemezték. A *FokI* polymorphism nagyobb gyakorisággal fordult elő az RA-s populációban a kontrollhoz képest, [127], ugyanakkor a VDR allél frekvencia megoszlás hasonló volt a betegek és a kontroll személyek között egy másik vizsgálatban [128]. A klinikai tünetek tekintetében a *BsmI* and *TaqI* polimorfizmusok által meghatározott BB/tt genotípus gyenge összefüggést mutatott a korai kezdetű RA-val a női betegekben. A *BsmI* polimorfizmus BB genotípusa összefüggést mutatott a klinikailag súlyosabb tünetekkel járó RA-val [129], az akkcelerált csontvesztéssel és a magas RF titerrel [130].

Poliszisztémás autoimmun kórképekben az alapbetegség miatt alkalmazott gyógyszerek prediktív faktorai lehetnek az alacsony D vitamin szintnek. Az antimaláriás szerekben megtalálható hidroxichloroquin a 25(OH)D vitamin 1- α hidroxilációját gátolja, és ezáltal csökkenti a 1,25(OH)₂D₃ szintet. A kortikoszteroidok direkt és indirekt hatás révén okoznak alacsony D vitamin szintet. A tartós kortikoszteroid kezelés károsítja a 25-hidroxilációt, amely megváltoztathatja a D vitamin metabolizmust [131]. Experimentálisan igazolták, hogy a kortikoszteroid kezelés során dózistól függően több, olyan poláros, biológiailag aktív metabolit képződik, amely direkt módon csökkenti az intestinális mucosan keresztül a kalcium felszívódást, kalcium malabszorpciót okozva [132]. Szintetikus 1,25(OH)₂D₃ fiziológiás vagy közel fiziológiás dózisban való adagolása nagy dózisú kortikoszteroid terápiában részesülő betegekben a kalcium abszorpció emelkedéséhez vezetett minden betegben. A poliszisztémás autoimmun betegségekben gyakran kialakuló csont denzitás és izomerősség csökkenésnek maga a D vitamin hiány is indirekt okozója azáltal, hogy szekunder hyperparathyreosist provokál. Több vizsgálat igazolta, hogy a D vitamin szupplementáció javítja az izomerőt és csökkenti az elesések számát [133]. A D vitamin pótlás fontos az SLE súlyos komplikációinak, a kognitív dysfunkció, metabolikus szindróma és infekció megelőzésében is [134;135].

CÉLKITŰZÉSEK:

A definitív szisztémás autoimmun betegségek előfázisát jelentő nem differenciált collagenosis stádiuma különös jelentőséggel bír az autoimmun betegségek pathomechanizmusának megismerésében, a poliszisztémás autoimmun kórkép irányába történő differenciálódás és a progressziót kiváltó faktorok tanulmányozása szempontjából.

1. Munkánk során vizsgáltuk, az NDC stádiumban levő betegek D vitamin ellátottságát; kíváncsiak voltunk arra, hogy gyakoribb-e, illetve milyen mértékű a D vitamin hiány NDC-ben a kontroll, egészséges populációhoz képest, valamint észlelhető-e szezonális változás a nyári és téli periódusban?
2. Összefüggést kerestünk az alacsony D vitamin szint, valamint az NDC-s betegek tüneteinek alakulása és a betegek immun-szerológiai eltérései között.
3. Analizáltuk a mért D vitamin szintek lehetséges összefüggését a betegség kórlefolyásával.
4. Vizsgáltuk az NDC-s betegek perifériás vérében a Th17 és a CD4+CD25+Foxp3+ természetes regulatív (nTreg) sejtek arányát, az nTreg sejtek funkcionális aktivitását, valamint azt, hogy a D vitamin kezelés miként befolyásolja a Th17 és az nTreg sejtek számát és százalékos megoszlását.
5. Kerestük a választ arra, hogy egy 5 héten át tartó 0,5 µg/nap dózisban alkalmazott D vitamin analóg, az alfacalcidol kezelést követően észlelhető-e változás a D vitamin szintben, és a kezelés módosítja-e a természetes Treg sejtek számát és funkcióját, valamint az IL-17 termelést.

6. Elemeztük, hogy a proinflammatorikus Th1 citokinek (IL-12, IFN- γ), a Th17 citokinek (IL-17, IL-23 és IL-6) és a kulcs regulátor szereppel bíró IL-10 citokin szérumban koncentrációja hogyan változik az előbbi D vitamin kezelés hatására.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegek

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DEOEC) III. sz. Belgyógyászati Klinika „Új betegeket fogadó” autoimmun szakrendelésén 2002 és 2006 között kezelt és gondozott 161 randomszerűen kiválasztott NDC-s beteget vizsgáltuk tanulmányunk első részében. Ezt követően, vizsgálatunk második részében, ebből a betegcsoportból 25 D vitamin elégtelenségben (plazma D vitamin szint <30 ng/ml) szenvedő NDC-s nő részesült D vitamin analóg, alfacalcidol terápiában, napi $0,5\text{ }\mu\text{g}$ dózisban, 5 héten át. A vizsgálatba bevont betegek egyike sem kapott immun-moduláló terápiát, kortikoszteroid kezelést.

Az NDC-t a következő, a korábban leírt kritériumtünetek alapján diagnosztizáltuk: (a) a betegeknek szisztémás autoimmun betegségre jellemző klinikai tünetei és autoantitestjei vannak, ugyanakkor a meglevő eltérések nem elegendőek ahhoz, hogy valamely definitív poliszisztémás autoimmun betegség diagnózisa felállítható legyen; (b) a betegség kezdete illetve időtartama legalább egy év; és (c) legalább egy nem szervspecifikus autoantitest kimutatása a betegek szérumában [6;16;20]. Minden beteg a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága által jóváhagyott beleegyező nyilatkozatot aláírta. A klinikai adatokat, - mint az életkor, betegség fennállási ideje, terápia - a kórlapok, kérdőívek illetve az intézet elektronikus adatbázisa segítségével tekintettük át.

Kontrollként, vizsgálatunk első részében, 58 korban és nemben illesztett, autoimmun vagy daganatos betegségben nem szenvedő beteg (átlag életkor $43,9 \pm 15,01$ év) mintáiból végeztünk meghatározást. Vizsgálatunk második részében, 21 egészséges nő (átlag életkor $55,3 \pm 7,9$ év) mintáit alkalmaztuk az összehasonlításhoz.

A 161 NDC-s betegben és az 58 egészséges kontrollban a plazma 25-hidroxi-D vitamin 25(OH)D szintet a nyári (júniustól októberig) és a téli (januártól májusig) időszakban mértük,

míg az alfacalcidol kezelés során a szérum illetve plazma mintákat az év azonos, júliustól szeptemberig tartó periódusában gyűjtöttünk a betegektől és a kontroll személyektől. A vizsgálatba bevont betegek és kontrollok mindegyikénél ellenőriztük a kalcium homeosztázisában szerepet játszó faktorokat (parathormon, szérum kalcium), amelyek kóros eltérést nem mutattak. A betegek egyike sem szenvedett osteoporosisban, vesebetegségben, illetőleg a vizsgálatot megelőzően a betegek D vitamin kezelésben nem részesültek.

Az NDC-s betegeknél a csontdenzitometria vizsgálat Lunar-DPX DEXA készülék segítségével (Lunar Radiation Corporation, Madison, WI, USA) folyt. A csontdenzitás (BMD) meghatározása az ágyéki 2-es és 4 csigolyák között illetve a combcsontnyakon végzett méréssel történt, T score alkalmazásával. Osteoporosist vagy osteopeniát a Világ Egészségügyi Szervezet (World Health Organization-WHO) klasszifikációs kritériumai alapján véleményeztünk (T score kisebb mint -1) [136].

Az NDC-s betegeket 4 havonta ellenőriztük az autoimmun járóbeteg szakrendelésen. A vizitek alkalmával részletes fizikális vizsgálat történt. Minden beteg esetében évente történt mellkas felvétel, légzésfunkciós teszt, Doppler echocardiográfia, illetve szükség szerint nagy felbontóképességű CT (HRCT) vizsgálat. A vizitek alkalmával a fizikális státusz rögzítése mellett meghatároztuk a vörösvértest süllyedést, vérképet, vese-májfunkciót és az immunszerológiai paramétereket.

Minden betegben történt szemészeti vizsgálat, Schirmer teszt, nyálszekréció meghatározás, testplethysmographia, és nyelőcső szcintigráfia a motilitászavar megítélésére [137].

Az alfacalcidol terápia alkalmazása során, minden NDC-s betegben plazma 25(OH)D vitamin, szérum citokin szint (IL-12, IFN- γ , IL-23, IL-17, IL-6, IL-10) mérés, valamint a természetes Treg sejtek számának és funkciójának meghatározása történt a terápia előtt és azt követően. Mindemellett vizsgáltuk az IL-17 termelő CD4⁺ T sejtek számát és funkcióját.

D vitamin szint meghatározás

A plazma 25-hidroxi-D vitamin 25(OH)D vitamin meghatározások a DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Pathológiai Intézetében történtek. A betegek és a kontroll csoport 25(OH)D vitamin szintjének meghatározását nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel végeztük. A méréshez Jasco műszereket és Bio-Rad reagens kítet használtunk. A mintát (500 µL EDTA-val alvadásgátolt vérből nyert plazma) az előkészítés során megtisztítjuk a fehérjéktől és a tisztított felülúszóból injektálunk 50 µL-t. Az elválasztást 90x3,2 mm-es C18-as töltetű reverz fázisú Bio-Rad oszlopon végeztük. A mobil fázis metanol-víz keverék (Bio-Rad), melyet 1,1 mL/perc sebességgel áramoltattunk. Az elválasztott 25(OH)D vitamin kvantitatív meghatározásához 265 nm-re beállított diódasoros detektort használtunk. A vizsgálati eredmények interpretálása ng/ml-ben történt.

Az irodalmi adatok alapján D vitamin elégtelenségnek tekintettük a 30 ng/ml-nél kisebb plazma 25(OH)D vitamin koncentrációt, míg D vitamin hiányállapotnak az 10 ng/ml alatti plazma 25(OH)D szintet jelöltük [138].

Immunszerológiai vizsgálatok

Az immunszerológiai meghatározások a DEOEC Regionális Immunológiai Laboratóriumában történtek.

Az *antinukleáris antitestek (ANA)* kimutatását HEp2 sejtvonalon indirekt immunfluoreszcenciával végeztük.

Az *autoantitesteket* (anti-ENA, anti-RNP, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-Jo1, anti-Scl70, anti-DNS, anti-centromer, anti-cardiolipin [anti-CL]) ELISA módszerrel határoztuk meg (Pharmacia & Upjohn, Diagnostic GmbH, Freiburg, Germany és Cogent Diagnostics, Edinburgh, UK).

Az *IgM rheumatoid faktor (RF)* mérése nephelométerrel (Behring, Germany) történt, pozitívnak az 50 U/l feletti értéket tekintettük.

A *ciklikus citrullinált peptid elleni antitest* (anti-CCP IgG) meghatározásához második generációs ELISA tesztet (Quanta Lite™, CCP IgG ELISA; Inova Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) használtunk, a gyári előírásoknak megfelelően.

Az NDC-s beteg első jelentkezésekor, illetve a kontrollok alkalmával levett, majd centrifugálással nyert szérumokat felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

A CD4+CD25+ T sejtek izolálása

A sejtés vizsgálatok a DEOEC Regionális Immunológiai Laboratóriumában történtek. A NDC-s betegek és a kontroll személyek perifériás mononukleáris sejtjeit, heparinizált teljes vérből különítettük el Ficoll/Hystopaque sűrűség-gradiens centrifuga segítségével (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA). Az elkülönített polimorfonukleáris sejtekből a CD4+CD25+ T sejteket Miltenyi kittel izoláltuk (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) a gyári leírás szerint. A nem-CD4+ T sejteket indirekt mágneses, biotin antitest koktélt és anti-biotin microbead-t tartalmazó jelöléssel távolítottuk el. A mágneses szeparáció során LD oszlopokat használtunk. A CD25+ sejteket pozitív szelekciós eljárással tisztítottuk meg az ún. „pre-enriched” CD4+ T sejt frakcióból. Ennek során a CD4+ T sejteket direkt jelöltük anti-CD25 microbead-ekkel, majd a CD4+CD25+ T sejteket leoldottuk az MS oszlopról.

Szuppressziós assay

A mágnesesen izolált 1×10^5 CD4+CD25+ és CD4+CD25- T sejteket önmagukban és együtt tenyésztettük 72 órán keresztül, 200 µl cRPMI (bikarbonát alapú puffer oldat; Roswell Park Memorial Intézet alapján) 1640 és 96-os “U bottom” plate-ken. A kevert limfocita

kultúrában a CD4+CD25+ és a CD4+CD25- sejtek 1:1 arányát alkalmaztuk. A poliklonális stimuláció során a sejteket anti-CD3/CD28 T sejt expandáló mikrobead-ekkel stimuláltuk (DynaL Biotech, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 1 bead/sejt koncentrációban. A proliferációhoz tetrazolium-alapú assay-t (EZ4U Proliferation Kit, Biomedica Inc) használtunk. A kultúrához a szubsztrátot 2,5 óra múlva adtuk hozzá, végül az OD értékek leolvasása 450 nm-n, ELISA olvasóval történt. A kevert limfocita reakció értékeit a CD4+CD25+ T sejtek kultúrájának OD értékeivel korrigáltuk ($OD_{MLR_{corr}} = OD_{MLR} - OD_{CD25+}$). A szuppressziós aktivitást, a kevert limfocita reakció és CD4+CD25+ T sejt kultúrák OD értékeinek hányadosaként határoztuk meg (proliferatív index = $OD_{CD25-} / OD_{MLR_{corr}}$).

A CD4+CD25^{high}Foxp3+ T sejtek meghatározása Flow Citométerrel

A Foxp3 festést a gyári előírásnak megfelelően végeztük (eBioscience, San Diego, CA, USA). A polimorfonukleáris sejteket Ficoll/Hystopaque gradiens centrifugával szeparáltuk, majd 100 µl preparált sejtet adtunk minden csőbe (1×10^6 cell/ml). A sejtek CD4 és CD25 monoklonális antitesttel történő sejtfelszíni festése után, a sejteket hideg Flow citométer pufferben mostuk (eBioscience). A frissen preparált 1 ml fixációs/permeabilizációs munka oldatot adtuk mindegyik mintához. A sejteket 4°C-on 30-60 percig inkubáltuk sötétben, majd 2 ml 1X permeabilizáló puffer oldatot (eBioscience) adunk hozzá és 2%-os (2µl) normál patkány szérummal blokkoltuk a reakciót 1X permeabilizációs bufferben, 4°C-on 15 percig. A blokkolást követően 20 µl anti human Foxp3-PE antitestet adtunk a sejtekhez, majd 4°C-on legalább 30 percig inkubáltuk azokat, sötétben. Végül a sejteket 2 ml 1X Permeabilizációs Bufferrel mostuk és Flow Cytometry Festő Bufferben szuszpendáltuk újra (eBioscience). A limfocitákat nagyságuk és granuláltságuk alapján különítettük el. 10000 kapuzott eseményt (limfociták) gyűjtöttünk össze minden minta esetén FACSCalibur

eszközzel (Becton Dickinson, Germany, Heidelberg). Az adatok analízise során CellQuest szoftvert használtunk (Becton Dickinson). Foxp3 pozitivitást mutató CD4⁺CD25^{high} szuppresszor T sejtek meghatározása a Foxp3 festődés alapján történt. A Foxp3 átlagos fluoreszcencia intenzitás szignifikánsan magasabb volt a CD4⁺CD25^{high} szuppresszor T sejtek esetén a CD4⁺CD25^{low} vagy CD4⁺CD25⁻ sejtekhez képest ($p < 0,01$). A következő reagenseket használtuk: Ficoll és CD4-FITC monoklonális antitest (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), CD25-PC5 (Immunotech, Marseilles, France), Foxp3-PE és intracelluláris festő kit (eBioscience).

Az intracitoplazmatikus citokinek meghatározása Flow Citométerrel

1 ml heparinizált vért hígítottunk kétszeres RPMI 1640-ban (GIBCO-BRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). A sejteket 25 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) 1 ng/ml ionomycin (Sigma) használatával stimuláltuk 4 órán keresztül 10 mg/ml brefeldin-A (BFA) (Sigma) jelenlétében. Az inkubáció 37°C-on 5%-os CO₂ közegben történt. A stimulálatlan, BFA-t tartalmazó sejteket használtuk kontrollként. A sejtek stimulációját követően a sejtfelszíni festéshez anti-human CD4-PC5-t vagy CD8-PC5 antitestet (Immunotech) használtunk, 30 percen át, szobahőmérsékleten. A mintákat mostuk, majd fixáltuk és permeabilizáltuk, IntraPrepTM permeabilizáló reagenst használva a permeabilizáláshoz a gyári előírás szerint (Beckmann Coulter, USA). Ezt követően a mintákat 30 percen keresztül inkubáltuk, sötétben, intracitoplazmatikus antitestre specifikus monoklonális antitesttel, anti-human IL-17-PE-vel (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), vagy annak megfelelő izotípus kontrollokkal (anti-mouse IgG1-FITC vagy IgG1-PE izotípus antitestek). A sejteket 1% paraformaldehiddel fixáltuk, majd 6 órán belül analizáltuk Coulter FC500 flow citométerrel (Beckmann Coulter, USA). Legalább tízezer CD4⁺ vagy CD8⁺ sejtet számoltunk (csak CD4⁺ sejteket az IL-17 esetén), és az eredményeket CXP

Analysis Szoftverrel értékeltük (Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA).

A szérum IFN- γ , IL-12, IL-6, IL-17 IL-23 és IL-10 meghatározása ELISA módszerrel

A szérum citokin szinteket enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) módszerrel határoztuk meg a gyári előírásnak megfelelően (IL-23 ELISA kittek a Bender MedSystemstől, Burlingame, CA, USA; IL-10, IL-17, IL-6, IFN- γ és IL-12 (p40) ELISA kittek mindegyike a R&D systemtől, Minneapolis, MN, USA). A minimálisan detektálható koncentráció 0,7 pg/ml volt az IL-6-, 78 pg/ml az IL-23-, 7,8 pg/ml az IL-10-, 15 pg/ml az IL-17-, és 5,6 pg/ml volt az IFN- γ esetében. Az intra-assay és inter-assay coefficients <5% és <10% volt minden esetben. Minden minta esetén dupla mérés történt. Az NDC-s beteg jelentkezésekor levett, majd centrifugálással nyert szérumokat felhasználásig -70 °C-on tároltuk

Statisztikai analízis

Az adatokat leíró analízissel jellemeztük (esetszám, átlagérték, standard deviáció). Az adatokat átlag érték $\pm$ standard deviáció formájában adtuk meg. A csoportok összehasonlítása egy vagy kétmintás t-próbával, chi2 próbával, illetve Fisher féle ekzakt analízis segítségével történt. A normalitás tesztek után az adatokat Student féle *t*-teszttel vagy Mann–Whitney *U* teszttel hasonlítottuk össze, a korreláció vizsgálatokhoz a Spearman's rank korrelációt használtuk. A relatív rizikót és a 95%-os konfidencia intervallumot logisztikus regressziót alkalmazva kalkuláltuk. A *p* értékek meghatározásánál a 0,05-nél kisebb értékek esetén beszéltünk statisztikai szignifikanciáról. Az eredmények kiértékelése GraphPad software (San Diego, USA) valamint az SPSS szoftver, 15.0 verziójának segítségével történt.

EREDMÉNYEK

A 161 NDC-s beteg klinikai és szerológiai adata

A 161 NDC-s beteg életkora átlagosan $44,91 \pm 12,7$ év, a követési idő átlagosan $4,09 \pm 2,36$ év volt. A nő/férfi arány 154/7 (**5. táblázat**).

	NDC-s betegek N=161	Kontroll N=58
Életkor a vizsgálat idején (évek) (átlag $\pm$ SD)	$44,91 \pm 12,7$ (range: 17-78)	$43,9 \pm 15,01$ (range: 17-80)
Követési idő (évek)	$4,09 \pm 2,36$ (range: 0,5-9)	-
Nő/férfi	22:1 (154/7)	18:1 (55/3)

5. táblázat A vizsgálati csoportok (NDC és kontroll populáció) demográfiai adatai

A leggyakoribb szervi tünet polyarthrit (28,5%) volt, bőrtüneteket (fotoszenzitivitás, erythema, erythema nodosum, 3 betegben limfocitás vasculitis) 22,9%-ban, Raynaud jelenséget 17,3%-ban észleltünk (**6. táblázat**). Szemszáradásról a betegek 15,5%-a panaszkodott, és kisebb gyakorisággal pleuritis (5,59%), neuropathia (4,96%), mély vénás thrombosis (2,48%) myositis (1,2%) és tüdőérintettség (1,2%) volt a betegség első klinikai megnyilvánulása. A betegek 13,6%-nak voltak nyelési panaszai. Radionuklid eljárást alkalmazva a nyelőcső motilitási zavar a betegek 50,3%-ban már kimutatható volt. Az immunszerológiai eltérések között leggyakoribb volt az ANA, ami a betegek 64,59%-nak szérumban találtunk. Az NDC-s betegek szérumban a legkorábban megjelenő antitest az anti-SSA, ami 43 beteg (26,7%) szérumban volt jelen, anti-CL antitestet 40 beteg (24,8%)

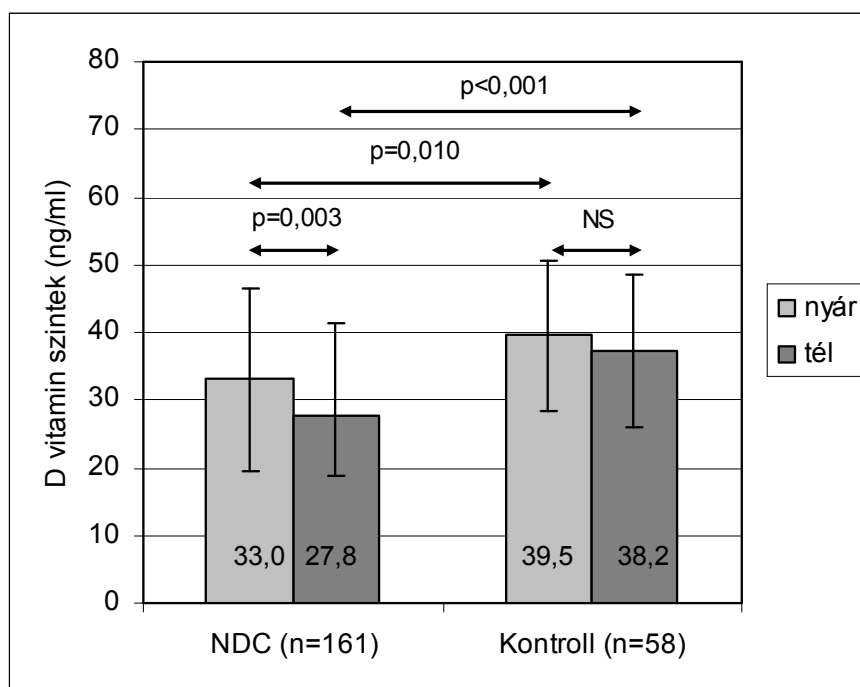
széruma tartalmazott. U1RNP ellen termelődött autoantitestet 29 betegben (18,0%), anti-Sm-t 8 (4,9%), anti-CCP pozitivitást 14 (8,6%), anti-DNS-t 12 (7,4%), anti-SSB-t 9 (5,59%), ANCA-t 4 (2,48%), a rheumatoid faktort 2 beteg (1,2%) szérumában tudtunk kimutatni az első jelentkezéskor.

Klinikai tünetek	Esetek	
	N	%
Nyelőcső motilitászavar	81	50,3
Nyelési panasz	22	13,6
Polyarthrit	46	28,5
Szájszáradás	40	25
Bőrtünet	37	22,9
Raynaud jelenség	28	17,3
Szemszáradás	25	15,5
Pleuritis	9	5,59
CNS- perifériás tünet	8	4,96
Thrombosis	4	2,48
Myositis	2	1,2
Tüdő	2	1,2
Autoantitestek		
ANA	104	64,59
Anti-SSA	43	26,7
Anti-CL	40	24,8
Anti-RNP	37	22,9
Anti-CCP	14	8,6
Anti-DNS	12	7,4
Anti-SSB	9	5,59
ANCA	4	2,48
RF	2	1,2

6. táblázat A 161 NDC-s betegben megfigyelt leggyakoribb első klinikai tünet és autoantitestek előfordulása

A D vitamin szint meghatározás eredménye a 161 NDC-s betegben

A 161 NDC-s betegben és az 58 kontroll személyben a D vitamin szint meghatározás a júniustól októberig tartó nyári időszakban, és a januártól májusig tartó téli időszakban történt (4. ábra). A 161 NDC-s beteg nyári és a téli periódusban mért 25(OH)D vitamin értéke alacsonyabb volt, mint a kontroll egészséges csoporté (NDC-nyár: $33,0 \pm 13,4$ ng/ml, kontroll nyár: $39,5 \pm 11,2$ ng/ml; $p < 0,01$; NDC-tél: $27,8 \pm 12,48$, kontroll tél: $38,2 \pm 12,1$ ng/ml; $p < 0,001$).



4. ábra A 161 NDC-s beteg D vitamin szintjének szezonális változása, összevetve az egészséges kontrollal.

Az NDC-s betegekben a nyári időszakban mért D vitamin szint alacsonyabb volt, a télihez képest (NDC nyár: $33,0 \pm 13,4$ ng/ml, NDC tél: $27,8 \pm 12,48$ ng/ml, $p < 0,001$). A kontroll csoportban a nyári és a téli D vitamin szintek között nem volt statisztikailag mérhető

különbség (kontroll nyár: $39,5 \pm 11,2$ ng/ml, kontroll tél: $38,2 \pm 12,1$; ns.), ezért a továbbiakban a kontroll csoport nyári D vitamin szintjeihez hasonlítottuk a betegek értékeit.

Az NDC-s betegek 41,6%-ban (67 beteg) találtunk alacsony (<30 ng/ml) D vitamin szintet a nyári időszakban, míg télen az alacsony D vitamin szintű NDC-s betegek száma 54,3%-ra (88 beteg) nőtt. A kontroll csoport 18,4%-nak (14 egyén) volt alacsony D vitamin szintje (7. táblázat). Az alacsony D vitamin szintű betegekben (D vitamin: <30 ng/ml) a nyári hónapokhoz viszonyítva, a téli időszakban tovább csökkent a D vitamin plazmakoncentrációja (D vitamin szint nyáron: $21,9 \text{ ng/ml} \pm 4,7 \text{ ng/ml}$, télen: $18,1 \text{ ng/ml} \pm 5,9 \text{ ng/ml}$; $p < 0,03$). Kritikusan alacsony D vitamin (<10 ng/ml) szintet az NDC-s betegek 3,1%-ban (5 beteg) észleltünk, míg az egészséges kontroll csoportban egy esetben sem.

		NDC-s betegek N= 161		Kontroll N=58
		Nyár	Tél	Nyár
Alacsony D vitamin szintű esetek (<30 ng/ml)	D vitamin szint	$21,0 \pm 5,79 \text{ ng/ml}^a$	$18,4 \pm 6,7 \text{ ng/ml}^b$	$25,5 \pm 4,75 \text{ ng/ml}^c$
	n (eset)	67 (41,6%)	88 (54,3%)	14 (18,4%)
Kritikusan alacsony D vitamin szintű esetek (<10 ng/ml)	D vitamin szint	$8,6 \pm 1,79 \text{ ng/ml}$	$7,9 \pm 1,8 \text{ ng/ml}$	-
	n (eset)	5 (3,1%)	5 (3,1%)	-

7. táblázat Az NDC-s betegek D vitamin szintjének szezonális változása (Szignifikancia: a-c: nyár- kontroll= $p < 0,12$; b-c: tél- kontroll: $p < 0,016$; a-b: nyár-tél: $p < 0,03$)

Összefüggés a D vitamin szint valamint a klinikai és laboratóriumi paraméterek között, a 161 NDC-s beteg vizsgálatakor

A 161 NDC-s betegben az alacsony D vitamin szint (<30 ng/ml) mellett gyakoribb volt a bőrtünetek - fotoszenzitivitás, erythema, krónikus diszoidos bőrjelenség ($p=0,0046$)

jelenléte, emellett ugyanezen betegekben szignifikánsan nőtt a pleuritis ($p=0,0346$) és a nyelőcső motilitászavar ($p=0,0109$) előfordulása (**8. táblázat**).

Klinikai tünetek és az alacsony (<30 ng/ml) D vitamin szint közötti összefüggés	OD (1<)	P
Szem/szájszáradás	0,8909 0,3768-2,107	0,8276
Polyarthrit	0,7621 0,3772-1,540	0,4834
Bőrtünet	2,987 1,397-6,385	0,0046
Pleuritis	5,367 1,078-26,719	0,0346
Központi idegrendszeri-perifériás tünet	0,8344 0,1924-3,619	1
Raynaud jelenség	0,7407 0,3178-1,726	0,5331
Nyelési panasz	1,650 0,6569-4,144	0,3448
Motilitászavar	2,369 1,245-4,507	0,0109

8. táblázat Az NDC-s betegekben észlelt leggyakoribb klinikai tünetek összefüggése az alacsony D vitamin szinttel (OD=odds ratio)

A betegek szérumában mérhető autoantitestek közül az anti-RNP ($p=0,024$), anti-SSA ($p=0,029$), anti-CCP ($p=0,0001$) antitestek jelenléte és az alacsony D vitamin szint között szignifikáns összefüggést találtunk (**9. táblázat**).

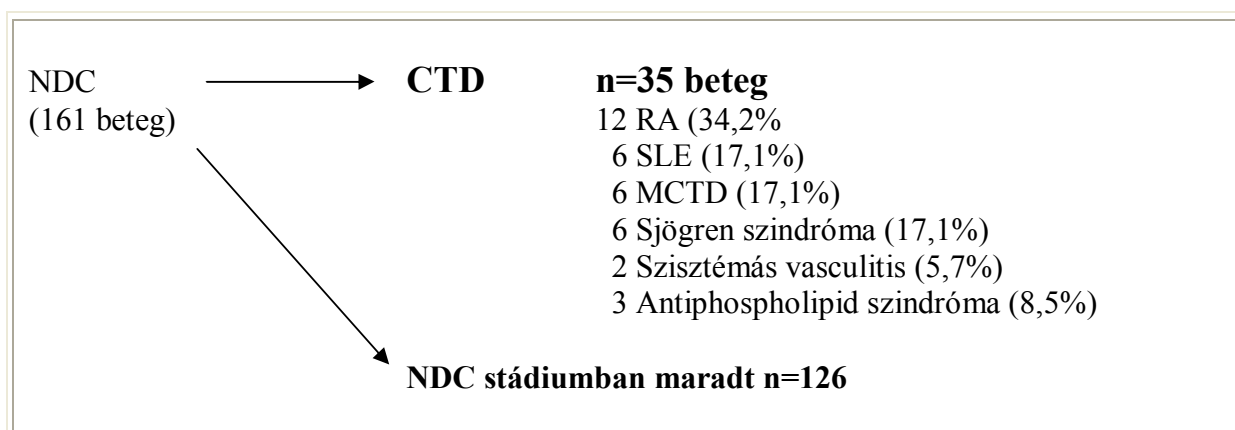
A 161 NDC-s betegből 35 beteg (21,7%) differenciálódott definitív kötőszöveti betegségbe (CTD) (**5. ábra**). A CTD-be történő differenciálódás ideje átlagosan $2,3 \pm 1,2$ év volt.

Autoantitestek és az alacsony (<30 ng/ml) D vitamin szint közötti összefüggés	OD (1<)	p
Anti-RNP	5,083 1,286-20,094	0,0240
Anti-SSA	3,474 1,147-10,520	0,029
Anti-CCP	12,0 3,541-42,036	0,0001
Anti-DNS	0,4896 0,1751-1,369	0,2551
ANCA	0,4024 0,064-2,51	0,2978
Anti-CL	1,715 0,6535-4,501	0,3728
Anti-SSB	0,5254 0,1484-1,860	0,2945

9. táblázat. Az NDC-s betegekben észlelt leggyakoribb autoantitestek összefüggése az alacsony D vitamin szinttel (OD=odds ratio)

A 35 betegből 12 esetben RA, 6 betegben SLE, 6 betegben MCTD, 6 betegben Sjögren szindróma, 2 esetben szisztémás vasculitis, 3 betegben antiphospholipid szindróma irányába történt differenciálódás.

5. ábra Az NDC stádiumból a definitív kötőszöveti betegségbe differenciálódott betegek



A 35 definitív kötőszöveti betegségbe differenciálódott beteg D vitamin szintje jelentősen alacsonyabb volt, mint az NDC stádiumában maradt betegek értékei (CTD-be differenciálódott betegek: $14,7 \pm 6,45$ ng/ml, NDC stádiumban maradt betegek: $33,0 \pm 13,4$ ng/ml $p < 0,0001$) (**10. táblázat**).

	CTD-be differenciálódott betegek N=35	NDC stádiumban maradt betegek N=126	p<
Életkor az első vizsgálat idején (évek) (átlag $\pm$ SD)	$43,85 \pm 11,1$ (range:21-67)	$44,9 \pm 12,7$ (range:17-78)	ns
D vitamin szint az első vizsgálatkor (nyár) (ng/ml)	$14,7 \pm 6,45$ (range: 4,7-25,2)	$33,0 \pm 13,4$ (range:6-88,9)	0,0001

10. táblázat A CTD-be differenciálódott 35 beteg D vitamin szintjének összevetése az NDC stádiumban maradt betegekkel és a kontroll csoporttal

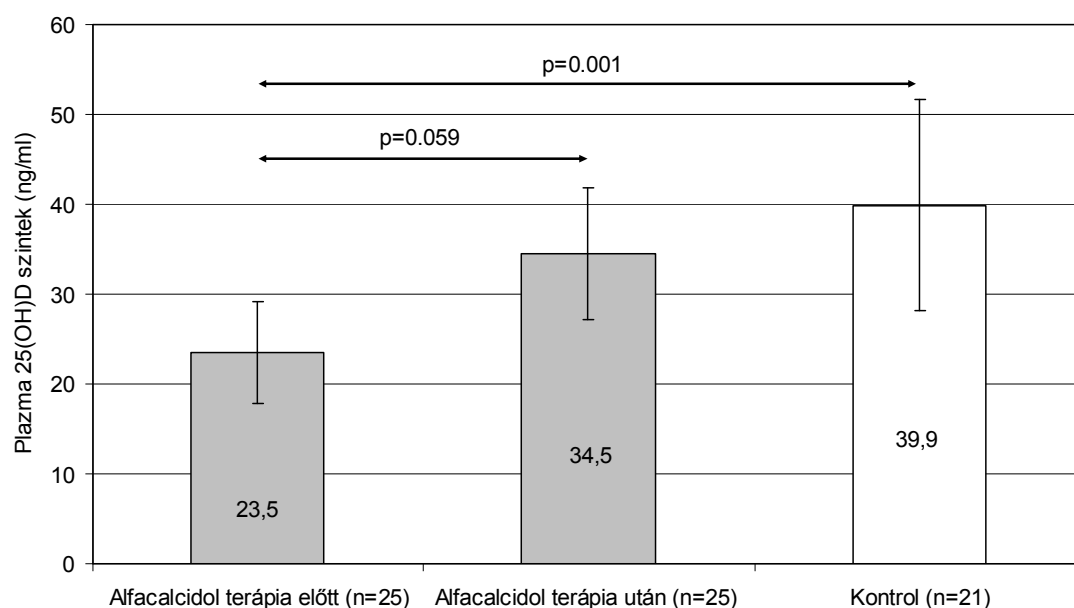
Az alfalcidol terápiában részesülő D vitamin hiányban szenvedő NDC-s betegek demográfiai jellemzői

Az NDC diagnózisakor, a betegek (n=25) életkora átlagosan $41,05 \pm 10,9$ (range: 16-62) év, a vizsgálat megkezdésekor a betegség tüneteinek fennállási ideje $2,9 \pm 1,3$ év volt. Az alfalcidol terápiában részesülő betegek mindegyike nő volt.

Plazma D vitamin szintek orális D vitamin kezelés előtt és után NDC-s betegekben

A vizsgált NDC-s betegekben a plazma 25(OH)D vitamin szint szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges kontrollokhoz (n=21) képest (NDC: $23,5 \pm 5,6$ ng/ml vs. kontrol: $39,9 \pm 11,7$ ng/ml; $p=0,001$) (**6. ábra**). Az 5 hetes orális, napi 0,5 μ g alfalcidol

terápia emelte a plazma 25(OH)D vitamin szintet, bár a terápia előtt és után mért értékek között nem volt szignifikáns különbség (NDC-s betegekben mért D vitamin szint alfacalcidol adása előtt $23,5 \pm 5,6$ ng/ml vs. -után $34,5 \pm 7,4$ ng/ml, $p=0,059$). Az alfacalcidollal való kezelés előtt minden vizsgált NDC-s beteg D vitamin elégtelenséget (<30 ng/ml) mutatott, míg a kezelést követően már csak 7 betegnek (28%) volt alacsony D vitamin szintje.



6. ábra Plazma 25(OH)D vitamin szintek NDC-s betegekben alfacalcidol kezelés előtt és után

Szérum citokin koncentrációk a 25 NDC-s betegben, a D vitamin terápia előtt és azt követően

A vizsgált 25 NDC-s beteg kiindulási proinflammatorikus citokin (INF- γ , IL-12, IL-17, IL-23 és IL-6) szintjei magasabbak voltak, mint a D vitamin kezelés után mért szérumszintek, míg az IL-10 citokin szint emelkedett a terápiát követően (11.

táblázat). A vizsgált NDC-s betegekben, az alfacalcidol terápiát megelőzően mért 25(OH)D vitamin szint fordított korrelációt mutatott a szérumban IL-23 és IL-6 citokin szintekkel (IL-23: -0.713, IL-6: -0.751, $p=0,01$).

Citokinek	Alfacalcidol kezelés előtt (n=25)	Alfacalcidol kezelés után (n=25)	Szignifikancia
IL-12 (pg/ml)	156,7 ± 75,2	87,5 ± 42,1	0,001
IFN- γ (pg/ml)	41,5 ± 12,0	21,7 ± 9,9	0,001
IL-23 (pg/ml)	385,2 ± 82,2	210,0 ± 69,3	0,001
IL-6 (pg/ml)	39,4 ± 11,3	23,5 ± 6,3	0,001
IL-17 (pg/ml)	37,8 ± 9,6	17,8 ± 4,5	0,009
IL-10 (pg/ml)	8,4 ± 3,0	21,4 ± 9,7	0,001

11. táblázat. A szérumban IFN- γ , IL-12, IL-17, IL-23, IL-6 és IL-10 citokin szintek az alfacalcidol kezelés előtt és után NDC-s betegekben

CD4+IL-17 expresszáló Th17 sejtek és CD4+CD25^{high}Foxp3+T sejtek vizsgálata a 25 NDC-s beteg szérumban - Th17/nTreg egyensúly az alfacalcidol kezelés előtt és után

A Th17 (CD4+IL-17+) sejtek százalékos és abszolút értéke egyaránt jelentősen magasabb volt a vizsgált NDC-s betegekben a D vitamin analóggal való kezelést megelőzően, összehasonlítva a kezelés után mért értékekkel (**12. táblázat**).

A természetes Treg (CD4+CD25^{high}Foxp3+) sejtek százalékos és abszolút értéke emelkedett a D vitamin kezelés után (a táblázatban csak az abszolút értékeket tüntettem fel).

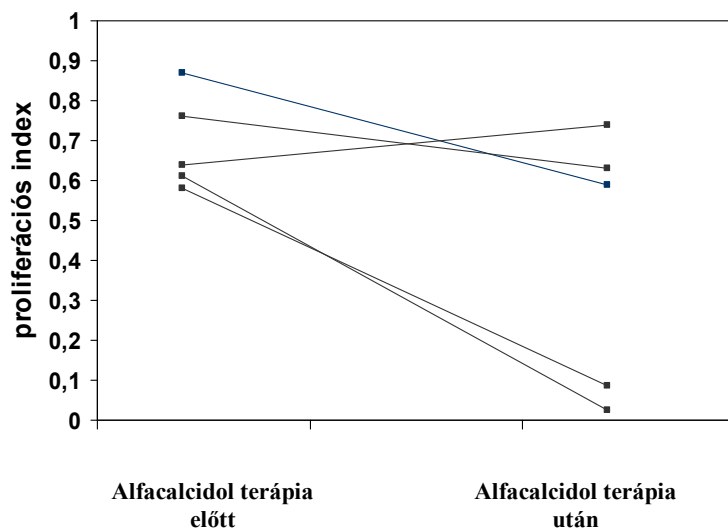
Az előbbieket alapján, az NDC-s betegek Th17/Treg sejtjeinek a relatív és az abszolút hányadosa egyaránt nőtt a D vitamin terápia után. (CD4+CD25^{high}Foxp3 és CD4+Th17+ arány százalékban: $0,23 \pm 0,15$ vs. $0,8 \pm 0,7$ $p < 0,005$).

	Alfacalcidol kezelés előtt (n=25)	Alfacalcidol kezelés után (n=25)	Szignifikancia (p)
CD4+IL-17+ (G/L)	$2,72 \pm 0,065$	$1,31 \pm 0,03$	0,001
CD4+CD25^{high} Foxp3 (G/L)	$0,032 \pm 0,029$	$0,071 \pm 0,02$	0,02
CD4+CD25^{high}Foxp3+ T és CD4+CD17+ T sejtek (G/L) sejtek (G/L) hányadosa	$0,00114 \pm 0,0061$	$0,00355 \pm0,00223$	0,05

12. táblázat CD4+IL-17 expresszáló Th17 sejtek és CD4+CD25^{high}Foxp3+T sejtek az NDC-s betegek perifériás vérében (G/L= giga/liter)

A Treg sejtek funkcionális aktivitása az alfacalcidol terápiát követően

A CD4+CD25^{high} T sejtek autológ CD4+CD25⁻ T sejtek proliferációjára kifejtett gátló hatását anti-CD3 és anti-CD28-val történő stimuláció segítségével vizsgáltuk. A CD4+CD25^{high} T sejtek, autológ CD4+CD25⁻ T sejteken való szuppressziós képessége hasonló volt az egészséges kontrollok szuppressziós aktivitásához ($0,638 \pm 0,1$ vs. $0,64 \pm 0,1$ $p=ns$).



7. ábra A $CD4+CD25^{+high}$ Foxp3 T sejtek szuppressziós aktivitása 5 NDC-s betegben. Az alfacalcidol terápiát követően a Treg sejtek, proliferációs indexben kifejezett funkcionális aktivitása fokozódott.

Az nTreg sejtek szuppresszív hatása fokozódott az alfacalcidol terápiát követően (Proliferációs index: $0,638 \pm 0,1$ vs. $0,415 \pm 0,15$) (**7. ábra**). A vizsgált 5 NDC-s betegből 4 esetében, a $CD4+CD25^{+high}$ T sejtek, autológ $CD4+CD25^{-}$ sejtek proliferációjára kifejtett gátló hatása javult, míg egy beteg esetén a $CD4+CD25^{+high}$ T sejtek szuppressziós aktivitása nem változott az alfacalcidol terápiát követően.

MEGBESZÉLÉS

A poliszisztémás autoimmun betegségek jelenlegi terápiájának legnagyobb nehézsége az, hogy alapvetően nem tudja megszüntetni a kóros immunpatológiai folyamatot, és nem tudja leállítani az idült szervi destrukciót kiváltó mechanizmust. A korszerű kezelés kialakításában éppen ezért kulcsfontosságú az autoimmun betegségek patomechanizmusának ismerete. Nagyszámú kutatás intenzíven keresi azokat a prediktív faktorokat, amelyeknek szerepe lehet a szisztémás autoimmun betegségek manifesztálódásában, és igyekeznek feltárni azokat az utakat, amelyek révén ezek a faktorok befolyásolják az immun-rendszert.

Bár a jelenleg ismert több mint 80 autoimmun betegség patomechanizmusa valójában csak konkrétan az egyes betegségekre vonatkoztatva értelmezhető, az NDC kitüntetett szereppel bírhat a szisztémás autoimmun betegségek megismerésében. Az NDC kórállapot a szisztémás autoimmun betegségek egy speciális, dinamikus fázisa, mivel a betegek 30-40%-a differenciálódik valamelyik típusú definitív kötőszöveti betegségbe.

Az NDC-s betegekben jelenlévő sejtmag és a citoplazma komponensek elleni antitestek, valamint a több szervi érintettség, komplex immunregulációs zavart sejtet e betegség kialakulása hátterében. Munkacsoportunk korábbi tanulmányában megfigyelte az NDC-s betegekben a Th1 sejtek IFN- γ túltermelését, valamint a CD4+CD25^{high}Foxp3+ T cells (természetes regulatív T sejtek, nTreg) csökkent számát [139]. Ismert, hogy az nTreg sejteknek fontos szerepük van az effektor T sejtek működésének kontrollálásában, a szervezet saját szövetei károsodásának megakadályozásában, az immuntolerancia megtartásában [140]. Kevés adattal rendelkezünk azokról a provokáló faktorokról, amelyek befolyásolják az immunregulációt, és elősegítik, hogy az NDC kórállapot definitív szisztémás autoimmun kórképbe differenciálódjon.

Mai tudásunk szerint az autoimmun betegségek etiológiai hátterét a fiziológiás immuntolerancia károsodása, a regulatív sejtek diszharmóniája képezi, amely szabályozási rendellenességet a genetikai, hormonális és környezeti tényezők együttes kölcsönhatása idézi elő.

Az epidemiológiai és a kísérletes adatok szerint a D vitamin egyike lehet azoknak a faktoroknak, melynek hiánya alapvető tényező a különböző autoimmun betegségek kifejlődésében, beleértve a SM-t, Typ1DM, gyulladásos bélbetegségeket (IBD), RA-t és az SLE-t [141;142]. Összefüggést találtak az Typ1DM, SM, RA, SLE valamint az IBD esetén a D vitamin-hiányos állapot és e betegségek prevalenciája között. Egy hosszú távú, prospektív vizsgálat eredménye szerint alacsony plazma 25(OH)D vitamin szint esetén fokozott a SM kialakulásának esélye, ami felveti azt is, hogy a D vitamin terápia hatékony lehet az autoimmun betegségek megelőzésében is [143]. Munger vizsgálata szerint 40%-al alacsonyabb volt az SM kialakulásának kockázata azokban a nőkben, akikben a D vitamin szint a normális érték felső határán volt [144].

Nagyszámú klinikai vizsgálat szerint többféle szisztémás autoimmun betegségekben D vitamin hiány mutatható ki.

A szisztémás autoimmun betegségek prototípusaként számon tartott SLE-ben több tanulmány igazolta a D vitamin hiányt. Cutillas-Marco és munkatársai megfigyelték, hogy az átlagos plazma 25(OH)D vitamin szint szignifikánsan alacsonyabb cutan lupus erythematosusban, mint az egészséges kontroll csoportban [145]. Az ún. "Nurse's Health Study" I prospektív kohort vizsgálatban alacsony D vitamin szintet találtak a kanadai SLE-s betegek között [146]. O'Regan és munkatársai 12 felnőtt, 1-8 éven át követett SLE-s betegből 7 esetben mértek alacsony 1,25(OH)₂D₃ vitamin szintet [147]. Egy koppenhágai eset-kontroll vizsgálatban, Müller és munkacsoportja a 25(OH)D, 1,25(OH)₂D₃ és parathormon vitamin szinteket 21 SLE-s, 29 RA-s, valamint 12 osteoarthritis betegben

vizsgálva azt találta, hogy a betegcsoportok között az SLE-s betegek szérumában mért 25(OH)D vitamin érték volt a legalacsonyabb. Az 1,25(OH)₂D₃ tekintetében viszont nem találtak szignifikáns különbséget [148]. Szintén alacsonyabb 25(OH)D vitamin szint jelenlétét igazolták az SLE-s betegekben a keresztmetszeti vizsgálatok [122;149]. Kamen és munkatársai 123 frissen diagnosztizált, kezeletlen SLE-s betegben a plazma 25(OH)D vitamin szintet szignifikánsan alacsonyabbnak találták, mint a kontrollként használt Carolina Lupus Study 240 korban és nemben azonos SLE-s betegeiben [149]. A frissen diagnosztizált SLE-s betegekben belül az afrikai-amerikaiakban alacsonyabb volt 25(OH)D szint, mint a kaukázusi populációban. A 25(OH)D szint szezonális ingadozást mutatott, a nyári hónapokban magasabb volt, és legalacsonyabb szintet a téli időszakban mérték. Kritikusan alacsony, 10 ng/ml alatti D vitamin szintet a veseérintettséggel és a fotoszenzitív bőrtünettel járó SLE-s betegekben találtak. Több munkacsoport azonban nem talált összefüggést a D vitamin hiány és az SLE klinikai manifesztációi között [148;150;151].

Az SLE aktivitás és a D vitamin szint közötti összefüggés tekintetében sem egyértelműek az irodalmi adatok. Borba és munkatársai által vizsgált SLE-s betegek között a 12 aktív SLE-s betegnek alacsonyabb volt a 25(OH)D vitamin szintje a 24 minimálisan aktív és a 26 kontroll személyhez képest [152]. Becker és munkatársai megerősítették ezeket az eredményeket németországi betegek esetén. Az általuk vizsgált 57 SLE-s betegből a 34 aktív betegnek súlyos D vitamin hiánya volt [153]. Cutolo és munkatársai ezzel ellentétben a vizsgált 46 SLE-s betegükben nem találtak összefüggést a plazma 25(OH)D szint és a betegség aktivitása között [154].

Szisztémás sclerosisben szenvedő betegekben gyakoribbnak találták az alacsony D vitamin szintet, mint az egészséges populációban, és az eredmények azt is igazolták, hogy a beteg D vitamin statusa befolyásolja a kórlefolyását. Az SSc-ben szenvedő betegek 63-86% -ában D vitamin elégtelenséget, 9,5-35% -ában D vitamin hiányt észleltek, és az alacsony D

vitamin szinttel bíró betegek kórlefolyása súlyosabb volt, mint az élettani D vitamin szinttel bíró SSc-s betegeké [155-157]. Szignifikáns negatív korrelációt találtak SSc-ben, az alacsony D vitamin szint és az európai betegség aktivitási score valamint a szérum akut fázis faktorok között [157], vagyis a D vitamin elégtelenségben szenvedő betegeknek súlyosabb volt a betegsége. További megfigyelés, hogy a D vitamin elégtelenség gyakoribb azon betegek között, akiknek capillármikroszkópiával scleroderma pattern észlelhető, illetve azok között, akiknek alacsonyabb a DLCO (tüdő diffúziós kapacitás) értéke [156]. Az alacsony D vitamin szint és az echocardiografiával mért szisztolés pulmonaris artériás nyomás, valamint a tüdőfibrosis jelenlétének összefüggése tekintetében az eddigi eredmények ellentmondóak voltak [157]. A viszonylag kis betegcsoporton végzett vizsgálatok alapján még nem lehet egyértelműen összefüggést bizonyítani az alacsony D vitamin szint és az SSc egyéb szervi tünetei, - a gastrointestinális érintettség, bőrfekélyek és ízületi panaszok, valamint a limitált és a diffúz SSc között [155].

Primer Sjögren szindrómában alacsonyabbnak találták a 25(OH)D vitamin szinteket, amely inverz korrelációt mutatott a szolubilis interleukin-2 receptor koncentrációval, az exocrin mirigyek érintettségének súlyosságával és a belszervi exocrin manifesztációkkal [158;159]. Pozitív korrelációt találtak SS-ben a plazma 25(OH)D vitamin szint és az IgG titer között, illetőleg negatív korreláció volt a 25(OH)D vitamin koncentráció és az IgM rheuma faktor között [159]. Más vizsgálók adatai szerint nem volt különbség a primer SS-ben szenvedő betegek és kontrollok között a D vitamin szint tekintetében, extraglanduláris tünetek jelenléte esetén sem [160].

Epidemiológiai adatok szerint a rheumatoid arthritises betegek mintegy 60%-a szenved D vitamin elégtelenségben, illetve 16%-ukban D vitamin hiány mutatható ki [161]. Az "Iowa Women's Healthy Study" elnevezésű amerikai vizsgálatban azt találták, hogy az alacsonyabb D vitamin bevitel összefügg az RA gyakoribb megjelenésével [162]. Több

munkacsoport megfigyelése szerint RA-ban összefüggés van a betegség aktivitása valamint a 1,25(OH)₂D₃ vitamin szint között [163-165]. 64 észak-európai (Észtország) és az 54 dél-európai (Olaszország) RA-s beteg plazmájának alacsony 25(OH)D vitamin szintje korrelált a betegség aktivitási score-al (DAS28) [23;24]. Patel és munkatársainak keresztmetszeti megfigyelésében, korai polyarthritisben a 25(OH)D vitamin mennyisége összefüggött a betegség aktivitási és súlyossági mutatóival [166]. Ezzel ellentétben, Braun-Moscovici és munkatársai nem találtak összefüggést a betegség aktivitási index (DAS28) és a 25(OH)D vitamin szintek között [167]. Feser és munkatársai az alacsony D vitamin szintű, RA-ra specifikus antitesteket hordozó (RF és aCCP pozitív), de klinikailag egészséges egyéneknél nem tudták bizonyítani, hogy fokozott hajlamuk lenne az RA kialakulására [168].

Munkánkban elsőként vizsgáltuk a definitív poliszisztémás autoimmun kórképet megelőző NDC kórállapotában a plazma 25(OH)D vitamin szintjét és szezonális változását nagyszámú betegpopulációban. Megfigyelésünk szerint az NDC-s betegek D vitamin koncentrációja alacsonyabb, mint az egészséges személyeké. Kritikusan alacsony D vitamin (<10 ng/ml) szintet öt betegnél (3,1%) észleltünk, míg az egészséges kontroll csoportban, egy esetben sem.

NDC-ben a 25(OH)D szint szezonális ingadozást mutatott, a nyári hónapokban magasabb, a téli időszakban alacsonyabb értékeket találtunk. Nyáron az NDC-s betegek 41,6%-a D vitamin-hiányos (alacsony <30 ng/ml D vitamin szint), míg a téli időszakban a D hipovitaminózisban szenvedő betegek száma 54,3%-ra nőtt.

Az alacsony D vitamin szintű NDC-s betegekben a bőrtünetek (fotoszenzitivitás, bőrre lokalizált vasculitis, és erythema nodosum) a pleuritisek és a nyelöcső motilitászavar előfordulása gyakoribb volt, mint az élettani D vitamin szinttel bíró NDC-s csoportban. Ezekben a betegekben az anti-RNP, anti-SSA, anti-CCP autoantitestek előfordulása is nagyobb arányú volt.

Munkacsoportunk előzetes eredményei és az irodalmi adatok egyaránt jelzik, hogy az NDC kórállapotból bármelyik típusú definitív poliszisztémás autoimmun kórkép irányába történhet differenciálódás [6;16;20]. A jelenleg vizsgált NDC-s betegcsoportból 21,7%-ban történt progresszió a követés 2-4 éve között poliszisztémás autoimmun betegségbe. A leggyakoribb volt az RA jelentkezése, és közel azonos gyakoriságban alakult ki SLE, Sjögren-szindróma, valamint MCTD. A definitív kötőszöveti betegségbe differenciálódott betegek D vitamin szintje alacsonyabb (30 ng/ml alatt) volt, mint NDC stádiumban maradt betegeké.

Az eddigi tanulmányok egyértelműen arra utalnak, hogy a D vitamin szupplementáció lassíthatja az autoimmun betegségek kialakulását, és mérsékelni képes a meglevő tünetek súlyosságát is [69;138]. Kísérletes modellben, a D vitamin vagy analógjainak adásával kivédhető volt a kollagén indukálta arthritis és az experimentális autoimmun encephalitis. A már kialakult betegségnél a D vitamin terápia mellett, az experimentális autoimmun encephalitis, a kollagén indukálta arthritis, a kísérletes inzulitis és az autoimmun bélgyulladás tünetei javultak [144;169;170]. Az epidemiológiai vizsgálatok egyértelműen bizonyítják, hogy a csecsemő és gyerekkorban történő D vitamin pótlás csökkent az az Typ1DM kialakulásának lehetőségét, és az újonnan diagnosztizált gyerekkori Typ1DM egyénekben pedig a betegség progresszióját lassítja. Egy 30 éves finnországi vizsgálat szerint a csecsemőkorban egy éven át folyamatosan alkalmazott 2000 IU/nap D vitamin 80%-al csökkentette az Typ1DM kialakulását azokkal szemben, akik nem kaptak D vitamint [170]. Fronczak és mtsai írták le, hogy a szigetsejt elleni antitestek jelenléte csökken azokban az újszülöttekben, ahol az anyák D vitaminpótlást kaptak a terhesség alatt [171]. Tíz SM-es betegekben 1-2 éven át adott kalcium (16mg/kg), magnesium (10 mg/kg) és halolajból származó, 5000 IU/nap D vitamin pótlása csökkentette a relapszusok számát az előzetesen

észlelt fellángolásokhoz képest [172]. Tizenkét aktív SM-es betegben, napi 4000 IU D3 vitamin 31 ng/ml-ről 154 ng/ml-re emelte a 28. napon a plazma 25(OH)D szintet. Bizonyította a D vitamin kezelés kedvező hatását az is, hogy a koponya MR-en az SM lésiók száma csökkent [173]. Az $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D3 vitamint psoriasisban az osteoporosis kezelésére alkalmazták először, és azt figyelték meg, hogy a D vitamin csökkentette a psoriaticus lesiókat is [174]. Az oralisan, 1 µg/napi adagban alkalmazott 1α hidroxivitamin D3-al 7 psoriasisos betegből 4 betegben komplett remissziót sikerült elérni. Psoriasisos arthropathiában a 6 hónapon keresztül napi $2 \times 0,25$ µg dózisban alkalmazott alfalcidol csökkentette a betegség aktivitását [175].

Jelenleg, a psoriasis kezelésére a klinikai gyakorlatban, a lokális D vitamin terápiát alkalmazzák. Az $1\alpha,24$ -dihydroxyvitamin D3-al (Tacalcitol) 11 psoriasisos betegből 67%-ban a plakkok teljes megszűnését észlelték. A lokális kezelés sikeres volt az $1\alpha,25$ dihidroxivitamin D3 kezeléssel is: 15 µg/g koncentrációban 90%-os javulást észleltek, és nem okozott bőrsérülést [176].

Szisztémás autoimmun betegségekben a D vitamin terápia alkalmazását illetően a kísérletes állatmodellekben igen kedvező adatok vannak (**13. táblázat**).

A D vitamin terápia hatását két különböző egérmodellben (MRL/lpr és NZB/NZW egérben) vizsgálták lupusban. Ezekben az egerekben spontán jelentkeznek az SLE-hez hasonló tünetek és a humán SLE-re jellemző szervi eltérések.

Állatmodell	Humán megfelelő	Eredmények, a D vitamin hatásai	Irodalom
NOD egér Spontán kialakuló Typ-1 DM	Typ-1 diabetes	Állatmodellben megelőzhető volt az inzulitis (Spontán:55%, D-vitamin: 18%, D-vitamin analóg:11%) Gátolta a nycs-ban és pancreaszban a Th1 sejteket, növelte a Treg számot	Mathieu 1994 [177]
EAE Rágcsálókban	Sclerosis multiplex	Kivédte az EAE kialakulását Gátolta az axonális léziók kialakulását és demyelinizációt	Lemire 1992 [178]
IL-10 KO egér Experimentális colitis (TNBS indukálta colitis)	IBD	A D vitamin hiány fokozza a gyulladást, A D vitamin bevitel csökkentette az experimentális colitis tüneteit és a betegség progresszióját	Daniel 2008 [76]
II. típusú collagén indukálta arthritis	Rheumatoid arthritis	Csökkentette a betegség megjelenését a korai fázisban, később az ízületi aktivitást, és javította a bázisterápiára adott választ	Larsson 1998; Tsuji 1994 [179;180]
MRL/l egér	SLE	Csökkent az anti-dsDNS titer Mérséklődtek a bőrtünetek Csökkentette a proteinuriát, és a renális arteritist	Abe 1990; Koizumi 1985; Vaisberg 2000 [181-183]

13. táblázat. *Az aktív D vitamin hatásai experimentális modellekben*

Az MRL/lpr egerekben 1,25(OH)D vitamin adása mellett mérséklődtek az SLE-szerű bőrtünetek, az alopecia, fülnekrosis és hegek, valamint csökkent a proteinuria mértéke [178]. A D vitamin terápia 18.-dik hetében a szérum anti-dsDNA antitestek titerének csökkenését is észlelték. Egy másik MRL/lpr egerekkel végzett vizsgálatban a betegség tüneteinek megelőzésében az 1,25(OH)D vitamin hatása azonos volt a nagy dózisú kortikoszteroiddal [182]. Naponta adagolva a 1,25(OH)D vitamint, nem alakult ki proteinuria és javult a túlélés

MRL/lpr egerekben [184]. A VDR ligand 22-oxa-1,25(OH)₂D₃ vitamin szintén csökkentette a proteinuriát, a renális arteritist, a granuloma képződést, a térdízületi arthritis súlyosságát MRL/lpr egerekben [181]. A VDR ligand csökkentette az IgG termelést, a sejt proliferációt, az anti-ds-DNS termelődést, míg a B limfocitákban fokozott B sejt apoptosist észleltek. Intraperitoneális D vitamin alkalmazása mellett hasonló kedvező hatást nem sikerült elérni NZB/W egerekben [183]. Meg kell azonban jegyezni, hogy az ezekben a vizsgálatokban az eredményeket torzíthatja a különböző vagy nem megfelelő D vitamin dózis és a kis esetszám.

Az RA különböző állatmodelljeiben, a D vitamin szupplementáció és megfelelő diéta mellett csökkent az ízületi gyulladás. Az arthritis korai fázisban alkalmazott 1,25(OH)₂D₃ vitamin kezeléssel ki lehetett védeni a kollagén indukálta arthritist [169;180]. A betegség későbbi fázisában elkezdett aktív D vitamin terápia mellett csökkent az arthritis progressiója a D vitaminnal nem kezelt kontrollokhoz képest. RA-ban szenvedő betegekben a nagydózisú, 1 µg feletti dózisban alkalmazott 1α-vitamin D csökkentette a fájdalomérzetet és a C reaktív protein szintet [185]. Rheumatoid arthritises betegekben az orális alfacalcidol nemcsak a törések számát mérsékelte, de javította a klinikai tüneteket és csökkentette a DAS score-t [186-188] **(14.táblázat)**.

Az irodalmi adatok és a kapott eredményeink tükrében az alacsony D vitamin szintű NDC betegekben elsőként alkalmaztunk D vitamin pótlást D vitamin analóg, alfacalcidollal.

Vizsgálatunkban elsőként igazoltuk, hogy a D vitamin analóg alfacalcidol a Th1 és Th17 mediált immun-folyamatokat, a proinflammatorikus citokinek szintjét csökkentette. Ugyanakkor a rövid távú kezelés során már észlelhető volt a D vitamin szint emelkedése is. A D vitamin elégtelenséget mutató NDC-s betegeknél a D vitamin analóg alfacalcidol, 5 héten keresztül, napi 0,5 µg-ban való terápiás alkalmazását követően, a plazma 25(OH)D₃ vitamin szintje is emelkedett a betegek plazmában. Bár a plazma D vitamin szint emelkedése

nem volt szignifikáns mérvű, az 5 hetes alfacalcidol kezelést követően a betegeknek mindössze 28%-a (7 beteg) szenvedett még mindig D vitamin elégtelenségben. Mindez arra utal, hogy már az NDC stádiumban folyamatos D vitamin pótlásra lehet szükség

Humán betegségek	Eredmények	Irodalom
Rheumatoid arthritis	Az orális alfacalcidol javítja a tüneteket, az aktivitást, csökkenti a DAS score-t, komplett remissziót eredményezhet, csökkenti a törések kockázatát	Yamauchi 1989, Hein 2000, Ehrenstein 2004, [186-188]
Psoriasis	Az orális calcitriol a betegek többségében a tünetek javulását eredményezi elsősorban az enyhe és közepesen súlyos léziók esetén PA-ban 2x0,25µg/nap alfacalcidol 6 hónapon át javított a betegség aktivitását	Morimoto 1986; Perez 1996; Sugiyama 2005; Gaal 2009 [174;175;189;190]
Szisztémás sclerosis	Az orális calcitriol a bőrtüneteket javítja lineáris sclerodermában A calcipotriol és betametason kombináció csökkentette a bőrvastagságot	Dytoc 2007 [191]
Typ-1 diabetes	Csökkenti a gyermekkori indulású Typ1DM rizikóját, a szigetsejt elleni antitestek előfordulását, illetve a már kialakult betegség progresszióját	Hyponen 2001; Fronczak 2003; Lindley 2005; Littorin 2006 [170;171;192;193]
Typ-2 diabetes	A béta-sejtek funkciója és a glükóz tolerancia javul Csökkenti az inzulin rezisztenciát	Borissova 2003 [194]
Sclerosis multiplex	Csökkenti a SM megjelenésének esélyét Csökkenti a koponya MR-n látható SM-es léziók számát Csökkenti a relapsusok gyakoriságát	Goldberg 1986; Munger 2004; Viglietta 2005, Kimball 2007; [144;172;173;195]

14. táblázat Az aktív D vitamin terápia humán immun-mediált kórképekben

Számos tanulmány szerint, az nTreg sejtek számbeli vagy funkcióbeli károsodása fontos szereppel bír a human autoimmun betegségek, beleértve a collagen indukálta arthritis, SM, RA és Typ1DM pathogenezisében, és a Treg sejtek védő hatással bírtak különböző,

atherosclerosist modellező egerekben [195-199]. SM-ben [195], Typ1DM-ben [192], aktív RA-ban [186], psoriasisban [190] és myasthenia gravisban [200] szenvedő betegeknél szignifikánsan alacsonyabb a CD4+CD25+Treg sejtek szuppresszív funkciója, összehasonlítva az egészségesekével. Korábbi munkánkban azt találtuk, hogy a Foxp3+ Treg sejtek száma szignifikánsan csökkent az MCTD-s betegekben is, különösen a betegség aktív stádiumában [201].

Munkacsoportunk, elsőként vizsgálta NDC-s betegekben az nTreg sejtek számát és funkcióját. Eredményeink szerint az NDC-s betegek perifériás vérében alacsony az nTreg sejtek százaléka, illetőleg abszolút száma, amely az immunválasz szabályozásának károsodását, az autoimmun reakciók szuppressziójának csökkenését sugallja. Úgy tűnik, hogy az nTreg sejteknek fontos szerepük van definitív kötőszöveti betegségbe differenciálódás tekintetében [139].

A funkcionális vizsgálatok azt igazolták, hogy az NDC-s betegekből származó Treg sejtek gátolni tudják a CD4+CD25- autológ T sejtek proliferációját, funkcionális aktivitásuk hasonló az egészséges kontrollokéhoz, ugyanakkor az alfacalcidol terápia fokozni tudja szuppressziós aktivitásukat.

A klasszikus autoimmun kórképnek számító SLE-ben, az nTreg sejtek károsodott aktivitását figyelték meg, különösen a betegség aktív stádiumában, valamint csökkent Foxp3+ Treg sejt számot észleltek SLE-s gyermekben a betegség aktív fázisában [202-205]. Valencia és mtsai adatai alapján az SLE-s betegekből származó CD4+CD25^{high}Treg sejtek autológ CD4+CD25- Treg sejtek proliferációját gátló aktivitása csökkent az egészséges kontrollokéhoz képest [206]. Az aktív SLE-s betegek CD4+CD25^{high} Treg sejtjeinek szuppresszor funkciója *in vitro* anti-CD3-mal történő aktivációjuk során helyreállítható volt, amely arra utal, hogy a CD4+CD25^{high} Treg sejtek funkcionális károsodása reverzibilis, és a funkcionális károsodást inkább a Treg sejtek homeosztázisában fellépő zavara okozhatja, és

kevésbé intrinzik hiba. Munkánk az első klinikai vizsgálat, amelyben IL-17-t expresszáló CD4⁺ T limfocita meghatározás történt NDC-s betegek perifériás vérében. Az NDC-s betegekben szignifikánsan magasabb arányban tudtunk kimutatni IL-17 termelő CD4⁺ T limfocitákat, az egészséges kontrollokéhoz képest.

A Th1 és Th2 sejtektől jól elkülöníthető, Th17 sejtszoportot az IL-17 fokozott termelése jellemezi. Úgy tűnik, ezeknek a sejteknek fontos szerepük van az autoimmun pathomechanizmusú szövetkárosodás előidézésében, illetve kísérletes adatok szerint az IL-23/IL-17 útvonal fontos szereppel bírhat az autoimmun betegségek kiváltásában és fenntartásában.

Ismert, hogy az IL-17, mint potens gyulladásos citokin, fokozza a dendritikus sejtek érését. A szérumban IL-17 szint emelkedett különböző gyulladásos állapotokban, pl. psoriasisban és RA-ban [206]. A SSc korai fázisában lényegesen magasabb volt az IL-17 szint, mint a betegség későbbi stádiumában (51). SLE-s betegek vizsgálatakor nem találtak egyértelmű összefüggést a szérumban IL-17 és a betegség jelenléte, illetve aktivitása között. Több felmérésben az SLE-s betegekben az egészségesekével azonos volt az IL-17 szint, míg más tanulmányok emelkedettnek találták az IL-17 citokin mértékét, amely összefüggött a betegség aktivitásával [207]. D vitamin analógokkal való kezelés gátolta az IL-17 termelő T sejteket experimentális autoimmun prostatitisben [208].

A kezeletlen NDC-s betegekben az nTreg sejtek relatív aránya és abszolút száma egyaránt csökkent az egészséges kontrollokéhoz képest, míg az IL-17 termelő CD4⁺ T sejtek relatív és abszolút száma emelkedett. Vizsgálatunk szerint a D vitamin analóg alfacalcidol terápia javítani tudja az NDC-s betegek regulatív működési zavarát. Az alfacalcidol kezelést követően csökkent az intracitoplazmatikus IL-17 expresszió, valamint a szérumban IL-17 szint. A kezelés után a CD4⁺IL-17⁺ és CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T sejtarány kedvezően módosult, a CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺T és CD4⁺IL17⁺ sejtek hányadosa nőtt. A D vitaminpótlás javította

a CD4+CD25^{high}T sejtek szuppressziós képességét is. Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a D vitamin szupplementáció jótékony hatással van az NDC-s betegek immunhomeosztázisára, hatékonyan alkalmazható annak helyreállítására.

Több citokin, mint az IL-23 és IL-6 elősegíti a Th17 irányú differenciálódást. Az IL-23 citokin kulcsfontosságú a patogén, IL-17 és IL-22 termelő CD4+ T sejt populáció expanziójában. Állatmodellben, az IL-23 dependens IL-17 termelő CD4+ effektor T sejtek (Th17) bejutnak a target szervekbe, és elősegítik a szerv specifikus autoimmun gyulladásos folyamat kialakulását [209;210]. A human IL-23 fontos indukáló hatással van a naív CD4+ T sejtek Th17 irányú sejt differenciálódásában [211]. Az IL-23 p19 emelkedett szintjét figyelték meg különböző humán autoimmun kórképekben, mint SM-ben, SLE-ben, valamint Bechet kórban [212;213].

Az IL-6 pleiotrop hatású citokinnek szintén esszenciális jelentősége van a Th17 sejtvonal indukciójában, különböző gyulladásos folyamatokban részt vesz. Több, az utóbbi időben végzett vizsgálatban azt találták, hogy az IL-6 targetje a ROR γ , és az IL-6 hatására a TGF- β szignál útvonalon keresztül Th17 sejtek alakulnak ki. A T sejt receptor jelenlétében, a naív CD4+ T sejtek IL-6 és TGF- β citokinekkal történő stimulációja szinergista módon hat a sejtekben történő ROR γ expressziójára. *In vivo* patkány modell szerint IL-6 gp130-STAT szignál útvonal lényeges szerepet játszik a Th17 sejtek megjelenésében [214].

Munkánkban elsőként észleltük, hogy a Th1-et polarizáló IL-12, IFN- γ citokinek és a Th17-hez asszociálható citokinek, mint az IL-17, IL-23 és IL-6 szignifikánsan emelkedett a nem kezelt NDC-s betegekben. A D vitamin analóg alfacalcidol, úgy tűnik, elsődlegesen gátolja a naív CD4 sejtek Th1 és Th17 irányú differenciálódását (215, 216).

Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy az alfacalcidol terápia csökkenti az intracitoplazmatikus IL-17 citokin produkciót, mérsékli a perifériás proinflammatorikus citokinek, mint az IL-6, IL-17 és IL-23 citokinek szintjeit, illetőleg csökkenti a Th1 típusú

immun válaszra jellemző citokinek (IFN- γ és IL-12) plazma koncentrációját. Eredményeink szerint, az alfacalcidol egyaránt gátolja Th1 és Th17 sejteket, miközben elősegíti az IL-10 regulatív citokin választ. Kimutattuk, hogy a CD4+CD25^{high}Foxp3+ regulatív T sejtek százalékos aránya és funkcionális aktivitása emelkedik D vitamin analóg hatására.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a D vitamin hiánynak alapvető szerepe lehet az NDC progressziójában, a különböző proinflammatorikus folyamatok előtérbe kerülése által, továbbá a D vitamin pótlás képes javítani az immun homeostasis zavarát. A D vitamin terápia szükséges lehet a D vitamin hiányos NDC-s betegnél és megelőzheti, vagy legalábbis lassíthatja a definitív autoimmun kötőszöveti betegségbe való differenciálódást. A citokin termelő T sejtek további megismerése, a nTreg sejtek funkcionális aktivitásának vizsgálata további előrelépést jelenthet az NDC terápiás stratégiájának kialakításában. Az alfacalcidol, immunmodulatív hatása révén új terápiás vonalat képviselhet az NDC kórállapot kezelésében.

ÖSSZEFOGLALÁS - Új eredmények és az eredmények hasznosítása

- Munkánkban elsőként vizsgáltuk a definitív poliszisztémás autoimmun kórképet megelőző NDC kórállapotban a plazma 25(OH)D vitamin szintjét, illetve annak szezonális ingadozását nagyszámú betegpopulációban.
- Megfigyelésünk szerint az **NDC-s betegeknek a D vitamin szintje alacsonyabb, mint az egészséges kontroll csoporté.**
- NDC-ben **25(OH)D szintje szezonális ingadozást mutat**, a nyári hónapokban magasabb, a téli időszakban alacsonyabb értékek mérhetőek. Vizsgálatunkban kritikusan alacsony D vitamin (<10 ng/ml) szintet az NDC-s betegek 3,1%-ban (5 beteg) észleltünk, míg az egészséges kontroll csoportban egy esetben sem.
- **Az alacsony D vitamin szintű NDC-s betegekben a bőrtünetek, a pleuritisek és a motilitászavar gyakoribb előfordulását találtuk.** Ugyanezen betegeknél, a szérumban az **szignifikánsan gyakoribb volt anti-RNP, anti-SSA, anti-CCP.**
- **A definitív kötőszöveti betegségbe differenciálódott betegben alacsony, 30 ng/ml alatti D vitamin szintet észleltünk.**
- Eredményeink alátámasztják, hogy az NDC-s betegekben az immunválasz regulációja károsodott, az autoimmun folyamatokat kivédő szuppresszor aktivitás csökkent.
- Munkánkban elsőként vizsgáltuk NDC-ben az IL-17 expresszáló CD4⁺T sejteket, és megállapítottuk, hogy az IL-17 expresszáló Th17 sejtek száma magasabb az NDC-s betegekben mint az egészséges kontrollokban.
- A proinflammatorikus citokinek, az IL-12, IFN- γ , a Th17 sejthez asszociálható citokinek (IL-23, IL-17), és az IL-6 szignifikánsan emelkedett volt NDC-s betegekben.

- Az eredményeink igazolják, hogy az **NDC-s betegekben egy ún. Th17/nTreg sejt egyensúlyzavar van**, amelynek szerepe lehet definitív kötőszöveti betegség irányába való progresszióban
- A **D vitamin** kedvezően hat az NDC-s betegekben a Th1 és a Th17 sejtek működésére, mérsékli azok inflammatórikus irányú differenciálódását. A D vitamin alkalmazása **helyreállíthatja a szervezetben kialakult immun-homeosztatis károsodást** és jótékonyan befolyásolja a Th17/nTreg egyensúlyzavart, ennél fogva hatékony lehet az autoimmun betegségek terápiájában
- Eredményeink alapján *az NDC fázisában lévő betegeknél javasolt a plazma D vitamin szintjének meghatározása, illetve az egyéb rizikótényezőket is figyelembe véve a D vitamin pótlás megfontolása*

Irodalomjegyzék

1. **Alarcon G.S., Williams G.V., Singer J.Z., Steen V.D., Clegg D.O., Paulus H.E., Billingsley L.M., Luggen M.E., Polisson R.P., Willkens R.F.:** Early undifferentiated connective tissue disease. I. Early clinical manifestation in a large cohort of patients with undifferentiated connective tissue diseases compared with cohorts of well established connective tissue disease *J.Rheumatol.* 1991. 18: 1332-1339.
2. **Bodolay E., Derfalvi B., Gergely P., Poor G.:** [When does an autoimmune disease begin? Importance of the early diagnosis] *Orv.Hetil.* 2007. 148 Suppl 1: 25-30.
3. **Bodolay E., Szegedi,G.:** [Undifferentiated connective tissue disease] *Orv.Hetil.* 2009. 150: 867-872.
4. **Danieli M.G., Fraticelli P., Franceschini F., Cattaneo R., Farsi A., Passaleva A., Pietrogrande M., Invernizzi F., Vanoli M., Scorza R., Sabbadini M.G., Gerli R., Corvetta A., Farina G., Salsano F., Priori R., Valesini G., Danieli G.:** Five-year follow-up of 165 Italian patients with undifferentiated connective tissue diseases. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1999. 17: 585-591.
5. **Kumanovics G., Magyarlaki T., Komocsi A., Szekeres G., Czirjak L.:** Simultaneous presence of neutrophil alveolitis and Ki-67 positivity of alveolar macrophages in dermato-/polymyositis and systemic sclerosis *Rheumatol.Int.* 2003. 23: 6-10.

6. **Mosca M., Tani C., Neri C., Baldini C., Bombardieri S.:** Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD). *Autoimmun.Rev.* 2006. 6: 1-4.
7. **Petranyi G.:** [Undifferentiated collagen diseases.] *Orv.Hetil.* 1961. 102: 1585-1589.
8. **Shoenfeld Y., Selmi C., Zimlichman E., Gershwin M.E.:** The autoimmunologist: geoepidemiology, a new center of gravity, and prime time for autoimmunity *J.Autoimmun.* 2008. 31: 325-330.
9. **Cantorna M.T.:** Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 2000. 223: 230-233.
10. **Lips P.:** Which circulating level of 25-hydroxyvitamin D is appropriate? *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2004. 89-90: 611-614.
11. **Clegg D.O., Williams H.J., Singer J.Z., Steen V.D., Schlegel S., Ziminski C., Alarcon G.S., Luggen M.E., Polisson R.P., Willkens R.F.:** Early undifferentiated connective tissue disease. II. The frequency of circulating antinuclear antibodies in patients with early rheumatic diseases *J.Rheumatol.* 1991. 18: 1340-1343.
12. **Kallenberg C.G.:** Overlapping syndromes, undifferentiated connective tissue disease, and other fibrosing conditions *Curr.Opin.Rheumatol.* 1992. 4: 837-842.
13. **LeRoy E.C., Maricq H.R., Kahaleh M.B.:** Undifferentiated connective tissue syndromes *Arthritis Rheum.* 1980. 23: 341-343.

14. **Swaak A.J., Nossent J.C., Bronsveld W., van R.A., Nieuwenhuys E.J., Theuns L., Smeenk R.J.:** Systemic lupus erythematosus. I. Outcome and survival: Dutch experience with 110 patients studied prospectively *Ann.Rheum.Dis.* 1989. 48: 447-454.
15. **Cervera R., Khamashta M.A., Hughes G.R.:** 'Overlap' syndromes *Ann.Rheum.Dis.* 1990. 49: 947-948.
16. **Bodolay E., Csiki Z., Szekanecz Z., Ben T., Kiss E., Zeher M., Szucs G., Danko K., Szegedi G.:** Five-year follow-up of 665 Hungarian patients with undifferentiated connective tissue disease (UCTD). *Clin.Exp.Rheumatol.* 2003. 21: 313-320.
17. **Kinder B.W., Collard H.R., Koth L., Daikh D.I., Wolters P.J., Elicker B., Jones K.D., King T.E. Jr:** Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: lung manifestation of undifferentiated connective tissue disease? *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2007. 176: 691-697.
18. **Kinder B.W., Shariat C., Collard H.R., Koth L.L., Wolters P.J., Golden J.A., Panos R.J., King T.E. Jr.:** Undifferentiated connective tissue disease-associated interstitial lung disease: changes in lung function *Lung* 2010. 188: 143-149.
19. **Mosca M., Tavoni A., Neri R., Bencivelli W., Bombardieri S.:** Undifferentiated connective tissue diseases: the clinical and serological profiles of 91 patients followed for at least 1 year. *Lupus* 1998. 7: 95-100.

20. **Mosca M., Tani C., Bombardieri S.:** Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a new frontier for rheumatology. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 2007. 21: 1011-1023.

21. **Williams H.J., Alarcon G.S., Joks R., Steen V.D., Bulpitt K., Clegg D.O., Ziminski C.M., Luggen M.E., St Clair E.W., Willkens R.F., Yarboro C., Morgan J.G., Egger M.J., Ward J.R.:** Early undifferentiated connective tissue disease (CTD). VI. An inception cohort after 10 years: disease remissions and changes in diagnoses in well established and undifferentiated CTD *J.Rheumatol.* 1999. 26: 816-825.

22. **Nagy Z. Czirjak L.:** Nailfold digital capillaroscopy in 447 patients with connective tissue disease and Raynaud's disease *J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* 2004. 18: 62-68.

23. **Cutolo M., Otsa K., Paolino S., Yprus M., Veldi T., Seriole B.:** Vitamin D involvement in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythaematosus. *Ann.Rheum.Dis.* 2009. 68: 446-447.

24. **Cutolo M.:** Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases *Rheumatology.(Oxford)* 2009. 48: 210-212.

25. **Dusso A.S., Brown A.J., Slatopolsky E.:** Vitamin D. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 2005. 289: F8-28.

26. **Bikle D.D., Gee E., Halloran B., Kowalski M.A., Ryzen E., Haddad J.G.:** Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by

- albumin and the vitamin D-binding protein. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1986. 63: 954-959.
27. **Bikle D.D., Siiteri P.K., Ryzen E., Haddad J.G.:** Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1985. 61: 969-975.
 28. **DeLuca H.F.:** The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* 1988. 2: 224-236.
 29. **Canterbury J.M., Lerman S., Claflin A.J., Henry H., Norman A., Reiss E.:** Inhibition of parathyroid hormone secretion by 25-hydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol in the dog *J.Clin.Invest* 1978. 61: 1375-1383.
 30. **Schwartz Z., Brooks B., Swain L., Del T.F., Norman A., Boyan B.:** Production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ by growth zone and resting zone chondrocytes is dependent on cell maturation and is regulated by hormones and growth factors *Endocrinology* 1992. 130: 2495-2504.
 31. **Kumar R.:** Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Physiol Rev.* 1984. 64: 478-504.
 32. **Anderson P.H., O'Loughlin P.D., May B.K., Morris H.A.:** Determinants of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D₃ levels: the role of renal synthesis and catabolism of vitamin D. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 2004. 89-90: 111-113.

33. **Baldock P.A., Thomas G.P., Hodge J.M., Baker S.U., Dressel U., O'Loughlin P.D., Nicholson G.C., Briffa K.H., Eisman J.A., Gardiner E.M.:** Vitamin D action and regulation of bone remodeling: suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *J.Bone Miner.Res.* 2006. 21: 1618-1626.

34. **van D.M., Koedam M., Buurman C.J., Hewison M., Chiba H., Uitterlinden A.G., Pols H.A., Van Leeuwen J.P.:** Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1 α -hydroxylase expression and activity in human bone cells. *FASEB J.* 2006. 20: 2417-2419.

35. **Holick M.F.:** Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 2006. 92: 49-59.

36. **Kaptoge S., Reid D.M., Scheidt-Nave C., Poor G., Pols H.A., Khaw K.T., Felsenberg D., Benevolenskaya L.I., Diaz M.N., Stepan J.J., Eastell R., Boonen S., Cannata J.B., Glueer C.C., Crabtree N.J., Kaufman J.M., Reeve J.:** Geographic and other determinants of BMD change in European men and women at the hip and spine. a population-based study from the Network in Europe for Male Osteoporosis (NEMO). *Bone* 2007. 40: 662-673.

37. **Lakatos P.:** [Treatment of osteoporosis]. *Orv.Hetil.* 2003. 144: 1551-1552.

38. **Fritsche J., Mondal K., Ehrnsperger A., Andreesen R., Kreutz M.:** Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase and production of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ by human dendritic cells. *Blood* 2003. 102: 3314-3316.

39. **Adams J.S., Sharma O.P., Gacad M.A., Singer F.R.:** Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J.Clin.Invest* 1983. 72: 1856-1860.
40. **Iannuzzi M.C., Rybicki B.A., Teirstein A.S.:** Sarcoidosis. *N.Engl.J.Med.* 2007. 357: 2153-2165.
41. **Liu P.T., Stenger S., Li H., Wenzel L., Tan B.H., Krutzik S.R., Ochoa M.T., Schaubert J., Wu K., Meinken C., Kamen D.L., Wagner M., Bals R., Steinmeyer A., Zugel U., Gallo R.L., Eisenberg D., Hewison M., Hollis B.W., Adams J.S., Bloom B.R., Modlin R.L.:** Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006. 311: 1770-1773.
42. **Oberg F., Botling J., Nilsson K.:** Functional antagonism between vitamin D3 and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U-937 cells. *J.Immunol.* 1993. 150: 3487-3495.
43. **Sadeghi K., Wessner B., Laggner U., Ploder M., Tamandl D., Friedl J., Zugel U., Steinmeyer A., Pollak A., Roth E., Boltz-Nitulescu G., Spittler A.:** Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur.J.Immunol.* 2006. 36: 361-370.
44. **Scherberich J.E., Kellermeyer M., Ried C., Hartinger A.:** 1-alpha-calcidol modulates major human monocyte antigens and toll-like receptors TLR 2 and TLR4 in vitro. *Eur.J.Med.Res.* 2005. 10: 179-182.

45. **Urry Z., Xystrakis E., Richards D.F., McDonald J., Sattar Z., Cousins D.J., Corrigan C.J., Hickman E., Brown Z., Hawrylowicz C.M.:** Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J.Clin.Invest* 2009. 119: 387-398.

46. **Wang T.T., Nestel F.P., Bourdeau V., Nagai Y., Wang Q., Liao J., Tavera-Mendoza L., Lin R., Hanrahan J.W., Mader S., White J.H.:** Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J.Immunol.* 2004. 173: 2909-2912.

47. **Martineau A.R., Wilkinson K.A., Newton S.M., Floto R.A., Norman A.W., Skolimowska K., Davidson R.N., Sorensen O.E., Kampmann B., Griffiths C.J., Wilkinson R.J.:** IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J.Immunol.* 2007. 178: 7190-7198.

48. **Yim S., Dhawan P., Ragunath C., Christakos S., Diamond G.:** Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *J.Cyst.Fibros.* 2007. 6: 403-410.

49. **Kuruto-Niwa R., Nakamura M., Takeishi K., Nozawa R.:** Transcriptional regulation by C/EBP alpha and -beta in the expression of the gene for the MRP14 myeloid calcium binding protein. *Cell Struct.Funct.* 1998. 23: 109-118.

50. **Uitterlinden A.G., Fang Y., van Meurs J.B., Pols H.A., Van Leeuwen J.P.:** Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004. 338: 143-156.
51. **Baeke F., Etten E.V., Overbergh L., Mathieu C.:** Vitamin D3 and the immune system: maintaining the balance in health and disease. *Nutr.Res.Rev.* 2007. 20: 106-118.
52. **Penna G., Adorini L.:** 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J.Immunol.* 2000. 164: 2405-2411.
53. **van Halteren A.G., van E.E., de Jong E.C., Bouillon R., Roep B.O., Mathieu C.:** Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes* 2002. 51: 2119-2125.
54. **Berer A., Stockl J., Majdic O., Wagner T., Kollars M., Lechner K., Geissler K., Oehler L.:** 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Exp.Hematol.* 2000. 28: 575-583.
55. **Gauzzi M.C., Purificato C., Donato K., Jin Y., Wang L., Daniel K.C., Maghazachi A.A., Belardelli F., Adorini L., Gessani S.:** Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J.Immunol.* 2005. 174: 270-276.

56. **Pedersen A.W., Holmstrom K., Jensen S.S., Fuchs D., Rasmussen S., Kvistborg P., Claesson M.H., Zocca M.B.:** Phenotypic and functional markers for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells. *Clin.Exp.Immunol.* 2009. 157: 48-59.

57. **Mosser D.M., Zhang,X.:** Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol.Rev.* 2008. 226: 205-218.

58. **Zhu J., Paul W.E.:** CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008. 112: 1557-1569.

59. **Koren R., Ravid A., Rotem C., Shohami E., Liberman U.A., Novogrodsky A.:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances prostaglandin E2 production by monocytes. A mechanism which partially accounts for the antiproliferative effect of 1,25(OH)2D3 on lymphocytes. *FEBS Lett.* 1986. 205: 113-116.

60. **Xu H., Soruri A., Gieseler R.K., Peters J.H.:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scand.J.Immunol.* 1993. 38: 535-540.

61. **Griffin M.D., Lutz W.H., Phan V.A., Bachman L.A., McKean D.J., Kumar R.:** Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000. 270: 701-708.

62. **Muller K., Haahr P.M., Diamant M., Rieneck K., Kharazmi A., Bendtzen K.:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine* 1992. 4: 506-512.
63. **Penna G., Roncari A., Amuchastegui S., Daniel K.C., Berti E., Colonna M., Adorini L.:** Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 2005. 106: 3490-3497.
64. **Penna G., Amuchastegui S., Giarratana N., Daniel K.C., Vulcano M., Sozzani S., Adorini L.:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J.Immunol.* 2007. 178: 145-153.
65. **Canning M.O., Grotenhuis K., de W.H., Ruwhof C., Drexhage H.A.:** 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes *Eur.J.Endocrinol.* 2001. 145: 351-357.
66. **Verstuyf A., Carmeliet G., Bouillon R., Mathieu C.:** Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int.* 2010. 78: 140-145.
67. **Spittler A., Willheim M., Leutmezer F., Ohler R., Krugluger W., Reissner C., Lucas T., Brodowicz T., Roth E., Boltz-Nitulescu G.:** Effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines on the expression of MHC antigens, complement receptors and other antigens on human blood monocytes and U937 cells: role in cell differentiation, activation and phagocytosis. *Immunology* 1997. 90: 286-293.

68. **Tokuda N., Levy R.B.:** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1996. 211: 244-250.

69. **Adorini L.:** Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2003. 987: 258-261.

70. **Gregori S., Casorati M., Amuchastegui S., Smioldo S., Davalli A.M., Adorini L.:** Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J.Immunol.* 2001. 167: 1945-1953.

71. **Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., de Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M., O'Garra A.:** In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J.Exp.Med.* 2002. 195: 603-616.

72. **Zugel U., Steinmeyer A., Giesen C., Asadullah K.:** A novel immunosuppressive 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ analog with reduced hypercalcemic activity. *J.Invest Dermatol.* 2002. 119: 1434-1442.

73. **Koren R., Ravid A., Liberman U.A., Hochberg Z., Weisman Y., Novogrodsky A.:** Defective binding and function of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in peripheral mononuclear cells of patients with end-organ resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J.Clin.Invest* 1985. 76: 2012-2015.

74. **D'Ambrosio D.:** Increased IgE but reduced Th2-type inflammation in vitamin D receptor-deficient mice. *J.Immunol.* 2005. 174: 4451.

75. **Miyakoshi H., Aoki T., Hirasawa Y.:** Immunological effects of 1alpha-hydroxycholecalciferol (1alpha-OH-D3) and its metabolites. *Clin.Nephrol.* 1981. 16: 119-125.

76. **Daniel C., Sartory N.A., Zahn N., Radeke H.H., Stein J.M.:** Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2008. 324: 23-33.

77. **Nakae S., Nambu A., Sudo K., Iwakura Y.:** Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J.Immunol.* 2003. 171: 6173-6177.

78. **Bhalla A.K., Amento E.P., Serog B., Glimcher L.H.:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation. *J.Immunol.* 1984. 133: 1748-1754.

79. **Provvedini D.M., Tsoukas C.D., Deftos L.J., Manolagas S.C.:** 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science* 1983. 221: 1181-1183.

80. **Heine G., Anton K., Henz B.M., Worm M.:** 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *Eur.J.Immunol.* 2002. 32: 3395-3404.

81. **Heine G., Niesner U., Chang H.D., Steinmeyer A., Zugel U., Zuberbier T., Radbruch A., Worm M.:** 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur.J.Immunol.* 2008. 38: 2210-2218.
82. **Leung K.H.:** Inhibition of human natural killer cell and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity and differentiation by vitamin D3. *Scand.J.Immunol.* 1989. 30: 199-208.
83. **Ross T.K., Darwish H.M., DeLuca H.F.:** Molecular biology of vitamin D action. *Vitam.Horm.* 1994. 49: 281-326.
84. **Lemire J.M.:** Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 1995. 53: 599-602.
85. **Afzali B., Lombardi G., Lechler R.I., Lord G.M.:** The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin.Exp.Immunol.* 2007. 148: 32-46.
86. **Harrington L.E., Mangan P.R., Weaver C.T.:** Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr.Opin.Immunol.* 2006. 18: 349-356.
87. **Kolls J.K., Linden A.:** Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004. 21: 467-476.

88. **Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K.:** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006. 441: 235-238.
89. **Bettelli E., Korn T., Kuchroo V.K.:** Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr.Opin.Immunol.* 2007. 19: 652-657.
90. **Chen Z., O'Shea J.J.:** Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol.Res.* 2008. 41: 87-102.
91. **Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B., Helms W.S., Bullard D.C., Elson C.O., Hatton R.D., Wahl S.M., Schoeb T.R., and Weaver C.T.:** Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006. 441: 231-234.
92. **Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M., Stockinger B.:** TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006. 24: 179-189.
93. **Cantorna M.T., Woodward W.D., Hayes C.E., DeLuca H.F.:** 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. *J.Immunol.* 1998. 160: 5314-5319.
94. **Staeva-Vieira T.P., Freedman L.P.:** 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. *J.Immunol.* 2002. 168: 1181-1189.

95. **Chen S., Sims G.P., Chen X.X., Gu Y.Y., Chen S., Lipsky P.E.:** Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J.Immunol.* 2007. 179: 1634-1647.
96. **Lemire J.M., Adams J.S., Sakai R., Jordan S.C.:** 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J.Clin.Invest* 1984. 74: 657-661.
97. **Linker-Israeli M., Elstner E., Klinenberg J.R., Wallace D.J., Koeffler H.P.:** Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous in vitro immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *Clin.Immunol.* 2001. 99: 82-93.
98. **Chapuy M.C., Preziosi P., Maamer M., Arnaud S., Galan P., Hercberg S., Meunier P.J.:** Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos.Int.* 1997. 7: 439-443.
99. **Holick M.F.:** 25-OH-vitamin D assays. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2005. 90: 3128-3129.
100. **Thomas M.K., Lloyd-Jones D.M., Thadhani R.I., Shaw A.C., Deraska D.J., Kitch B.T., Vamvakas E.C., Dick I.M., Prince R.L., Finkelstein J.S.:** Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N.Engl.J.Med.* 1998. 338: 777-783.
101. **Bischoff-Ferrari H.A., Giovannucci E., Willett W.C., Dietrich T., Dawson-Hughes B.:** Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am.J.Clin.Nutr.* 2006. 84: 18-28.

102. **Holick M.F.:** High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin.Proc.* 2006. 81: 353-373.
103. **Holick M.F.:** Vitamin D deficiency. *N.Engl.J.Med.* 2007. 357: 266-281.
104. **Malabanan A., Veronikis I.E., Holick M.F.:** Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 1998. 351: 805-806.
105. **Holick M.F., Chen T.C.:** Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am.J.Clin.Nutr.* 2008. 87: 1080S-1086S.
106. **Hayes C.E., Nashold F.E., Spach K.M., Pedersen L.B.:** The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 2003. 49: 277-300.
107. **Holick M.F.:** McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. *Am.J.Clin.Nutr.* 1994. 60: 619-630.
108. **Morris H.A.:** Vitamin D: a hormone for all seasons--how much is enough?. *Clin.Biochem.Rev.* 2005. 26: 21-32.
109. **Holick M.F.:** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 2004. 80: 1678S-1688S.
110. **Holick M.F.:** Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am.J.Clin.Nutr.* 2004. 79: 362-371.

111. **Schwalfenberg G.:** Not enough vitamin D: health consequences for Canadians. *Can.Fam.Physician* 2007. 53: 841-854.
112. **Brown S.J.:** The role of vitamin D in multiple sclerosis. *Ann.Pharmacother.* 2006. 40: 1158-1161.
113. **Lim W.C., Hanauer S.B., Li Y.C.:** Mechanisms of disease: vitamin D and inflammatory bowel disease. *Nat.Clin.Pract.Gastroenterol.Hepatol.* 2005. 2: 308-315.
114. **Alarcon G.S., Friedman A.W., Straaton K.V., Moulds J.M., Lisse J., Bastian H.M., McGwin G., Jr., Bartolucci A.A., Roseman J.M., Reveille J.D.:** Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. LUPus in MInority populations: NAture vs. Nurture. *Lupus* 1999. 8: 197-209.
115. **Rucker D., Allan J.A., Fick G.H., Hanley D.A.:** Vitamin D insufficiency in a population of healthy western Canadians. *CMAJ.* 2002. 166: 1517-1524.
116. **Steingrimsdottir L., Gunnarsson O., Indridason O.S., Franzson L., Sigurdsson G.:** Relationship between serum parathyroid hormone levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *JAMA* 2005. 294: 2336-2341.
117. **Vieth R., Cole D.E., Hawker G.A., Trang H.M., Rubin L.A.:** Wintertime vitamin D insufficiency is common in young Canadian women, and their vitamin D intake does not prevent it. *Eur.J.Clin.Nutr.* 2001. 55: 1091-1097.

118. **Cutolo M.:** Solar light effects on onset/relapses and circannual/circadian symptomatology in rheumatoid arthritis. *Clin.Exp.Rheumatol.* 2003. 21: 148-150.
119. **Sokka T.:** Rheumatoid arthritis databases in Finland. *Clin.Exp.Rheumatol.* 2005. 23: S201-S204.
120. **Matsuoka L.Y., Wortsman J., Dannenberg M.J., Hollis B.W., Lu Z., Holick M.F.:** Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D3. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1992. 75: 1099-1103.
121. **Wright T.B., Shults J., Leonard M.B., Zemel B.S., Burnham J.M.:** Hypovitaminosis D is associated with greater body mass index and disease activity in pediatric systemic lupus erythematosus. *J.Pediatr.* 2009. 155: 260-265.
122. **Carvalho J.F., Blank M., Kiss E., Tarr T., Amital H., Shoenfeld Y.:** Anti-vitamin D, vitamin D in SLE: preliminary results. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2007. 1109: 550-557.
123. **Ozaki Y., Nomura S., Nagahama M., Yoshimura C., Kagawa H., Fukuhara S.:** Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron* 2000. 85: 86-91.
124. **Huang C.M., Wu M.C., Wu J.Y., Tsai F.J.:** Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002. 11: 31-34.

125. **Sakulpipatsin W., Verasertniyom O., Nantiruj K., Totemchokchyakarn K., Lertsrisatit P., Janwityanujit S.:** Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.Ther.* 2006. 8: R48.
126. **Abbasi M., Rezaieyazdi Z., Afshari J.T., Hatef M., Sahebari M., Saadati N.:** Lack of association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol.Int.* 2010. 11: 1537-1539
127. **Maalej A., Petit-Teixeira E., Michou L., Rebai A., Cornelis F., Ayadi H.:** Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population. *Genes Immun.* 2005. 6: 707-711.
128. **Garcia-Lozano J.R., Gonzalez-Escribano M.F., Valenzuela A., Garcia A., Nunez-Roldan A.:** Association of vitamin D receptor genotypes with early onset rheumatoid arthritis. *Eur.J.Immunogenet.* 2001. 28: 89-93.
129. **Gomez-Vaquero C., Fiter J., Enjuanes A., Nogues X., Diez-Perez A., Nolla J.M.:** Influence of the BsmI polymorphism of the vitamin D receptor gene on rheumatoid arthritis clinical activity. *J.Rheumatol.* 2007. 34: 1823-1826.
130. **Rass P., Pakozdi A., Lakatos P., Zilahi E., Sipka S., Szegedi G., Szekanecz Z.:** Vitamin D receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis and associated osteoporosis. *Rheumatol.Int.* 2006. 26: 964-971.

131. **Klein R.G., Arnaud S.B., Gallagher J.C., DeLuca H.F., Riggs B.L.:** Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisonism. Role of 25-hydroxyvitamin D and corticosteroid dose. *J.Clin.Invest* 1977. 60: 253-259.
132. **Carre M., Ayigbede O., Miravet L., Rasmussen H.:** The effect of Prednisolone upon the metabolism and action of 25-hydroxy-and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1974. 71: 2996-3000.
133. **Broe K.E., Chen T.C., Weinberg J., Bischoff-Ferrari H.A., Holick M.F., Kiel D.P.:** A higher dose of vitamin d reduces the risk of falls in nursing home residents: a randomized, multiple-dose study. *J.Am.Geriatr.Soc.* 2007. 55: 234-239.
134. **Hypponen E., Boucher B.J., Berry D.J., PowerC.:** 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes* 2008. 57: 298-305.
135. **Przybelski R.J., Binkley N.C.:** Is vitamin D important for preserving cognition? A positive correlation of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with cognitive function. *Arch.Biochem.Biophys.* 2007. 460: 202-205.
136. **Lu Y., Genant H.K., Shepherd J., Zhao S., Mathur A., Fuerst T.P., Cummings S.R.:** Classification of osteoporosis based on bone mineral densities. *J.Bone Miner.Res.* 2001. 16: 901-910.
137. **Gaal J., Varga J., Szabados L., Garai I., Galuska L., Suranyi P., Szegedi A., Zeher M., Bodolay E.:** High prevalence of oesophageal involvement in patients with

- undifferentiated connective tissue disease using radionuclide oesophageal transit scintigraphy. *Nucl.Med.Comm.* 2005. 26: 1113-1117.
138. **Hollis B.W., Wagner C.L.:** Normal serum vitamin D levels. *N.Engl.J.Med.* 2005. 352: 515-516.
139. **Szodoray P., Nakken B., Barath S., Gaal J., Aleksza M., Zeher M., Sipka S., Szilagyi A., Zold E., Szegedi G., Bodolay E.:** Progressive divergent shifts in natural and induced T-regulatory cells signify the transition from undifferentiated to definitive connective tissue disease. *Int.Immunol.* 2008. 20: 971-979.
140. **Cools N., Ponsaerts P., Van Tendeloo V.F., Berneman Z.N.:** Regulatory T cells and human disease. *Clin.Dev.Immunol.* 2007. 2007: 89195.
141. **Cantorna M.T., Mahon B.D.:** Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2004. 229: 1136-1142.
142. **Kamen D., Aranow C.:** Vitamin D in systemic lupus erythematosus. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2008. 20: 532-537.
143. **Solomon A.J., Whitham R.H.:** Multiple sclerosis and vitamin D: a review and recommendations. *Curr.Neurol.Neurosci.Rep.* 2010. 10: 389-396.

144. **Munger K.L., Zhang S.M., O'Reilly E., Hernan M.A., Olek M.J., Willett W.C., Ascherio A.:** Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004. 62: 60-65.
145. **Cutillas-Marco E., Morales-Suarez-Varela M., Marquina-Vila A., Grant W.:** Serum 25-hydroxyvitamin D levels in patients with cutaneous lupus erythematosus in a Mediterranean region. *Lupus* 2010. 19: 810-814.
146. **Costenbader K.H., Feskanich D., Holmes M., Karlson E.W., Benito-Garcia E.:** Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Ann.Rheum.Dis.* 2008. 67: 530-535.
147. **O'Regan S., Chesney R.W., Hamstra A., Eisman J.A., O'Gorman A.M., DeLuca H.F.:** Reduced serum 1,25-(OH)₂ vitamin D₃ levels in prednisone-treated adolescents with systemic lupus erythematosus. *Acta Paediatr.Scand.* 1979. 68: 109-111.
148. **Muller K., Kriegbaum N.J., Baslund B., Sorensen O.H., Thymann M., Bentzen K.:** Vitamin D₃ metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D₃ in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin.Rheumatol.* 1995. 14: 397-400.
149. **Kamen D.L., Cooper G.S., Bouali H., Shaftman S.R., Hollis B.W., Gilkeson G.S.:** Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun.Rev.* 2006. 5: 114-117.

150. **Orbach H., Zandman-Goddard G., Amital H., Barak V., Szekanecz Z., Szucs G., Danko K., Nagy E., Csepany T., Carvalho J.F., Doria A., Shoenfeld Y.:** Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2007. 1109: 385-400.
151. **Ruiz-Irastorza G., Egurbide M.V., Olivares N., Martinez-Berriotxo A., Aguirre C.:** Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology.(Oxford)* 2008. 47: 920-923.
152. **Borba V.Z., Vieira J.G., Kasamatsu T., Radominski S.C., Sato E.I., Lazaretti-Castro M.:** Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos.Int.* 2009. 20: 427-433.
153. **Becker A., Fischer R., Schneider M.:** [Bone density and 25-OH vitamin D serum level in patients with systemic lupus erythematosus]. *Z.Rheumatol.* 2001. 60: 352-358.
154. **Cutolo M.:** Vitamin D or hormone D deficiency in autoimmune rheumatic diseases, including undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis Res.Ther.* 2008. 10: 123.
155. **Calzolari G., Data V., Carignola R., Angeli A.:** Hypovitaminosis D in systemic sclerosis. *J.Rheumatol.* 2009. 36: 2844.
156. **Caramaschi P., Dalla G.A., Ruzzenente O., Volpe A., Ravagnani V., Tinazzi I., Barausse G., Bambara L.M., Biasi D.:** Very low levels of vitamin D in systemic sclerosis patients. *Clin.Rheumatol.* 2010. 12: 1419-1425

157. **Vacca A., Cormier C., Piras M., Mathieu A., Kahan A., Allanore Y.:** Vitamin D deficiency and insufficiency in 2 independent cohorts of patients with systemic sclerosis. *J.Rheumatol.* 2009. 36: 1924-1929.

158. **Bang B., Asmussen K., Sorensen O.H., Oxholm P.:** Reduced 25-hydroxyvitamin D levels in primary Sjogren's syndrome. Correlations to disease manifestations. *Scand.J.Rheumatol.* 1999. 28: 180-183.

159. **Muller K., Oxholm P., Sorensen O.H., Thyman M., Hoier-Madsen M., Bendtzen K.:** Abnormal vitamin D3 metabolism in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann.Rheum.Dis.* 1990. 49: 682-684.

160. **Szodoray P., Horvath I.F., Papp G., Barath S., Gyimesi E., Csathy L., Kappelmayer J., Sipka S., Duttaroy A.K., Nakken B., Zeher M.:** The immunoregulatory role of vitamins A, D and E in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology.(Oxford)* 2010. 49: 211-217.

161. **Aguado P., del Campo M.T., Garces M.V., Gonzalez-Casaus M.L., Bernad M., Gijon-Banos J., Martin M.E., Torrijos A., Martinez M.E.:** Low vitamin D levels in outpatient postmenopausal women from a rheumatology clinic in Madrid, Spain: their relationship with bone mineral density. *Osteoporos.Int.* 2000. 11: 739-744.

162. **Merlino L.A., Curtis J., Mikuls T.R., Cerhan J.R., Criswell L.A., Saag K.G.:** Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.* 2004. 50: 72-77.

163. **Kroger H., Penttinen I.M., Alhava E.M.:** Low serum vitamin D metabolites in women with rheumatoid arthritis. *Scand.J.Rheumatol.* 1993. 22: 172-177.
164. **Lange U., Teichmann J., Strunk J., Muller-Ladner U., Schmidt K.L.:** Association of 1,25 vitamin D3 deficiency, disease activity and low bone mass in ankylosing spondylitis. *Osteoporos.Int.* 2005. 16: 1999-2004.
165. **Oelzner P., Muller A., Deschner F., Huller M., Abendroth K., Hein G., Stein G.:** Relationship between disease activity and serum levels of vitamin D metabolites and PTH in rheumatoid arthritis. *Calcif.Tissue Int.* 1998. 62: 193-198.
166. **Patel S., Farragher T., Berry J., Bunn D., Silman A., Symmons D.:** Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007. 56: 2143-2149.
167. **Braun-Moscovici Y., Toledano K., Markovits D., Rozin A., Nahir A.M., Balbir-Gurman A.:** Vitamin D level: is it related to disease activity in inflammatory joint disease? *Rheumatol.Int.* 2011. 4: 493-499
168. **Feser M., Derber L.A., Deane K.D., Lezotte D.C., Weisman M.H., Buckner J.H., Mikuls T., O'Dell J., Gregersen P.K., Holers V.M., Norris J.M.:** Plasma 25,OH vitamin D concentrations are not associated with rheumatoid arthritis (RA)-related autoantibodies in individuals at elevated risk for RA. *J.Rheumatol.* 2009. 36: 943-946.

169. **Cantorna M.T., Hayes C.E., DeLuca H.F.:** 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J.Nutr.* 1998. 128: 68-72.
170. **Hypponen E., Laara E., Reunanen A., Jarvelin M.R., Virtanen S.M.:** Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001. 358: 1500-1503.
171. **Fronczak C.M., Baron A.E., Chase H.P., Ross C., Brady H.L., Hoffman M., Eisenbarth G.S., Rewers M., Norris J.M.:** In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes Care* 2003. 26: 3237-3242.
172. **Goldberg P., Fleming M.C., Picard E.H.:** Multiple sclerosis: decreased relapse rate through dietary supplementation with calcium, magnesium and vitamin D. *Med.Hypotheses* 1986. 21: 193-200.
173. **Kimball S.M., Ursell M.R., O'Connor P., Vieth R.:** Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am.J.Clin.Nutr.* 2007. 86: 645-651.
174. **Morimoto S., Yoshikawa K., Kozuka T., Kitano Y., Imanaka S., Fukuo K., Koh E., Kumahara Y.:** An open study of vitamin D3 treatment in psoriasis vulgaris. *Br.J.Dermatol.* 1986. 115: 421-429.
175. **Gaal J., Lakos G., Szodoray P., Kiss J., Horvath I., Horkay E., Nagy G., Szegedi A.:** Immunological and clinical effects of alphacalcidol in patients with psoriatic

- arthropathy: results of an open, follow-up pilot study. *Acta Derm.Venereol.* 2009. 89: 140-144.
176. **Chen M.L., Perez A., Sanan D.K., Heinrich G., Chen T.C., Holick M.F.:** Induction of vitamin D receptor mRNA expression in psoriatic plaques correlates with clinical response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J.Invest Dermatol.* 1996. 106: 637-641.
 177. **Mathieu C., Waer M., Laureys J., Rutgeerts O., Bouillon R.:** Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia* 1994. 37: 552-558.
 178. **Lemire J.M., Ince A., Takashima M.:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 1992. 12: 143-148.
 179. **Larsson P., Mattsson L., Klareskog L., Johnsson C.:** A vitamin D analogue (MC 1288) has immunomodulatory properties and suppresses collagen-induced arthritis (CIA) without causing hypercalcaemia. *Clin.Exp.Immunol.* 1998. 114: 277-283.
 180. **Tsuji M., Fujii K., Nakano T., Nishii,Y.:** 1 alpha-hydroxyvitamin D3 inhibits type II collagen-induced arthritis in rats. *FEBS Lett.* 1994. 337: 248-250.
 181. **Abe J., Nakamura K., Takita Y., Nakano T., Irie H., Nishii Y.:** Prevention of immunological disorders in MRL/l mice by a new synthetic analogue of vitamin D3: 22-oxa-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo)* 1990. 36: 21-31.

182. **Koizumi T., Nakao Y., Matsui T., Nakagawa T., Matsuda S., Komoriya K., Kanai Y., Fujita T.:** Effects of corticosteroid and 1,24R-dihydroxy-vitamin D3 administration on lymphoproliferation and autoimmune disease in MRL/MP-lpr/lpr mice. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 1985. 77: 396-404.
183. **Vaisberg M.W., Kaneno R., Franco M.F., Mendes N.F.:** Influence of cholecalciferol (vitamin D3) on the course of experimental systemic lupus erythematosus in F1 (NZBxW) mice. *J.Clin.Lab Anal.* 2000. 14: 91-96.
184. **DeLuca H.F., Cantorna M.T.:** Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* 2001. 15: 2579-2585.
185. **Andjelkovic Z., Vojinovic J., Pejnovic N., Popovic M., Dujic A., Mitrovic D., Pavlica L., Stefanovic D.:** Disease modifying and immunomodulatory effects of high dose 1 alpha (OH) D3 in rheumatoid arthritis patients. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1999. 17: 453-456.
186. **Ehrenstein M.R., Evans J.G., Singh A., Moore S., Warnes G., Isenberg D.A., Mauri C.:** Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J.Exp.Med.* 2004. 200: 277-285.
187. **Hein G., Oelzner P.:** [Vitamin D metabolites in rheumatoid arthritis: findings--hypotheses--consequences] *Z.Rheumatol.* 2000. 59 Suppl 1: 28-32.

188. **Yamauchi Y., Tsunematsu T., Konda S., Hoshino T., Itokawa Y., Hoshizaki H.:**
[A double blind trial of alfacalcidol on patients with rheumatoid arthritis (RA)]
Ryumachi 1989. 29: 11-24.

189. **Perez A., Raab R., Chen T.C., Turner A., Holick M.F.:** Safety and efficacy of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for the treatment of psoriasis. *Br.J.Dermatol.* 1996. 134: 1070-1078.

190. **Sugiyama H., Gyulai R., Toichi E., Garaczi E., Shimada S., Stevens S.R., McCormick T.S., Cooper K.D.:** Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J.Immunol.* 2005. 174: 164-173.

191. **Dytoc M.T., Kossintseva I., Ting P.T.:** First case series on the use of calcipotriol-betamethasone dipropionate for morphea. *Br.J.Dermatol.* 2007. 157: 615-618.

192. **Lindley S., Dayan C.M., Bishop A., Roep B.O., Peakman M., Tree T.I.:** Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005. 54: 92-99.

193. **Littorin B., Blom P., Scholin A., Arnqvist H.J., Blohme G., Bolinder J., Ekbom-Schnell A., Eriksson J.W., Gudbjornsdottir S., Nystrom L., Ostman J., Sundkvist G.:** Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia* 2006. 49: 2847-2852.

194. **Borissova A.M., Tankova T., Kirilov G., Dakovska L., Kovacheva R.:** The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int.J.Clin.Pract.* 2003. 57: 258-261.
195. **Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., Hafler D.A.:** Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 2004. 199: 971-979.
196. **Ait-Oufella H., Salomon B.L., Potteaux S., Robertson A.K., Gourdy P., Zoll J., Merval R., Esposito B., Cohen J.L., Fisson S., Flavell R.A., Hansson G.K., Klatzmann D., Tedgui A., Mallat Z.:** Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat.Med.* 2006. 12: 178-180.
197. **Kukreja A., Cost G., Marker J., Zhang C., Sun Z., Lin-Su K., Ten S., Sanz M., Exley M., Wilson B., Porcelli S., Maclaren N.:** Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J.Clin.Invest* 2002. 109: 131-140.
198. **Liu M.F., Wang C.R., Fung L.L., Wu C.R.:** Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand.J.Immunol.* 2004. 59: 198-202.
199. **Mottonen M., Heikkinen J., Mustonen L., Isomaki P., Luukkainen R., Lassila O.:** CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin.Exp.Immunol.* 2005. 140: 360-367.

200. **Balandina A., Lecart S., Darteville P., Saoudi A., Berrih-Aknin S.:** Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005. 105: 735-741.
201. **Barath S., Sipka S., Aleksza M., Szegedi A., Szodoray P., Vegh J., Szegedi G., Bodolay E.:** Regulatory T cells in peripheral blood of patients with mixed connective tissue disease. *Scand.J.Rheumatol.* 2006. 35: 300-304.
202. **Alvarado-Sanchez B., Hernandez-Castro B., Portales-Perez D., Baranda L., Layseca-Espinosa E., Abud-Mendoza C., Cubillas-Tejeda A.C., Gonzalez-Amaro R.:** Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J.Autoimmun.* 2006. 27: 110-118.
203. **Lee C., Almagor O., Dunlop D.D., Chadha A.B., Manzi S., Spies S., Ramsey-Goldman R.:** Association between African American race/ethnicity and low bone mineral density in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007. 57: 585-592.
204. **Lyssuk E.Y., Torgashina A.V., Soloviev S.K., Nassonov E.L., Bykovskaia S.N.:** Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2007. 601: 113-119.
205. **Mellor-Pita S., Citores M.J., Castejon R., Tutor-Ureta P., Yebra-Bango M., Andreu J.L., Vargas J.A.:** Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann.Rheum.Dis.* 2006. 65: 553-554.

206. **Valencia X., Yarboro C., Illei G., Lipsky P.E.:** Deficient CD4⁺CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 2007. 178: 2579-2588.
207. **Wong C.K., Lit L.C., Tam L.S., Li E.K., Wong P.T., Lam C.W.:** Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin.Immunol.* 2008. 127: 385-393.
208. **Penna G., Amuchastegui S., Cossetti C., Aquilano F., Mariani R., Sanvito F., Doglioni C., Adorini L.:** Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J.Immunol.* 2006. 177: 8504-8511.
209. **Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J.D., McClanahan T., Kastelein R.A., Cua D.J.:** IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J.Exp.Med.* 2005. 201: 233-240.
210. **Yen D., Cheung J., Scheerens H., Poulet F., McClanahan T., McKenzie B., Kleinschek M.A., Owyang A., Mattson J., Blumenschein W., Murphy E., Sathe M., Cua D.J., Kastelein R.A., Rennick D.:** IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J.Clin.Invest* 2006. 116: 1310-1316.
211. **Wilson N.J., Boniface K., Chan J.R., McKenzie B.S., Blumenschein W.M., Mattson J.D., Basham B., Smith K., Chen T., Morel F., Lecron J.C., Kastelein R.A., Cua D.J., McClanahan T.K., Bowman E.P., de Waal M.R.:** Development,

- cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat.Immunol.* 2007. 8: 950-957.
212. **Chen Y., Langrish C.L., McKenzie B., Joyce-Shaikh B., Stumhofer J.S., McClanahan T., Blumenschein W., Churakovsa T., Low J., Presta L., Hunter C.A., Kastelein R.A., Cua D.J.:** Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J.Clin.Invest* 2006. 116: 1317-1326.
 213. **Chi W., Zhu X., Yang P., Liu X., Lin X., Zhou H., Huang X., Kijlstra A.:** Upregulated IL-23 and IL-17 in Behcet patients with active uveitis. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2008. 49: 3058-3064.
 214. **Nishihara M., Ogura H., Ueda N., Tsuruoka M., Kitabayashi C., Tsuji F., Aono H., Ishihara K., Huseby E., Betz U.A., Murakami M., Hirano T.:** IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int.Immunol.* 2007. 19: 695-702.
 215. **Szegedi G.** Az autoimmun betegségek csoportosításának és társulásának problémái. *Magyar Belorv Arch.* 1998. 51: 233
 216. **Bodolay E., Szegedi G.** Nem differenciált collagenosis. *Magy Immunol/Hun Immunol* 2003.; 2:11-15

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

E helyen szeretném kifejezni köszönetemet azoknak, akik lehetővé tették és segítették munkámat, hozzájárultak ahhoz, hogy egyetemi doktori értekezésem elkészüljön.

Legelőször köszönetet mondok Dr. Bodolay Edit Professzor nőnek, aki szakmai tevékenységemet figyelemmel kísérte, témavezetőmként kutató munkámat irányította és segítette, a kutatáshoz szükséges immunológiai ismereteimet és szemléletmódomat alakította. Hasznos útmutatásai és meglátásai lehetővé tették közleményeim megjelentetését és számos kongresszuson való eredményes részvételemet. Kitartó ösztönzése, példamutató szorgalma és biztatása nélkülözhetetlen volt. Őszinte köszönetet mondok klinikánk igazgatójának Dr. Zeher Margit Professzor asszonynak, aki mind klinikai, mind tudományos munkámat lehetővé tette és támogatta. Szívből jövő hálával tartozom Dr. Szegedi Gyula egyetemi tanárúrnak, akademikusnak, aki klinikai kutatási tevékenységemet fáradhatatlan és önzetlen segítséggel, tanácsokkal támogatta. Dr. Sipka Sándor egyetemi tanárnak, Dr. Gyimesi Editnek, Dr. Baráth Sándornak, Dr. Csípő Istvánnak és a Regionális Immunológiai Laboratórium valamennyi munkatársának az általunk nyújtott pótolhatatlan segítségért a betegek szerológiai és sejtes vizsgálataiban, valamint szakmai együttműködésükért és baráti támogatásukért. Köszönöm Dr. Kappelmayer János egyetemi tanárúrnak és Dr. Csáthy Lászlónak a D vitamin szint mérésben nyújtott segítségét. Hálás vagyok Dr. Szodoray Péter kollegámnak, aki értékes szakmai tanácsai révén segített közleményeim megjelentetésében. A közlemények, posztterek formai kivitelezésében, az ábrák szerkesztésében, a statisztikai módszerek kiválasztásában és az adatok elemzésében nyújtott fáradhatatlan munkájáért köszönet illeti tudományos munkatársamat, Hodosi Katalint. Legvégül családomnak – férjemnek, szüleimnek, testvéremnek – és mindazoknak mondok köszönetet, akik szeretetükkel mindvégig mellettem álltak.

PUBLIKÁCIÓK

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Zöld É**, Szodoray P, Nakken B, Baráth S, Kappelmayer J, Csáthy L, Hajas Á, Sipka S, Gyimesi E, Gaál J, Barta Z, Hallay J, Szegedi G, Bodolay E: Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease
Autoimmun Rev. 10 (3), 155-162, 2011.
IF: 6,368 (2009)
2. **Zöld É**, Szodoray P, Gaál J, Kappelmayer J, Csáthy L, Baráth S, Gyimesi E, Hajas Á, Zeher M, Szegedi Gy, Bodolay E: D vitamin analóg, alfacalcidol hatása a regulatív T sejt működésre Nem Differenciált Collagenosisban;
Magyar Reumatológia, 51 (1), 13-1, 2010
3. **Zöld E**, Szodoray P, Kappelmayer J, Gaál J, Csáthy L, Baráth S, Gyimesi E, Hajas A, Zeher M, Szegedi Gy, Bodolay E: Impaired regulatory T-cell homeostasis due to Vitamin D deficiency in Undifferentiated Connective Tissue Disease,
Scan J Rheumatol, 36(6), 490-497, 2010
IF: 2,507
4. **Zöld É**, Szodoray P, Gaál J, Szegedi A, Szegedi Gy, Bodolay E: A D vitamin autoimmun kórképekben: a D-vitamin immunregulatórikus hatása és terápiás lehetőségek;
Ca és Csont 12 (3), 85-93, 2009
5. Gaál J., Szegedi A., Csáthy L., Szodoray P., Csípő I., **Zöld É.**, Bodolay E.: A D vitamin hatása autoimmun kórképekben.
Magyar Reumatológia, 49 (1), 22-27, 2008.

6. Szodoray P, Nakken B, Barath S, Gaal J, Aleksza M, Zeher M, Sipka S, Szilagyi A, **Zold E**, Szegedi G, Bodolay E. Progressive divergent shifts in natural and induced T-regulatory cells signify the transition from undifferentiated to definitive connective tissue disease.

Int Immunol. 20(8): 971-979. 2008

IF: 3,181
7. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, **Zold E**, Szegedi G, Brun JG, Gesztelyi R, Zeher M, Bodolay E. The Complex Role of Vitamin D in Autoimmune Diseases.

Scand J Immunol. 68(3), 261-269, 2008

IF:2,186
8. **Zöld É**, Gaál J, Kappelmayar J, Csáthy L, Csípő I, Tumpek J, Zeher M, Szegedi Gy, Bodolay E: D vitamin meghatározások nem differenciált collagenosisban

Allergológia és Klinikai Immunológia. 11 (2), 34-42, 2008
9. **Zold E**, Szodoray P, Gaal J, Kappelmayar J, Csathy L, Gyimesi E, Zeher M, Szegedi G, Bodolay E. Vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease.

Arthritis Res Ther. 10(5):R123., 2008

IF: 4,485

EGYÉB TÉMÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

10. Bodolay E, **Zöld É**, Gaál J.: A poliszisztémás autoimmun betegségek előfázisának jelentősége Focus Med. 12 (3), 3-6, 2010

11. **Zold E**, Nagy A, Devenyi K, Zeher M, Barta Z: Successful use of adalimumab for treating fistulizing Crohn's disease with pyoderma gangrenosum: Two birds with one stone.
World J Gastroenterol. 15 (18), 2293-2295, 2009
IF: 2,092
12. Barta Z, **Zold E**, Zeher M: Pulse cyclophosphamide in steroid-resistant inflammatory bowel disease.
Aliment Pharmacol Ther. 25(11), 1363-1364, 2007
IF: 3,201
13. **Zold E**, Barta Z, Zeher M: Spondylodiscitis representing as the very first sign of Crohn's disease.
Inflamm. Bowel Disease 13(8), 1058-1059, 2007.
IF: 4,705
14. **Zold E**, Barta Z, Zeher M: Hydatid disease of the liver and associated hepatocellular carcinoma.
Clin. Gastroenterol. Hepatol. 3 (8), 35, 2005

PHD TÉMÁBAN MEGJELENT POSZTEREK

1. **Eva Zold**, Gyula Szegedi, Edit Bodolay: Vitamin D in Undifferentiated Connective Tissue Disease, XXVII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Congress in Barcelona, Spain 7-11 June 2008
2. E Bodolay, **E Zold**, P. Szodoray, E. Gyimesi, M Zeher, Gy Szegedi, J Gaál, J Kappelmayer, L Csathy: Vitamin D in Undifferentiated Connective Tissue

Disease, 6 th International Congress on Autoimmunity, Porto, Portugal, September 10-14, 2008

3. **Eva Zold**, Gabor Papp, Peter Szodoray, Janos Kappelmayer, Janos Gaal, Laszlo Csathy, Sandor Barath, Edit Gyimesi, Agota Hajas, Margit Zeher, Gyula Szegedi, Edit Bodolay: Impaired regulatory T-cell homeostasis due to Vitamin D deficiency in Undifferentiated Connective Tissue Disease, XXVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Congress in Warsaw, Poland 6-10 June 2009
4. **Zöld É**, Szodoray P, Gaál J, Kappelmayer J, Csáthy L, Barath S, Gyimesi E, Hajas Á, Zeher M, Szegedi Gy, Bodolay E: A D vitamin károsodott regulatív T sejt működésre kifejtett hatásának vizsgálata Nem Differenciált Collagenosisban, MRE, Kecskemét, 2008. szeptember.
5. **E Zold**, S Barath, J Kappelmayer, L Csathy, E Gyimesi, A Hajas, M Zeher, Gy Szegedi, E Bodolay: The effect of the different doses of alfacalcidol on regulatory T-cells in patients with undifferentiated connective tissue disease, 2010. szeptember. 13-15 8th CERC, Sopron
6. **E Zold**, M Zeher, E Bodolay: Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease; 2010. december 3-5 Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology, Bécs

EGYÉB POSZTEREK ÉS ABSZTRAKTOK JEGYZÉKE

7. **Zöld Éva**, Barta Zsolt, Zeher Margit: Echinococcus granulosus okozta májbetegség és hepatocelluláris carcinoma együttes előfordulása, esetbemutató; A

- Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának 2005. évi Kongresszusa, Debrecen,
8. **Zöld Éva**, Kiss Emese, Barta Zsolt, Zeher Margit: Egy ritka társulás: Pyoderma gangrenosum, Crohn betegség és szisztémás lupus erythematosus sikeres kezelése TNF-alfa blokkolóval (infliximab), esetbemutató; Magyar Gastroenterológiai Társaság 47. Kongresszusa, Magyarország, Balatonaliga, 2005
 9. **Zöld Éva**, Barta Zsolt, Csípő István, Zeher Margit: Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in celiac disease; Falk Symposium Turkey, Istanbul, 2007. Május
 10. Baráth Sándor, **Zöld Éva**, Sipka Sándor, Szegedi Gyula, Bodolay Edit: Regulatív CD4+CD25+ T sejtek funkcionális vizsgálata NDC-s betegeknél tetrazolium alapú proliferációs kit segítségével, Magyar Immunológiai Társaság (MIT) XXXVII. Vándorgyűlése, Budapest, 2008. október 29-31.
 11. Szomják Edit, András Cs, Kerekes Gy., **Zöld É**, Dér H., Veres K., Soltész P.: Malignus betegségekhez társuló szerzett thrombophilia és akut artériás thrombosis megjelenése beteganyagunkban; A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának 2008. évi Kongresszusa, Nyíregyháza-Sóstó
 12. Nagy Árpád, **Zöld É**, Radványi M., Zeher M., Barta Zs.: Cyclophosphamid terápia gyulladásos bélbetegségekben; A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának 2008. évi Kongresszusa, Nyíregyháza-Sóstó
 13. Hajas Á, Baráth S, Szodoray P, **Zöld É**, Bodolay E: Mixed Connective Tissue disease (MCTD): phenotypes and immunological characteristics. XXVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI), Congress in Warsaw, Poland 6-10 June 2009

14. A Hajas, P. Szodoray, **E Zold**, I Csipo, M Zeher, G Szegedi, E Bodolay: Distinct phenotypes in mixed connective tissue disease: subgroups and survival. 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May 5-9, 2010.
15. Hajas Á, **Zöld É**, Végh J, Csípő I, Bodolay E: 25-hydroxyvitamin D és cardiovasculáris rizikófaktorok MCTD-s nőbetegekben; Magyar Allergológiai és Klinikai Immunológiai Társaság XXXVIII. Kongresszusa, Magyarország, Balatonalmádi, 2010. május 13-15
16. A Hajas, P Szodoray, **E Zold**, I Csipo, M Zeher, Gy Szegedi, E Bodolay: Distinct phenotypes in mixed connective tissue disease: Subgroups and survival; 8th CERC, Sopron; 2010. szeptember. 13-15

Szcientometria

Értekezés alapjául szolgáló közlemények száma: 9

Egyéb közlemények száma: 5

Az értekezést megalapozó közlemények impakt faktora: 18,727

Az értekezésben fel nem használt közlemények impakt faktora: 9.998

Összesített impakt faktor: 28,725

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó posztterek száma: 6

Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó posztterek száma: 10